مطالعه الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای در گونه‌هایی از یونجه یکساله

آنامیتا شریعت[1]، حسین میرزایی ندوشن[1]، عباس قمری زارع[1]
و محمد حسین سنگتراش[2]

چکیده

این تحقیق به منظور مطالعه قرابت ژنتیکی میان جمعیتها و گونه‌هایی از یونجه یکساله بر اساس مطالعات الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر انجام شد. به این منظور بذرهای ۱۲ جمعیت از هشت گونه یونجه یکساله از بانک ژن مجتمع تحقیقاتی البرز تهیه شد. الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به روش SDS- PAGE در ۵ تکرار انجام شد. در ابتدا بهینه سازی روش الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در جنس مدیکاگو با استفاده از دو غلظت عصاره پروتئین بذر و دو غلظت ژل جداکننده زیرین انجام گرفت. بهترین نتیجه زمانی بدست آمد که از غلظت بالای ژل جداکننده و از غلظت پایین عصاره بذر استفاده شد. بعد از روی بهترین ژل فاصله نوارها از مبداء بر حسب میلیمتر اندازه‌گیری شد و وجود یا عدم وجود نوارهای مشترک در تمامی جمعیتها مشخص گردید. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای جمعیتهای مورد نظر دسته بندی شده و میزان قرابت ژنتیکی میان آنها بررسی شد.

واژه‌های کلیدی: یونجه‌های یکساله، قرابت ژنتیکی، الکتروفورز، تجزیه خوشه‌ای

---

۱ - مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵
۲ - دانشگاه سیستان و بلوچستان

مقدمه و کلیات

الکتروفورز الگویی تجزیه‌ای است که به کرات در زیست شناسی مولکولی و پزشکی استفاده شده است. این روش برای جداسازی و تمایز پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، ذراتی با اندازه‌های کوچکتر از سلول از جمله ویروسها و اندامکها در یک میدان الکتریکی بکار می‌رود که ذرات بر حسب بار الکتریکی، وزن مولکولی و یا شکل فضائی خود به طرف آند یا کاتد حرکت می‌کنندو از همدیگر جدا می‌شوند(Gombocz ۱۹۹۵). حداقل صد سال است که الکتروفورز با استفاده از ژلهای آگار و ژلاتین شناخته شده است. بزرگترین پیشرفت در ژل الکتروفورز سی سال قبل اتفاق افتاد و آن زمانی بود که پروتئین‌ها در درون ژل اکریل آمید و با استفاده از اوره و یک پاک کننده مانند سدیم دودسیل سولفات (SDS) تفکیک بالایی را نشان دادند. هر مولکول SDS هم قطبی (بار منفی سولفات) و هم غیر قطبی (هیدروکربن) است و در نتیجه می‌تواند با اکثر پروتئین‌ها تشکیل باند دهد. در چنین شرایطی بار خالص پلی‌پپتید در مقایسه با بار منفی ناشی از باند SDS ناچیز می‌شود. در نتیجه کمپلکس پروتئین-SDS نمی‌تواند تجزیه شود و تنها بر اساس تفاوت در اندازه‌هایشان به نقاط مختلف ژل پلی اکریل آمید مهاجرت می‌کنند. بعد از تفکیک، پروتئین‌ها و پپتیدها در درون ژل توسط ماده تثبیت کننده، تثبیت شده و به وسیله رنگ کماسی بلو که در محلول متانل و اسید استیک حل شده است، رنگ آمیزی می‌شوند. بعد ژل را شسته و رنگبری نموده و نوارها را مورد مطالعه قرار می‌دهند. الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید SDS از این نظر مفید است که از طریق تحرک پروتئین‌ها می‌توان وزن مولکولی آنها را به طور تقریبی محاسبه نمود.

