

مقایسه دورگ‌های بین‌گونه‌ای لولیوم (*Lolium spp.*) با والدین آنها با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

سید عبدالسعید حسینی‌زاده^۱، حسین میرزایی ندوشن^{۲*} و شهین مهرپور^۳

۱ - کارشناس ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه پیام نور، یزد

۲* - نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

پست الکترونیک: nodoushan2003@yahoo.com

۳ - استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱/۳۱

چکیده

دورگ‌گیری بین‌گونه‌های مختلف جنس لولیوم که دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند این امکان را فراهم می‌سازد که صفات مطلوب دو گونه را در یک وارته از این جنس وارد نموده و در نتیجه ترکیبی از صفات مطلوب را بدست آورد. با این هدف، دورگ‌های بین‌گونه‌ای تولید شد که ابتدا باید از نظر دورگ بودن مورد بررسی قرار گیرند. به‌طوری‌که چهار ژنوتیپ دورگ حاصل از تلاقی بین دو گونه *Lolium perenne* و *L. rigidum* به همراه والدین خود در این تحقیق از نظر پروفیل باندهای پروتئینی و با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر بررسی و مقایسه شدند تا ضمن تأیید دورگ بودن آنها، میزان قرابت و شباهت دورگ‌ها به هر یک از والدین مورد مطالعه قرار گرفته و تنوع ژنتیکی احتمالی بین نتاج حاصل از تلاقی‌ها نیز در سطح ملکولی ارزیابی گردد. به این منظور برای تولید پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر از روش SDS-PAGE استفاده گردید و داده‌های حاصل از حضور یا عدم حضور باندهای پروتئینی مورد تجزیه خوشه‌ای قرار گرفتند. دندروگرام حاصل نیز به همراه پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر برای دسته‌بندی و سنجش میزان شباهت نتاج و والدین با یکدیگر مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع ۲۰ باند در پروفیل تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شد و از نظر تعداد معدودی از باندها تفاوت‌های آشکاری بین ژنوتیپ‌های والدینی و نتاج مشاهده گردید. تفاوت‌هایی نیز در ضخامت و شدت نوارهای الکتروفورزی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شد که می‌تواند ناشی از تفاوت در شدت بیان ژن‌های مربوطه در والدین و نتاج باشد. به طور کلی مقایسه پروفیل باندهای پروتئینی ضمن نشان دادن تفاوت‌های آشکار بین دو گونه والدینی از نظر باندهای پروتئینی، دورگ بودن نتاج حاصل از تلاقی بین‌گونه‌ای نیز تأیید گردید.

واژه‌های کلیدی: لولیوم، الکتروفورز، دورگ بین‌گونه‌ای، تجزیه خوشه‌ای، SDS-PAGE.

مقدمه

اصلاحی لولیوم و سایر گراس‌ها می‌باشد. همچنین صفاتی از قبیل افزایش سرعت رشد در اوایل بهار و پاییز، دیرزیستی و توسعه فصل چرا، بهبود کیفیت علوفه و

افزایش عملکرد علوفه و نیز افزایش مقاومت به تنش‌های مختلف زنده و غیر زنده از مهمترین اهداف

اهداف اصلاحی نیز استفاده شده است. استفاده از پروتئین بذر در مطالعات سیستماتیک بر این فرض مبتنی است که پروتئین افراد، جمعیت‌ها و گونه‌های مختلف، در صورت داشتن حرکت یکسان در داخل ژل مشابهند و پس از رنگ‌آمیزی تولید باندهایی با عرض و شدت یکسان می‌کنند. هر یک از باندها به عنوان صفتی مجزا و با فرض اینکه این پروتئین‌ها فرآورده‌های نسبتاً مستقیم ژن می‌باشند، مورد بررسی قرار می‌گیرند. پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به عنوان نشانگرهای ژنتیکی که کمتر تحت تأثیر محیط بوده و یکنواختی و تکرارپذیری بالایی دارند (Hahn & Schoberlein, 1999) تاکنون در مطالعات ژنتیکی مورد استفاده زیادی قرار گرفته‌اند. به طوری که ویژگی‌های الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر آن را به عنوان ابزاری قدرتمند در مطالعات مربوط به بررسی ارتباط و خویشاوندی ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف گیاهی تبدیل نموده است. به عبارت دیگر روش‌های مختلف الکتروفورز به ویژه الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به روش SDS-PAGE در سال‌های اخیر کاربرد زیادی در بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف زراعی، جنگلی و مرتعی داشته است (Karihaloo et al., 2002; Ladizinsky & Hamel, 1980; Masood et al., 1994; Mirzaie-Nodoushan et al., 2002; Rout & Chrungoo, 2007; Mirali et al., 2007; Shariat et al., 2002; Rafezi et al., 2009). مطالعه و تعیین خویشاوندی ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌های مختلف گیاهی (Ahmad & Slinkard, 1992; Ghaffoor et al., 2002; Panigrahi et al., 2007) بررسی روابط فیلوژنتیکی و تاکسونومیکی (Mirjalili & Mirzaie-Nodoushan, 2005; Jha & Ohri, 1996; Pena & Cassels, 2002) و حتی بررسی ساختار ژنتیکی برخی از گونه‌های جنس لولیوم و