اکثر سیستم‌های ژل پلی اکریل آمید SDS دارای قدرت کافی برای جداسازی پلی‌پپتیدها با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰۰ نیستند. تفکیک چنین مولکولهایی در حضور SDS هنگامی که نسبت بالایی از بیس اکریل آمید همراه با اکریل آمید و همچنین غلظت بالای اوره ۸M استفاده می‌شود، انجام پذیر است. در مورد مولکولهایی

که دارای وزن مولکولی کمتر از ۳۰۰۰ هستند انحراف زیادی از رابطه خطی بین لگاریتم وزن مولکولی الیگوپپتیدها و تحرک آنها مشاهده شده است ، به این دلیل که بار خالص و ساختار تحرکی در وزن مولکولی کم، دارای اهمیت بیشتری هستند. در نتیجه می‌توان انتظار انحراف از رابطه خطی را داشت (Camilleri، ۱۹۹۸).

یکی از کاربردهای الکتروفورز ژل اکریل آمید در مطالعات پروتئومی (Proteomics) است. پروتئین‌های مکمل ژنوم را پروتئوم می‌گویند. مطالعه وسیع پروتئین‌ها بر اساس توانائی تشکیل پروفیل نسبی و همچنین مطالعه تغییرات پروتئین‌ها تحت تأثیر تغییرات تکاملی و در پاسخ به محرکهای محیطی را مطالعات پروتئومی می‌گویند. به منظور تهیه پروفیل، از ژلهای اکریل آمید تک بعدی و دو بعدی استفاده می‌شود (Blacstock و Weir ۱۹۹۹). تکنولوژی دوبعدی به طور معمول قادر به تجزیه ۲۰۰۰ پروتئین است (Klose و Kobalz ، ۱۹۹۵). اخیراً از ژلهای دو بعدی در مطالعات پروتئومی و ژنتیکی سیستم‌های گیاهی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی موتانت‌ها و مقاومت در برابر خشکی استفاده شده است.

در گونه *Medicago truncatula* از یونجه‌های یکساله به منظور مطالعات پروتئومی از ژلهای دوبعدی و پروتئین‌های ریشه، برگ و ساقه استفاده شده است. Mussa و همکاران (۲۰۰۰) از ریشه‌های *M. truncatula* در حین آلودگی میکوریزایی به منظور روشن ساختن تفاوت در تظاهر پروتئین در پاسخ به رشد میکوریزا استفاده کردند و امیدوارند که ژنهائی با اثرات افزایشی را که منجربه رشد میکوریزا هستند کشف کنند.

ولیزاده (۱۳۷۶) پروتئین‌های محلول در نمک و محلول در الکل بذر، برگ و کلروپلاست ۹ گونه یونجه را با استفاده از الکتروفورز جدا و مورد مطالعه قرار داد و در مجموع ۶۸ نوار مشاهده و از آنها برای برآورد فاصله ژنتیکی گونه‌های یونجه استفاده نمود و نتیجه گرفت که فاصله ژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه کمتر از شباهت ژنتیکی

آنها است. تجزیه خوشه‌ای نیز ۹ گونه را به ۴ گروه تقسیم نمود. این نتایج با طبقه بندی کلاسیک جنس مدیکاگو تفاوت‌هایی نشان داد.

از الکتروفورز برای دسته بندی ریزوبیومهای گونه‌های مختلف جنس مدیکاگو استفاده شده است. به این منظور مجموعه‌ای که شامل ۲۵۰ نژاد مختلف از *Rizobium meliloti* بود از گونه‌های مدیکاگو از همه نقاط جهان جمع آوری شد و به ۵۰ نژاد الکتروفورزی متفاوت گروه بندی گردید (Eardly و همکاران، ۱۹۹۰).

Ahmed (۱۹۹۴) از تکنیک الکتروفورزی ژل پلی اکریل آمید SDS برای بررسی هفت گونه از جنس مدیکاگو استفاده کرد و نتایج حاصل را با استفاده از تجزیه خوشه‌ای تحلیل نمود. او نشان داد که الکتروفورز روشی موثر برای ارزیابی روابط فنوتیپی در بین رده‌های انتخاب شده است و این تکنیک باید به طور وسیعی در مطالعات تاکسونومی جنسها و نیز ارزیابی تنوع بین گونه‌ها و درون گونه‌ها بکار برده شود.

در گندم از الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای گلیادین، برای تمایز نانهایی که از گندم دوروم و نانهایی که از ژنوتیپهای گندم نان بدست می‌آید، استفاده و نشان داده شده است که گندم نان برتری انتخاب بالایی را نسبت به گندم دوروم دارد (Spagnoletti-Zeuli و همکاران، ۱۹۹۵). در مطالعه دیگری به منظور تعیین ساختمان ژنتیکی نمونه‌های گندم موجود در مجموعه ژرم پلاسم، از طریق مطالعه اثر سن دانه و دماهای قبل از جوانه زنی، الگوهای الکتروفورزی گلیادین در گندم دوروم بررسی شد. دانه‌هایی که به طور طبیعی یا مصنوعی پیر شده بودند از نظر الگوی گلیادین تفاوتی با دانه‌های تازه برداشت شده نداشتند. همچنین دماهای مختلف قبل از جوانه زنی بذرها، نتوانستند تغییرات معنی‌داری را در الگوهای الکتروفورزی ایجاد کنند. (Sergio و همکاران، ۱۹۹۲).

در مطالعه دیگری به منظور مقایسه تنوع ژنتیکی گونه‌های چوبی و ارتباط بین سطوح و پراکنش تنوع ژنتیکی این گونه‌ها با تاریخ و صفات اکولوژیکی، از داده‌های الکتروفورزی استفاده شد. داده‌ها از ۳۲۲ رده چوبی به منظور اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و درون جمعیتها و بین گونه‌ها و جمعیتها استفاده شد. گونه‌های چوبی با دامنه جغرافیایی وسیع و سیستم تلاقی دگرگشن و پخش دانه‌ها به وسیله باد یا حیوانات دارای تنوع ژنتیکی زیادی در داخل گونه‌ها و جمعیتها هستند. نتایج نشان داد که تاریخ تکاملی هر یک از گونه‌ها، نقش مهمی را در تعیین سطوح پراکنش تنوع ژنتیکی بازی می‌کند (Hamrick و همکاران، ۱۹۹۲).

الکتروفورز مویی[1] به عنوان یک وسیله تحلیلی[2] در حدود ۱۵ سال است که معرفی شده است و همانند الکتروفورز متعارف نیست. الکتروفورز مویی برای جداسازی طیف وسیعی از اندازه‌های مختلف با بارهای الکتریکی متفاوت مولکولهای ساده، یونهای آلی و غیر آلی، پپتیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدراتها و اسیدهای نوکلئیک بکار می‌رود. در بعضی موارد این روش برای جداسازی ترکیبهای ساختمانی متنوع به وسیله انجام الکتروفورزهای متوالی در شرایط بافری مختلف و ترکیبهایی با pH های متفاوت انجام می‌شود. سه روش متفاوت الکتروفورز مویی برای پروتئین‌ها و پپتیدها بکار برده شده است که شامل:

۱) الکتروفورز مویی در محلول آزاد FSCE (Free Solution Capillary Gel Electrophoresis).

۲) الکتروفورز ژل مویی CGE (Capillary Gel Electrophoresis).

۳) CIEF (Capillary Isoelectric Focusing).

---

[1] - Capillary Electriphoresis

[2] - Analytical tool

هر یک از این روشها دارای بحث گسترده‌ای است و کاربردهای متفاوتی دارد (Camilleri، ۱۹۹۸). شریعت (۱۳۸۰) قرابت جمعیتهای این تحقیق را بر اساس صفات مورفولوژیک و صفات کاریوتیپی و با استفاده از روشهای مختلف آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار داد.