مقاومت به چرای دام در زمره صفات مورد نظر اصلاحی گراس‌های علوفه‌ای می‌باشند. در جنس لولیوم گونه‌های مختلف دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند که در صورت تجمع این صفات در واریته‌ای از یک گونه دائمی، می‌تواند در افزایش سطح و دوره تولید مؤثر واقع شود. به همین دلیل انجام تلاقی‌های بین گونه‌ای به منظور تولید دورگ‌های بین گونه‌ای می‌تواند در رسیدن به هدف مذکور مورد استفاده قرار گیرد. آمیزش‌های بین گونه‌ای در هر دو سطح دیپلوئید و پلی‌پلوئید اهمیت دارند. به عنوان نمونه دورگ‌گیری بین گونه‌های تتراپلوئید گونه‌های *L. perenne* و *L. multiflorum* را می‌توان نام برد که توانایی مقاومت نسبی به خشکی و پنجه‌زایی یک والد را با تولید زیاد و ارزش غذایی والد دیگر ترکیب می‌نماید و یا سایر قابلیت‌های این دو گونه را در دورگ‌ها جمع می‌کند (Lewis, 1980 و Swift, 2009). دو گونه *L. rigidum* و *L. perenne* از نظر تولید علوفه و نیز مقاومت به تنش‌های محیطی با یکدیگر متفاوت عمل می‌کنند (Cheplick, 2004 و Rhodfis, 2009). از این رو، انتظار می‌رود که دورگ‌های بین این دو گونه دارای توانمندی‌های خاصی باشند که ضمن افزایش تولید بتوانند در پروژه‌های اصلاحی این گونه‌ها و جنس لولیوم مؤثر واقع شوند.

متفاوت بودن ویژگی‌های گونه‌های مختلف در جنس لولیوم این امکان را فراهم می‌سازد که با تولید دورگ‌های بین گونه‌ای صفات مطلوب هر دو گونه را در واریته‌ای از یک گونه از این جنس وارد نموده و در نتیجه ترکیبی از صفات مطلوب را بدست آورد. همین‌طور از دورگ‌های حاصل از تلاقی‌های بین گونه‌ای برای تولید جامعه‌های گیاهی با اساس ژنتیکی گسترده به منظور رسیدن به

انجمن بین‌المللی آزمون بذر (ISTA, 1996) نیز از SDS-PAGE برای تشخیص ارقام مختلف لولیوم از یکدیگر استفاده می‌کند.

مواد و روشها مواد گیاهی

تلاقی بین‌گونه‌ای توسط Mirzaie-Nodoushan (۲۰۰۲) انجام شده و به روش نجات جنین دورگ بین‌گونه‌های *L. rigidum* و *L. perenne* تولید گردید. در مقایسه با والدین مادری و پدری و از نظر ویژگی‌های مورفولوژیک، رفتارهای بینابینی در بوته‌های کامل دورگ مشاهده گردید ولی در برخی موارد نتاج، از والد مادری به خوبی قابل تشخیص و تفکیک نبودند. از این رو برای بررسی و تأیید دورگ بودن نتاج، چهار ژنوتیپ دورگ حاصل از این تلاقی‌ها به همراه والدین خود در این تحقیق از نظر پروفیل باندهای پروتئینی و با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر بررسی و مقایسه شدند تا ضمن تأیید دورگ بودن نتاج، تنوع موجود بین آنها نیز بررسی شود. این مطالعات با استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و اجرای آنها بر روی ژل آکریل‌آمید و بررسی باندهای پروتئینی و مقایسه آنها با یکدیگر انجام شد.

استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و انجام الکتروفورز
برای استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ۰/۶ گرم از بذر هر نمونه را در هاون و به کمک ازت مایع ابتدا به پودر تبدیل نموده و بعد در مجاورت بافر استخراج (گلیسین، ۰/۴ مولار، تریس ۴۶۰ میلی‌مولار و اسیدپت ۸/۳) به خوبی خرد شدند. مخلوط حاصل به مدت