مواد و روشها

بذر ۱۲ جمعیت از گونه‌های مختلف یونجه یکساله از بانک ژن مجتمع تحقیقاتی البرز جهت مطالعات الکتروفورزی تهیه گردید. جدول شماره ۱ فهرست جمعیتهای مورد استفاده را نشان می‌دهد. الکتروفورز پروتئین‌های بذر به روش SDS-PAGE انجام شد. دستورالعمل تهیه محلولهای مورد نیاز و نصب و راه اندازی دستگاه الکتروفورز بر اساس روش میرزایی ندوشن و همکاران (۱۳۸۰) تهیه گردید. به منظور بهینه سازی دستوالعمل الکتروفورز پروتئین‌های بذر در جنس مدیکاگو از دو غلظت عصاره بذر استفاده شد، به این ترتیب که یکی از عصاره‌ها با ۰/۱ گرم بذر و دیگری با ۰/۳ گرم بذر در یک حجم ثابت بافر نمونه تهیه شد. همچنین از دو غلظت ژل جداکننده استفاده شد به طوری که در غلظت اول طبق روش پیشنهادی میرزائی ندوشن و همکاران (۱۳۸۰) از ۴۰ گرم اکریل آمید و بار دوم از ۲۰ گرم اکریل آمید جهت تهیه ژل جداکننده استفاده گردید. این آزمایش در ۵ تکرار انجام و بعد از تهیه هر ژل رنگ آمیزی انجام شد و بعد از عملیات رنگبری نوارها بررسی و اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری بر اساس فاصله هر باند از ابتدای ژل جداکننده بر حسب میلیمتر بود و در هر یک از جمعیتها تمامی باندها اندازه‌گیری شدند و بعد در درون یک جدول وجود یا عدم وجود باند در کلیه جمعیتها با کدهای صفر و یک مشخص گردید. از نرم افزار MSTATC جهت ورود داده‌ها به رایانه استفاده شد. در ادامه با استفاده از نرم افزار

SAS تجزیه خوشه‌ای انجام شد و جمعیتها بر اساس قرابت و دوری و نزدیکی در دسته‌هایی گروه‌بندی شدند.

نتایج و بحث

در مجموع در میان ۱۲ جمعیت مورد بررسی ۳۷ باند مشاهده گردید. نامگذاری باندهای پروتئینی به این صورت بود که باند شماره ۱ در بالای ژل (انتهای کاتدی) و باند شماره ۳۷ در پایین ژل (انتهای آندی) قرار داشت. تعداد باندهای موجود در هر گونه متفاوت بود و هر گونه دارای باندهای مشترک و اختصاصی بود که از نظر تراکم با هم تفاوت داشتند. آزمایش در ۵ تکرار انجام گردید و همه نتایج مؤید یکدیگر هستند. لذا تصاویر دو تکرار در اشکال شماره ۱ و ۲ ارائه گردیده است. هنگامی که ژل جداکننده از ۲۰ گرم اکریل آمید ساخته شد، با استفاده ازدو عصاره رقیق و غلیظ هیچ باندی مشاهده نگردید. ولی هنگامی که ژل جداکننده با ۴۰ گرم اکریل آمید ساخته شد باندها تشکیل شدند. در شکل شماره ۱ عصاره پروتئینی مورد استفاده از ۰/۳ گرم بذر استخراج شد در حالی که در شکل شماره ۲ عصاره پروتئینی از ۰/۱ گرم بذر با مقدار ثابت بافر استخراج شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود، هنگامی که عصاره پروتئینی رقیق‌تر میباشد تفکیک باندها بهتر انجام گرفته است و باندها وضوح بهتری دارند.

به منظور مشخص کردن میزان تشابه یا فاصله ژنتیکی از نظر پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت. با توجه به اینکه هر یک از پروتئین‌ها بیانگر یک صفت در گیاه هستند در نتیجه اختلاف در باندهای پروتئینی مشخص کننده اختلافات در صفات مختلف جمعیتهای مورد نظر می‌باشد. در خصوص وضعیت باندها نسبت به یکدیگر در گونه‌های مختلف، اختلافات به وضوح دیده می‌شود. به طور مثال جمعیت *M. scutellata* (G_{12}) و جمعیت *M. minima* (G_8) هر کدام دارای یک باند اختصاصی و پهن می‌باشند که در هیچکدام از گونه‌های دیگر مشاهده نمی‌شوند. ولی

تفاوت ظاهری در باندهای داخل هر جمعیت بسیار جزئی می‌باشد. به طور مثال جمعیتهای *M. polymorpha* (G_1) تا (G_3) دارای باندهای بسیار مشابه هستند. از نظر تعداد باندها، بیشترین تعداد باند مربوط به *M. minima* (G_8) و *M. truncatula* (G_{11}) که به ترتیب دارای ۱۹ و ۲۰ باند بودند. کمترین تعداد باند مربوط به جمعیت *M. orbicularis* نمونه بهبهان (G_7) است که دارای ۱۰ باند می‌باشد.

تجزیه خوشه‌ای صفات مورفولوژیک در شکل ۳ ارائه گردیده است. مطابق این شکل و با توجه به خط برش ، جمعیتهای *M. polymorpha* (G_1 و G_2 وG_3) و *M. radiata* (G_4) در یک دسته، جمعیتهای *M. orbicularis* (G_6) و (G_7) نیز در یک دسته قرار گرفتند. همچنین جمعیتهای *M. truncatula* (G_{11}) و *M. scutellata* (G_{12}) در یک گروه و جمعیتهای *M. rigidula* (G_{10}) و *M. radiata* نمونه آذربایجان غربی (G_5) در یک گروه مجزا قرار گرفتند. بر اساس مطالعات کاریوتیپی انجام شده روی این جمعیتها (شریعت، ۱۳۸۰) دو گونه *M. rigidula* (G_{10}) و *M. radiata* نمونه آذربایجان غربی (G_5) از نظر تعداد کروموزومهای پایه با یکدیگر تفاوت دارند. به این ترتیب که *M. rigidula* دارای ۲n=۱۶ کروموزوم و *M. radiata* نمونه آذربایجان غربی دارای ۲n=۱۴ کروموزوم می‌باشد. نزدیکی این دو جمعیت از دو گونه مختلف بیانگر این واقعیت می‌باشد که اگرچه تعداد کروموزومهای پایه در این دو گونه متفاوت است ولی ژنهای عامل خصوصیات پروتئینی مطالعه شده در دو جمعیت تفاوت چندانی نکرده‌اند، به عبارت دیگر این دو گونه از نظر ساختار ژنتیکی و فرایندهائی که به سنتز پروتئین‌های مختلف منجر می‌گردند، مشابه عمل می‌کنند.

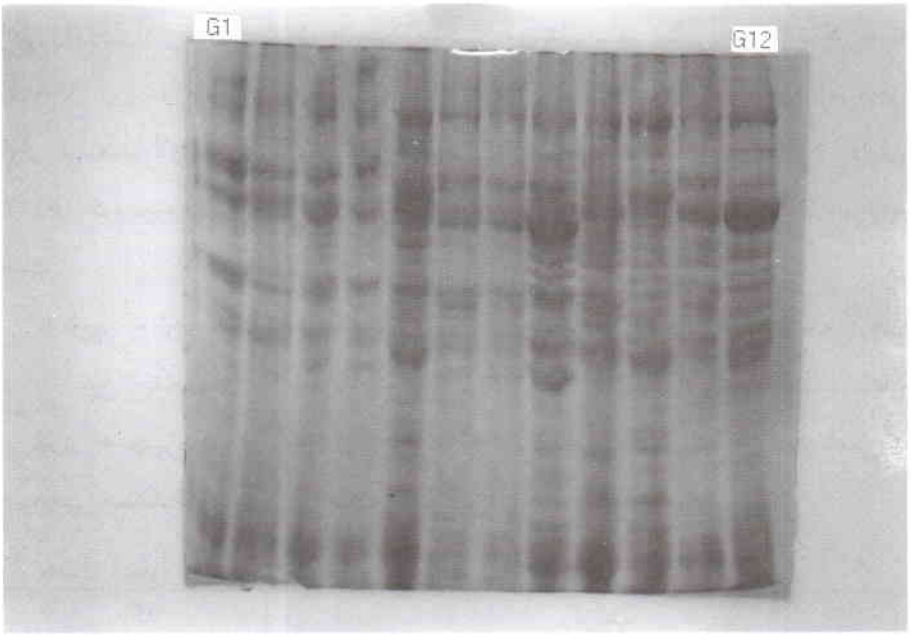
با مقایسه فنوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ملاحظه می‌شود که دو جمعیت *M. radiata* نمونه آذربایجان غربی و *M. radiata 29* با اینکه جمعیتهائی از یک گونه هستند، ولی در دسته‌های مجزا از یکدیگر قرار گرفته‌اند در نتیجه از نظر صفات

الکتروفورزی این دو جمعیت قرابت ژنتیکی کمی دارند. بر اساس مطالعات شریعت (۱۳۸۰) این دو جمعیت از نظر صفات مورفولوژیک و کاریوتیپی در دسته‌های مجزا قرار گرفته‌اند. لازم به ذکر است که جمعیت *M. radiata* نمونه آذربایجان غربی دارای ۲n=۱۴ کروموزوم در حالی که جمعیت *M. radiata 29* دارای ۲n=۱۶ کروموزوم است.