سایر گونه‌های گیاهی به مفهوم ارزیابی اجزاء واریانس ژنتیکی (Warren *et al.*, 1998) از جمله آنهاست. به‌ویژه از SDS-PAGE به‌عنوان ابزاری توانمند در تشخیص و تمایز گونه‌ها و حتی ارقام مختلف لولیوم معرفی شده است (Bravi *et al.*, 1994; Moller & Spoor, 1993; Dinelli & Lucchese, 1999). همچنین از الکتروفورز برای ارزیابی اثرهای تنش‌های محیطی نظیر خشکی و شوری بر کم و کیف پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و گیاه، استفاده قابل توجهی شده است (Yen *et al.*, 1997; Leymarie *et al.*, 1996; Saitou *et al.*, 1994). تحقیقات داخلی نیز از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره بذر در مطالعات تاکسونومیک و تفکیک گونه‌های مختلف لولیوم استفاده شده است (Mirjalili & Mirzaie-Nodoushan, 2005). در تحقیق مذکور، محققان نامبرده موفق شدند با استفاده از داده‌های حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، گونه‌های خودگشن جنس لولیوم را از گونه‌های دگرگشن تفکیک نمایند. یکی از مطالعاتی که از این روش در تفکیک ژنوتیپ‌ها، ارقام و گونه‌های مختلف لولیوم استفاده کرده، مطالعاتی است که توسط Dinelli و Lucchese (۱۹۹۹) انجام شده است. نامبردگان از دو روش الکتروفورز (SDS-PAGE و SDS-CGE) برای تفکیک ارقامی از سه گونه *L. multiflorum*، *L. rigidum* و *L. perenne* استفاده کردند و کارایی بسیار خوبی را در هر دو روش گزارش نمودند. اگرچه تنها وجه تمایز دو روش الکتروفورز مورد مقایسه عدم همبستگی بین پروفیل تولیدی دو روش مورد استفاده آنهاست ولی به دلیل مزایای این دو روش، استفاده از آنها به‌ویژه روش SDS-PAGE در تفکیک و تشخیص ارقام و ژنوتیپ‌های گونه‌های مختلف لولیوم توصیه گردید. به‌طوری که

آب مقطر) قرار داده شد تا فضای بین باندها بی‌رنگ شود. در ادامه، ژل در آب مقطر نگهداری گردید تا زمانی که از نظر باندهای پروتئینی مورد مطالعه قرار گیرد. بنابراین به منظور اطمینان از تکرارپذیر بودن پروفیل حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، انجام الکتروفورز ۳ بار تکرار گردید.

کمی کردن مشاهدات و باندهای پروتئینی

از آنجا که باندهای پروتئینی و تنوع آنها مبنای مقایسه دورگ‌ها و والدین آنها در این مطالعه بود، حضور یا عدم حضور باندها بر روی ژل باید به نوعی کمی می‌شد. از این رو، کلیه باندها از مبدأ ژل، در هر یک از ردیف‌ها شناسایی شده و حضور یا عدم حضور آنها در هر یک از ردیف‌های مربوط به والدین و دورگ‌ها با اعداد یک (حضور) و صفر (عدم حضور) مشخص گردید. به این ترتیب یک ماتریس عددی حاصل گردید که به تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (۶ ژنوتیپ) ستون و به تعداد مقرهای باندها مشاهده شده سطر داشت. این ماتریس اعداد (جدول ۱) در ادامه مطالعات مبنای تجزیه و تحلیل و مقایسه ژنوتیپ‌ها قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

ماتریس عددی حاصل از حضور یا عدم حضور باندهای پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار JMP مورد تجزیه خوشه‌ای به روش Ward قرار گرفته و ماتریس ضریب تشابه جاکارد محاسبه گردید به طوری که با استفاده از آن، توسط همان نرم‌افزار، دندروگرام برای دسته‌بندی و سنجش میزان شباهت نتاج و والدین با یکدیگر تولید (شکل ۲) و مورد استفاده قرار گرفت.

۷ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول روئی جدا شده و برای بار دوم سانتریفیوژ گردید. در زمان بارگیری پروتئین‌ها بر روی ژل آکریل آمید، ۲۰ میکرولیتر از پروتئین استخراج شده با ۲۰ میکرولیتر بافر نمونه (تریس-اسید ۷۷ میلی‌مولار، $\text{pH} = 6/8$ ، سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۰/۴٪، مرکاپتواتانول ۰/۱۰٪، گلیسرول ۲۰٪ و بروموفنل بلو ۰/۰۱٪) مخلوط و به مدت ۴ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفته و آماده بارگیری گردیدند.

از سیستم بافری ناپیوسته با ژل آکریل آمید استفاده گردید. به این ترتیب که ابتدا ژل زیرین (آکریل آمید ۱۲٪، بیس آکریل آمید ۰/۲٪، تریس ۰/۳۷۵ مولار با $\text{pH} = 8/8$) و بعد ژل بالایی (آکریل آمید ۰/۴٪، تریس ۰/۱۲۵ مولار با $\text{pH} = 6/8$) در دستگاه پلیمریزه گردیدند. بافر الکتروود نیز براساس تریس گلايسين ۲۵ میلی‌مولار به همراه SDS ۰/۱٪ با $\text{pH} = 8/3$ تهیه گردید.

در زمان بارگیری، از هر نمونه ۲۰ میکرولیتر در درون هر چاهک ژل تزریق گردید. نمونه‌ها با شدت جریان متوسط ۶۰ میلی‌آمپر الکتروفورز شدند و تا زمانی که شاخص رنگی (بروموفنل بلو) به انتهای ژل زیرین رسید الکتروفورز ادامه یافت. در ادامه کار، ژل از دستگاه خارج شده و به مدت نیم ساعت در محلول تثبیت (TCA، Trichloroacetic acid، ۲۰٪) قرار داده شد و بعد با آب مقطر شستشو داده شده و به مدت یک شب در دمای محیط در محلول رنگ کماسی بلو (۰/۱۵٪ رنگ خالص کماسی بلو، ۳۵ میلی‌لیتر متانول، ۷/۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۵۷/۵ آب مقطر) رنگ‌آمیزی گردید. در ادامه، برای حذف رنگ فضای بین باندها، ژل در محلول رنگ‌بر (۳۵٪ اتانول، ۷/۵٪ اسید استیک و ۵۷/۵٪

جدول ۱: مقادیر صفر و یک حاصل از حضور یا عدم حضور باندهای مختلف موجود در نقشه پروتئینی حاصل از SDS – PAGE برای دو گونه لولیوم و چهار دورگ مورد مطالعه

شماره باند	P ₁	R ₄	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۴	۱	۰	۰	۰	۱	۱
۵	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۸	۰	۰	۱	۱	۱	۱
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱
۱۲	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۱۳	۰	۰	۱	۱	۱	۱
۱۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۵	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۱۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۷	۱	۰	۱	۱	۱	۱
۱۸	۰	۰	۱	۱	۱	۱
۱۹	۰	۱	۱	۰	۱	۱
۲۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱

P1: *L. perenne* R4: *L. rigidum* L1 – L4: چهار نمونه از نتاج دورگ

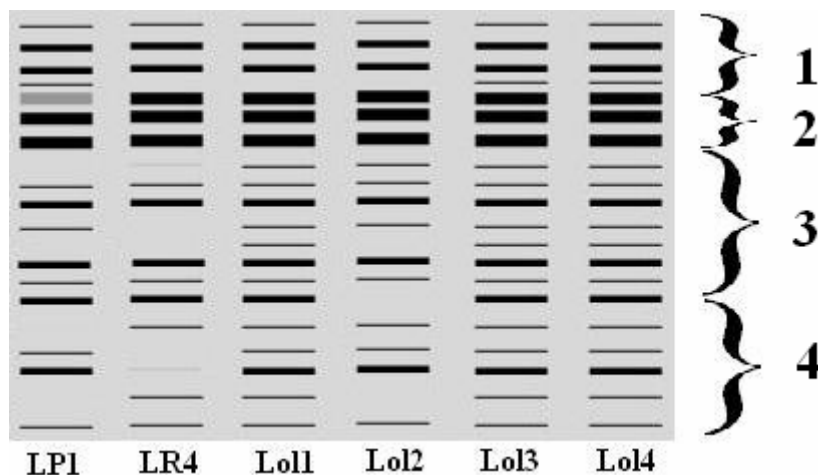
نتایج

مشاهده گردید. این تعداد باند در دامنه‌ای از حداقل ۱۴ باند در یکی از والدین با کد LR4 و حداکثر ۲۰ باند در دو ژنوتیپ از دورگ‌های بین‌گونه‌ای با کدهای Lol3 و Lol4 متغیر بود. در بین باندهای مشاهده شده باندهای شماره ۸، ۱۳ و ۱۸ در هیچ‌یک از والدین مشاهده نگردید. همین‌طور گونه‌های والدینی از نظر باندهای شماره ۴، ۵، ۱۱، ۱۷ و ۱۹ با یکدیگر تفاوت داشتند. به عبارتی، این باندها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای ملکولی و ابزاری

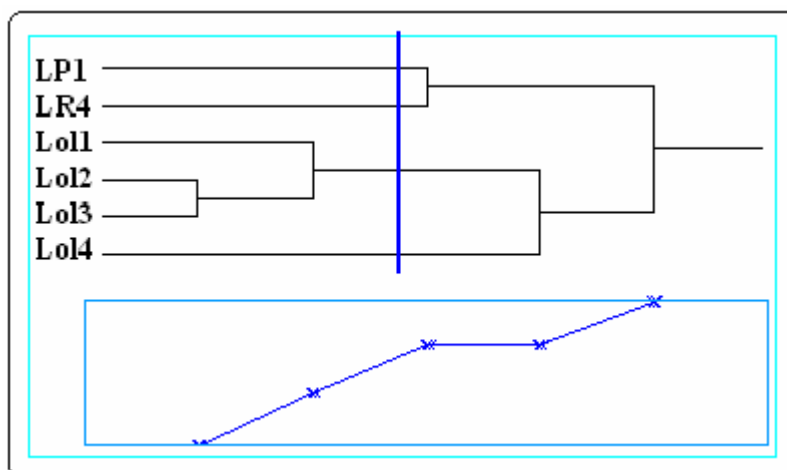
پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر دو گونه از لولیوم و نتاج حاصل از تلاقی بین آنها که به روش SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفتند، پروفیل پایدار و تکرارپذیری را تولید کردند که می‌توان به شرح زیر آنها را توصیف نمود. در مجموع ۲۰ باند در پروفیل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده گردید که از نظر تعداد معدودی از باندها تفاوت‌های آشکاری بین ژنوتیپ‌های والدینی و نتاج