با توجه به تجزیه خوشه‌ای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که در بین جمعیتهای یک گونه تنوع کمتری نسبت به گونه‌های مختلف مشاهده می‌شود. همچنین هر یک از گونه‌های یونجه یکساله دارای باندهای اختصاصی و مشخصی هستند که می‌توان از آنها در شناسایی گونه‌ها استفاده نمود.

جدول شماره ۱ : اسامی و شماره ثبت جمعیتها و گونه‌های مورد مطالعه.

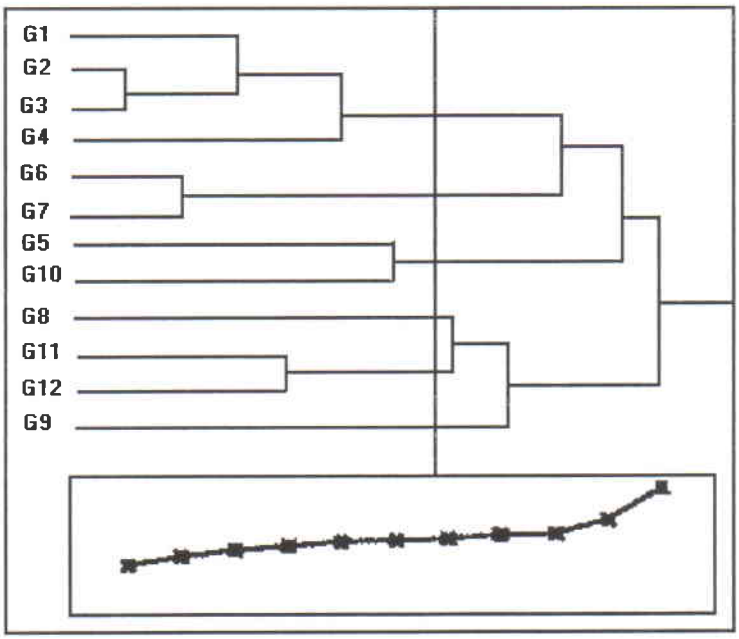
کد	ژنوتیپ
G1	*Medicago polymorpha* نمونه گرگان
G2	*Medicago polymorpha* نمونه اهواز
G3	*Medicago polymorpha* نمونه خاش
G4	*Medicago radiata* نمونه شماره ۲۹
G5	*Medicago radiata* نمونه آذربایجان غربی
G6	*Medicago orbicularis* نمونه گرگان
G7	*Medicago orbicularis* نمونه بهبهان
G8	*Medicago minima* نمونه شماره ۳۱۶
G9	*Medicago litoralis* نمونه شماره ۱۰۳۸
G10	*Medicago rigidula* نمونه شماره ۱۱۲۸
G11	*Medicago truncatula* نمونه شماره R/۱۱۴۶
G12	*Medicago scutellata* نمونه استرالیا



شکل شماره ۱- الکتروفورز ژل اکریل آمید با غلظت زیاد عصاره بذر

شکل شماره ۲- الکتروفورز ژل اکریل آمید با غلظت پایین عصاره بذر

شکل شماره ۳- تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورزی جمعیتهای مورد مطالعه



تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع خصوصاً جناب آقای دکتر جلیلی که امکانات اجرای این پروژه را در اختیار ما قرار داده‌اند، سپاسگزاری می‌نمائیم و از کلیه همکاران محترم بخش ژنتیک و فیزیولوژی این مؤسسه که در انجام این تحقیق از همراهیشان بهره برده‌ایم، همچنین از همکاران محترم بخش بانک ژن مجتمع تحقیقاتی البرز که بذر و نمونه‌های موجود بانک ژن را جهت مطالعه فوق در اختیار ما قرار داده‌اند، صمیمانه قدردانی می‌نماییم.