که ژنوتیپ‌ها به چهار دسته تقسیم شوند، والد شماره ۱ (LP1) در یک دسته، والد شماره ۲ (LR4) در دسته دیگر و دورگ شماره ۲ (Lol2) از بقیه ژنوتیپ‌های دورگ جدا شده و در دسته مجزا قرار گرفتند. دورگ شماره ۲ (Lol2) کمترین فاصله را با والدین، و دورگ‌های شماره ۳ و ۴ (Lol3 و Lol4) بیشترین فاصله را با والدین نشان دادند. دورگ‌های شماره ۳ و ۴ (Lol3 و Lol4) در این دندروگرام کاملاً در کنار یکدیگر قرار گرفتند زیرا تولید باندهای پروتئینی کاملاً مشابهی نمودند. این نتیجه نشان می‌دهد که ژن‌های مسئول خصوصیات پروتئینی مورد مطالعه در این دو ژنوتیپ تفاوت چندانی ندارد.

مکمل برای شناسایی و تمایز این دو گونه از یکدیگر مورد استفاده قرار گیرند. دیاگرامی از پروفیل باندهای پروتئینی حاصل از اجرای الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گونه‌ها و دورگ‌های مورد مطالعه در شکل ۱ ارائه گردیده است. در این دیاگرام باندهای حاصل به چهار ناحیه با قابلیت تحرک متفاوت تقسیم گردیدند. همه ژنوتیپ‌ها تا اندازه‌ای دارای باندهای مشترک و اختصاصی بودند که حضور یا تراکم آنها با یکدیگر متفاوت بود. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورزی در شکل ۲ ارائه شده است. براساس این دندروگرام در صورتی که خط برش در نقطه‌ای قرار گیرد



شکل ۱: دیاگرام الگویی پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر حاصل از SDS-PAGE مشاهده شده در دورگ‌های بین‌گونه‌ای و والدین آنها در جنس لولیوم. LP1 و LR4 والدین و Lol1 تا Lol4 نتایج حاصل از تلاقی‌ها هستند



شکل ۲: دندروگرام مربوط به الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در دورگ‌های بین‌گونه‌ای و والدین آنها در جنس لولیوم

بحث

به ترتیب کاهش قابلیت تحرکشان شماره‌گذاری شدند. علاوه‌براین، حضور یا عدم حضور باندها و ضخامت و شدت رنگ‌پذیری آنها معیار مناسبی برای بررسی و مقایسه ژنوتیپ‌های مورد نظر می‌باشد. در ناحیه شماره ۱ پروتئین‌های با تحرک خیلی کم قرار گرفتند که تراکم و ضخامت باندها نیز کم است. والدین و نتاج از نظر یکی از باندهای این ناحیه با یکدیگر اختلاف نشان دادند. به‌نحوی که در ناحیه دوم که با شماره ۲ نشان داده شده است پروتئین‌های با تحرک کم قرار گرفتند که اغلب تراکم و ضخامت و رنگ‌پذیری باندها در این ناحیه خیلی زیاد است. والدین، LP1 و LR4 از نظر تراکم و رنگ‌پذیری یکی از باندهای این ناحیه با هم اختلاف داشتند. هر یک از باندهای این ناحیه ممکن است از ترکیب چند پروتئین با وزن ملکولی بالا ولی نزدیک به هم تشکیل شده باشند که موجب ضخیم شدن باندها گردیده‌اند و یا اینکه کپی‌های متفاوتی از یک ژن مربوطه فعال باشد. ناحیه شماره ۳ مشتمل بر هفت باند بود که قابلیت تحرک متوسطی داشتند. والدین از نظر سه باند در این ناحیه با یکدیگر از لحاظ حضور و عدم حضور باندها

با توجه به کارایی خوب الکتروفورز در تفکیک گونه‌ها و ارقام مختلف جنس لولیوم، (Dinelli & Lucchese, 1999) در این تحقیق از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در مقایسه ۶ ژنوتیپ از دو گونه مختلف و نتاج حاصل از تلاقی بین آنها استفاده گردید تا ضمن تأیید موفقیت‌آمیز بودن تلاقی‌های انجام شده و دورگ بودن نتاج حاصل، تفاوت‌های بین‌گونه‌ای نیز مشخص گردد.

پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ممکن است از ۲۰ یا تعداد بیشتری باندهای منفرد تشکیل شود. به‌طوری که با افزایش تعداد باندها و جمعیت‌ها یا ژنوتیپ‌های مورد مقایسه، باید دقت بررسی و تفسیر داده‌ها را افزایش داد. مزیت پروفیل پروتئین‌های بذری، ثبات آنهاست که تحت تأثیر نوسانات فصلی و محیطی و طول عمر بذر قرار نمی‌گیرند و یکنواخت و تکرارپذیر هستند (Panigrahi et al., 2007).

باندهای پروتئینی حاصل از این مطالعه به چهار ناحیه دسته‌بندی شدند که در دیاگرام ۱ با شماره‌های ۱ تا ۴

کپی از دسته‌های ژنی، نامتجانس بودن توالی‌های داخل یک گروه و یا فراورده‌های متفاوت پروتئینی اتفاق بیفتد. در این تحقیق که از دو گونه مختلف به‌عنوان والدین تلاقی‌ها استفاده شده و نتایج حاصل از دو گونه مختلف در کنار والدین مورد مقایسه الگوهای پروتئینی قرار گرفتند، هر سه عامل مذکور می‌تواند موجب تفاوت در الگو یا پروفیل پروتئینی مربوطه باشد. در مطالعه‌ای که توسط Mirjalili و Mirzaie-Nodoushan (۲۰۰۵) در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی و روابط تاکسونومیک گونه‌هایی از جنس لولیوم انجام شد نیز با استفاده از پروفیل پروتئین‌های بذری، جمعیت‌ها و گونه‌ها از هم تفکیک شدند که مؤید قابلیت مورد ادعای الکتروفورز در این تحقیق می‌باشد. دو گونه والدینی مورد مطالعه در این تحقیق هر دو دگرگشن می‌باشند و بر اساس مطالعات قبلی در تفکیک به وسیله پروفیل پروتئین‌های بذری در کنار یکدیگر قرار گرفتند (Mirjalili & Mirzaie-Nodoushan, 2005). با این حال، تفکیک آنها در این تحقیق به دلیل محدودتر بودن گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. محققان دیگری نظیر Gilliland و همکارانش (۲۰۰۰) نیز استفاده از SDS-PAGE در تشخیص ارقام و ژنوتیپ‌های یک گونه از لولیوم را مناسب و قابل استناد دانسته‌اند ولی استفاده از ایزوآنزیم‌های مستخرج از برگ گونه‌های لولیوم را به این منظور قابل ندانسته‌اند. نتایج تحقیقات مذکور نیز نتایج این تحقیق را از لحاظ قابلیت استفاده از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و SDS-PAGE در تشخیص و تمایز گونه‌ها و ارقام جنس لولیوم تأیید می‌نماید.

می‌توان گفت که به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق از نظر قابلیت تفکیک گونه‌های مختلف لولیوم و

و نیز تراکم و رنگ‌پذیری آنها با هم اختلاف نشان دادند ولی این اختلاف در بین نتایج به ۲ باند کاهش یافت. در ناحیه شماره ۴، تعداد ۶ باند که اغلب ضخامت‌های کمی داشتند و پرتحرک‌ترین پروتئین‌ها بودند قرار داشتند. در این ناحیه نیز والدین از نظر ۴ باند با یکدیگر اختلاف نشان دادند. این اختلاف در نتایج به ۲ باند کاهش یافت. به عبارت کلی تر نواحی شماره ۳ و ۴ متنوع‌ترین نواحی بودند. به‌ویژه اینکه ژنوتیپ‌ها و گونه‌های والدینی را به وسیله باندهای پروتئینی این ناحیه می‌توان به خوبی تعریف نمود. دورگ بودن نتایج حاصل از تلاقی بین گونه‌ای نیز با استفاده از باندهای این ناحیه به نحو بهتری می‌تواند تشخیص داده شود.

تفاوت‌های موجود در ضخامت و شدت نوارهای الکتروفورزی می‌تواند ناشی از تفاوت در بیان ژن‌های مربوطه در والدین و نتایج آنها باشد. نکته مهم دیگر در مورد پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر این است که در صورتی که مطالعات ژنتیکی دقیق بر روی شاهد‌ها انجام نشده باشد، تفسیر ژنتیکی نمونه‌های مختلف با اشکال مواجه می‌شود. به دلیل ماهیت چند ژنی بودن (Multigenic) پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در بسیاری از گونه‌های گیاهی، این روش برای شناسایی واریته‌هایی که تکثیرشان بصورت کلن است مناسبتر می‌باشد. گیاهان خودگشن نیز که فاقد تنوع هستند از این نظر نسبت به گیاهان دگرگشن شایستگی بیشتری نشان می‌دهند. در مورد گونه‌های خودگشن مشروط به اینکه کنترل ژنتیکی شناخته شده باشد، می‌توان داده‌های الکتروفورزی را به فراوانی‌های آللی تبدیل و مقایسات لازم را انجام داد (Blackman & Payne, 1987). نامتجانس بودن الگوهای الکتروفورزی و یا شدت باندها می‌تواند در اثر عواملی نظیر تعداد متفاوت