منابع

شریعت، آناهیتا، ۱۳۸۰. بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌هایی از یونجه یکساله با تکیه بر مطالعات سیتوژنتیک، الکتروفورز و مورفولوژیک، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه سیستان و بلوچستان.

میرزایی ندوشن، حسین، آناهیتا شریعت و فرشته اسدی کرم، ۱۳۸۰. الکتروفورز گونه‌هایی از تاغ ، تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. شماره ۶.

ولیزاده، مصطفی، ۱۳۷۶. استفاده از الکتروفورز پروتئین‌ها در ارزیابی فاصله ژنتیکی گونه‌های یونجه، مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۸. شماره ۲.

Ahmed, M. F., 1994. A study of the cyto-taxonomy for conservation of genetic resources of forage legumes (*Medicago species*) in Omayed Biosphere Reserve. Scientific Report, University of Alexandria, Egypt.

Blackstock, W.P., and M.P. Weir, 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins, Trends in Biotechnology, 17: 121-127.

Camilleri, Patrick, 1998. Capillary electrophoresis. Theory and Practice. Second edition. CRC Press, Boca Rato, Florida, 552 pp.

Eardly, B.D., L.A. Materon, N.H. Smith, D.A. Jahnson, M.D. Rumbaugh, and R.K. Selander, 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. Applied Environmental Microbiology, 56:187-194.

Gombocz, C., 1995. What is electrophoresis. Applied and Theorical Electrophoresis, 4: 197-209.

Hamrick, J.L., M.J.W. Godt, S.L. Sherman-Broyles, W.T. Adams, S.H. Strauss, D.L. Copes, and A.R. Griffin, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. Population genetics of forest

trees. Proceedongs of an International Symposium held jointly by INFRO Parties. Corvallis, Oregan.

Klose, J., and U. Kobalz, 1995. Two-dimentional Electrophoresis of Proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, Electrophoresis, 16: 1034-1059.

Mussa, H.J., L.W. Sumner, and M.J. Harrison, 2000. The use of proteomics to elucidate the changes in cellular behavior in *Medicago truncatula* in response to colonization by *Glomus versiforome.* Proceeding of 6th International Congress of Plant Molecular Biology, Quebec, Canada.

Sergio, L., P.L.S. Zeuli, and P.L. Spagnoletti-Zeuli, 1992. Study of the genetic structure of wheat germplasm enteries by means of seed storage protein electrophoresis, Plant Genetic Resources Newsletter, 90:1-5.

Spagnoletti-Zeuli, P.L., L. Sergio, and P. Perrino, 1995. Changes in the genetic structure of wheat germplasm accessions during seed rejuvenation. Plant Breeding, 114: 193-198.

Thiellement, H., N. Bahram, C. Damerval, C. Plomion, M. Rossignol, V. Santoni, D. De-Vienne, and M. Zivy, 1999. Proteomics for genetic and physiological studies in plants. Electrophoresis, 20: 2013-2026.

Electrophoresis of seed storage proteins in several medic species

A. Shariat[1] , *H. Mirzaie-Nodoushan*[1] , *A. Ghamarri-Zare*[1] *and M.H. Sangtarash*[2]

Abstract

This research was carried out on seed storage proteins of several medic species (annual *Medicago* species) using an electrophoresis method, in order to investigate their genetic relationship. For this purpose, seeds of twelve populations of eight medic species were prepared from Alborz Research Complex. SDS-PAGE method of electrophoresis was carried out in five replications on the seed storage proteins. First, to optimize the method of electrophoresis on medic seed storage proteins, two protein concentrations and two gel cocentrations were examined. The best result was obtained when a low consentrastion of the protein and a high consentration of the seperator gel were combined. Using the best prepared gel, the distances of each band was measured from the loading well. Presence or absence of the common bands were also specified by 1 or 0 respectively. Using cluster analysis, the populations were classified and their genetic relationship were discussed.

Key words: Annual *Medicago*, Genetic relationship, Electrophoresis, Cluster analysis, and SDS-PAGE

[1]- Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran.

[2] - University of Sistan and Baluchestan