- Blackman, J.A. and Payne, P., 1987. Grain Quality. PP.455 – 485. In F.G.H. Lypton (ed). Wheat Breeding. Chapman and Hall, New York.
- Bravi, R., Sommovigo, A., Delogu, C. and Merisio, G., 1994. Investigation on seed species identity of *Lolium rigidum* trading in Italy. Sementi Elette, 40: 11–17.
- Cheplick, G.P., 2004. Recovery from drought stress in *Lolium perenne* (Poaceae): Are fungal endophytes detrimental? American Journal of Botany, 91:1960-1968.
- Dinelli, G. and Lucchese, C., 1999. Comparison between capillary and polyacrylamide gel electrophoresis for identification of *Lolium* species and cultivars. Electrophoresis, 20:2524-2532.
- Ghafoor, A., Ahmad, Z., Qureshi, A.S. and Bashir, M., 2002. Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE. Euphytica, 123: 367-378.
- Gilliland, T.J., Coll, R., Calsyn, E., DeLoose, M., van Eijk M.J.T. and Rold'an-Ruiz, I., 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 1. Morphology and biochemical characterization. Molecular Breeding, 6: 569–580.
- Hahn, H. and Schoberlein, W., 1999. Characterization and identification of Festulolium hybrids by electrophoresis of seed proteins. Seed Science and Technology, 27: 525-542.
- ISTA, 1996. Standard reference method for the verification of varieties of *Pisum* and *Lolium* by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). In: International rules for Seed Testing. Proceedings of the International Seed Testing Association. ISTA Secretariat Zürich, Switzerland, p. 257–262.
- Jha, S.S. and Ohri, D., 1996. Phylogenetic relationships of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (pigeon pea) and its wild relatives based on seed protein profiles. Genetic Resources and Crop Evolution, 43: 275-281.
- Karihaloo, J.L., Kaur, M. and Singh, S., 2002. Seed protein diversity in *Solanum melongena* L. and its wild and weedy relatives. Genetic Resources and Crop Evolution, 49: 533–539.
- Ladizinsky, G. and Hamel, A., 1980. Seed proteins of Pigeon pea (*Cajanus cajan*) and some *Atylosia* species. Euphytica, 29: 313-317.
- Lewis, E.J., 1980. Chromosome pairing in tetraploid hybrids between *Lolium perenne* and *L. multiflorum*. Theoretical and Applied Genetics, 58: 137-143.
- Leymarie, J., Damerval, C., Marcotte, L., Combes, V. and Vartanian, N., 1996. Two – dimensional protein patterns of *Arabidopsis* wild – type and auxin insensitive mutants, axr1, axr2, reveal interactions

بررسی خویشاوندی بین آنها در توافق کامل با بسیاری از منابع موجود در این زمینه می‌باشد. از جمله اینکه با نتایج Hahn و Schoberlein (۱۹۹۹) که نتایج حاصل از تلاقی بین فستوکا و لولیم را با استفاده از پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر از هم تفکیک نمودند، مطابقت دارد. لازم به تذکر این مطلب است که دورگ‌های بین‌گونه‌ای در تلاقی بین‌گونه‌های لولیم به سادگی و با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک از والدین قابل تشخیص نیستند (Hahn & Schoberlein, 1999). از این روش استفاده از روش SDS-PAGE تاکنون کمک شایان توجهی را به محققان در این زمینه کرده است. در این مطالعه نیز نتایج حاصل از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای شباهت‌های مورفولوژیک زیادی به والد مادری داشتند که قضاوت را مشکل می‌نمود. از این روش استفاده از پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر توانست ضمن تفکیک نتایج از والدین، تنوع قابل توجهی را بین نتایج نشان دهد.

استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای در این تحقیق ضمن بیان تنوع ژنتیکی موجود در مواد مورد مطالعه، دورگ بودن نتایج حاصل از تلاقی‌ها را نیز تأیید نمود. لازم به ذکر است در بسیاری از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای نتایج حاصل از تلاقی‌ها دورگ نیستند و از آلودگی‌های احتمالی و تلاقی پایه مادری با گرده همان پایه یا پایه‌های دیگری از همان گونه حاصل می‌شوند. به طوری که مقایسه باندهای پروتئینی حاصل از نتایج والدین می‌تواند این شبهه را برطرف نماید.

منابع مورد استفاده

- Ahmad, F. and Slinkard, A.E., 1992. Genetic relationships in the genus *Cicer* L. as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins. Theoretical and Applied Genetics, 84: 688-692.

- Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16: 247-253.
- Rhodfis, I., 2009. The growth and development of some grass species under competitive stress. Grass and Forage Science, 32:330-335.
 - Rout, A. and Chrungoo, N.K., 2007, Genetic variation and species relationships in Himalayan buckwheats as revealed by SDS-PAGE of endosperm proteins extracted from single seeds and RAPD based DNA fingerprints. Genetic Resources and Crop Evolution, 54: 767-777.
 - Saitou, K., Agata, W., Masui, Y., Asakura, M. and Kubota, F., 1994. Isoforms of NADP-malic enzyme from *Mesembryanthemum crystallinum* L. that are involved in C3 photosynthesis and Crassulacean acid metabolism. Plant and Cell Physiology, 35: 1165-1171.
 - Shariat, A., Mirzaie-Nodoushan, H., Ghamari-Zare, A. and Sangtarash, H., 2002. Electrophoresis of seed storage proteins in several medic species. Iranian journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 8: 67-80.
 - Swift, G., 2009. A comparison of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*), hybrid ryegrass (*Lolium perenne* x *L. multiflorum*) and timothy (*Phleum pratense*) under different systems of management. Grass and Forage Science, 32: 205-211.
 - Warren, J.M., Raybould, A.F., Ball, T. Gray, A.J. and Hayward, M.D., 1998. Genetic structure in the perennial grasses *Lolium perenne* and *Agrostis curtisii*. Heredity, 81: 556-562.
 - Yen, H.E., Zhang, D., Lin, J.H., Edwards, G.E. and Ku, M.S.B., 1997. Salt - induced changes in protein composition in light - grown callus of *Mesembryanthemum crystallinum*. Physiologia Plantarum, 101: 526-532
 - between drought and hormonal responses. Plant and Cell Physiology, 37: 966-975.
 - Masood, M.S., Oikuno K. and Anwar, R., 1994. Inter and Intra - specific variation in SDS - PAGE electrophoregrams of total seed protein in wheat, barley, and their wild relatives. In: A.A. Jaradat, Genetic resources of cereals and their utilization in Pakistan, Proceeding of a National Seminar, Islamabad, 125 - 135.
 - Mirali, N., El-khouri, S. and Rizq, F., 2007. Genetic diversity and relationships in some *Vicia* species as determined by SDS-PAGE of seed proteins. Biologia Plantarum, 51: 660-666.
 - Mirjalili, S.A. and Mirzaie-Nodoushan, H., 2005. Investigation of genetic variation and taxonomic relationships of *Lolium* species using seed storage proteins. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 13: 257-270
 - Mirzaie-Nodoushan, H., 2002. Interspecific crosses in *Lolium* species. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 9: 39-48.
 - Mirzaie-Nodoushan, H., Shariat, A. and Asadigorom, F., 2002. Evaluation of existing genetic variation in different populations of *Haloxylon* spp. Using electrophoresis technique. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 7: 99-117.
 - Moller, M. and Spoor, W., 1993. Discrimination and identification of *Lolium* species and cultivars by rapid SDS-PAGE of seed storage proteins. Seed Science and Technology, 21: 213-223.
 - Panigrahi, J., Kumar, D.R., Mishra, M., Mishra, R.P. and Jena, P., 2007. Genomic relationships among 11 species in the genus *Cajanus* as revealed by seed protein (albumin and globulin) polymorphisms. Plant Biotechnology, 1: 109-116.
 - Pena, R., and Cassels, B., 2002. Phylogenetic relationships among Chilean *Sophora* species. Biochemical Systematics and Ecology, 24: 725-733.
 - Rafezi, A., Farshadfar, M. and Farshadfar, E., 2009. Investigation of inter-specific variation in *Agropyron elongatum* L. using biochemical (proteins) marker. Iranian Journal of Rangelands and

Comparing *Lolium* inter-specific hybrids and their parents using seed storage proteins electrophoresis

S.A. Hosseinizadeh¹, H. Mirzaie-Nodoushan^{*2} and Sh. Mehrpour³

1- M.Sc. in plant breeding, Payam Noor University, Yazd, I.R.Iran.

2* - Corresponding author, Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R.Iran.

E-Mail: nodoushan2003@yahoo.com

3 – Assis. Prof., Islamic Azad University, Ghom, I.R.Iran.

Received: 20.04.2009

Accepted: 22.11.2009

Abstract

Inter-specific hybrids of *Lolium* with various capabilities provide possibilities to integrate suitable characteristics into a cultivated variety of the genus. Baring this objective in mind, inter-specific hybrids had been produced which are investigated in this research. Four genotypes of the inter-specific hybrids between *Lolium perenne* and *L. rigidum*, and their parents were investigated for their protein profiles using seed storage protein electrophoresis. They were compared to make sure their hybrid originality as well as investigating their similarity to their parents. SDS-PAGE method of electrophoresis was used to provide the profile of the seed storage proteins. Presence or absence of the protein bands in the profile column of the genotypes were scored as one and zero respectively. The provided data were analyzed by cluster analysis. A dendrogram produced by the analysis, was used along with the proteins profile for classifying and estimating the hybrids and their parents similarities. Twenty protein bands were observed in the profile of the studied genotypes in which there were differences between the hybrids and their parents based on limited number of the bands. There were also differences on thickness and stain intensity of the protein bands of the studied genotypes, which might be due to differences in gene expression of parents and progenies. On the whole the profile revealed remarkable differences between the parents and progenies as well as approving the hybrid origins of the progeny genotypes.

Key words: *Lolium*, Electrophoresis, Interspecific hybrids, Cluster analysis.