دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۳٤-۲٤ (۱۳۸۹)

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 دریافت: ۱۳۸۸/۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱

چکیده

دورگ‌گیری بین‌گونه‌های مختلف جنس لولیوم که دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند این امکان را فراهم می‌سازد که صفات مطلوب دو گونه را در یک واریته 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

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

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 بین‌گونه‌ای به منظور تولید دورگ‌های بین‌گونه‌ای می‌تواند در رسیدن به هدف مذکور مورد استفاده قرار گیرد. آمیزش‌های بین‌گونه‌ای در هر دو سطح دیپلوئید و پلی پلوئید اهمیت دارند. به‌عنوان نمونه دورگ‌گیری بین گونه‌های تتراپلوئید گونه‌های *L. multiflorum* و *L. perenne* 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. perenne* و *L. rigidum* 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 بین‌گونه‌ای 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 بین‌گونه‌ای برای تولید جامعه‌های گیاهی با اساس ژنتیکی گسترده به منظور رسیدن به 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 بالائی دارند (Hahn & Schoberlein, 1999) تاکنون در مطالعات ژنتیکی مورد استفاده زیادی قرار گرفته‌اند. به‌طوری 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; Ghafoor *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

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، Saitou *et al.*, 1994، Leymarie *et al.*, 1996). در 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 کارآیی 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 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. perenne* و *L. rigidum* 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 ۰/٦ 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، ۰/٤ مولار، تریس ٤٦۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۸/۳) به خوبی خرد شدند. مخلوط حاصل به مدت

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، pH = ٦/٨، سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ٤٪، مرکاپتواتانول ۱۰٪ ، گلیسرل ۲۰٪ و برومونفل بلو ۰/۰۱٪) مخلوط و به مدت ٤ 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 (آکریل‌آمید ۱۲٪ ، بیس اکریل امید ۰/۲٪، تریس۰/۳۷۵ مولار با pH = ٨/٨) و بعد ژل بالایی (آکریل‌آمید ٤٪، تریس ۰/۱۲۵ مولار با pH = ٦/٨) در دستگاه پلیمریزه گردیدند. بافر الکترود نیز براساس تریس گلایسین ۲۵ میلی‌مولار به همراه SDS ۰/۱٪ با pH = ٨/٣ تهیه گردید.

در زمان بارگیری، از هر نمونه ۲۰ میکرولیتر در درون هر چاهک ژل تزریق گردید. نمونه‌ها با شدت جریان متوسط ٦٠ میلی‌آمپر الکتروفورز شدند و تا زمانی که شاخص رنگی (برومونفل‌بلو) به انتهای ژل زیرین رسید الکتروفورز ادامه یافت. در ادامه کار، ژل از دستگاه خارج شده و به مدت نیم ساعت در محلول تثبیت (Trichloroacetic acid، TCA ۲۰٪) قرار داده شد و بعد با آب‌مقطر شستشو داده شده و به مدت یک شب در دمای محیط در محلول رنگ کماسی‌بلو (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 ٪ آب‌مقطر) 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 (٦ ژنوتیپ) ستون و به تعداد مقرهای باندی 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 به‌طوری 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.

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

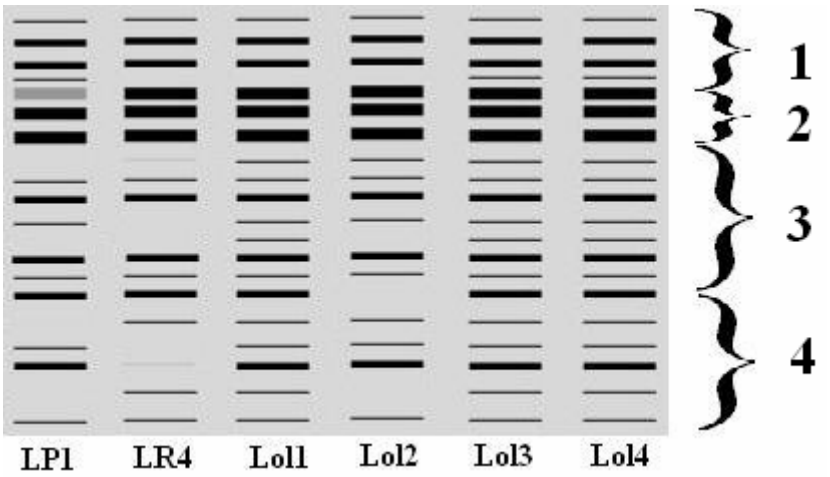
شماره باند	P_1	R_4	L_1	L_2	L_3	L_4
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱
٤	۱	۰	۰	۰	۱	۱
٥	۰	۱	۱	۱	۱	۱
٦	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۸	۰	۰	۱	۱	۱	۱
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱
۱۲	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۱۳	۰	۰	۱	۱	۱	۱
۱٤	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱٥	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۱٦	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۷	۱	۰	۱	۱	۱	۱
۱۸	۰	۰	۱	۱	۱	۱
۱۹	۰	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

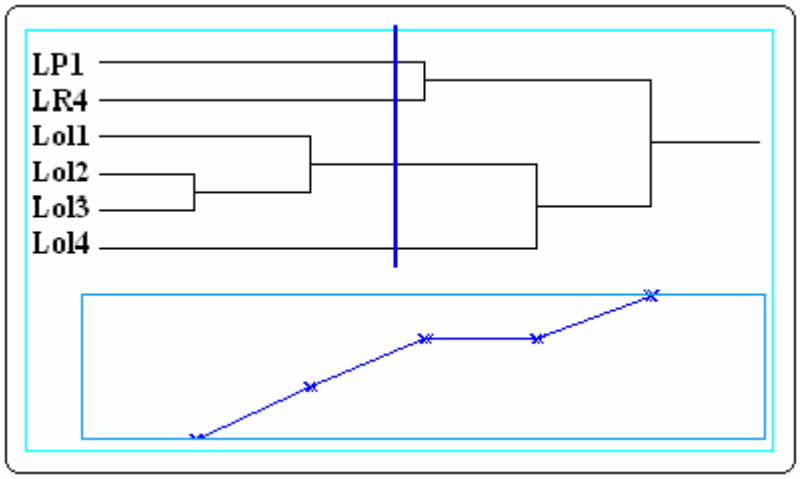
نتایج

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 مشاهده گردید. این تعداد باند در دامنه‌ای از حداقل ١٤ 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 ٤، ٥، ۱۱، ۱۷ و ۱۹ با یکدیگر تفاوت داشتند. به عبارتی، این باندها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای ملکولی و ابزاری

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 شکل۲ ارائه شده است. براساس این دندروگرام در صورتی‌که خط برش در نقطه‌ای قرار گیرد 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 ٤ (Lol3 و Lol4) بیشترین فاصله را با والدین نشان دادند. دورگ‌های شماره ۳ و ٤ (Lol4 و Lol3) در این دندروگرام کاملاً در کنار یکدیگر قرار گرفتند زیرا تولید باندهای پروتئینی کاملاً مشابه‌ای نمودند. این نتیجه نشان می‌دهد که ژن‌های مسئول خصوصیات پروتئینی مورد مطالعه در این دو ژنوتیپ تفاوت چندانی ندارد.



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 نتاج حاصل از تلاقی‌ها هستند



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

بحث

با توجه به کارآیی خوب الکتروفورز در تفکیک گونه‌ها و ارقام مختلف جنس لولیوم، (Dinelli & Lucchese, 1999) در این تحقیق از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در مقایسه ٦ 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 ٤ به‌ترتیب 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. به‌نحوی‌که 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. هریک 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

و نیز تراکم و رنگ‌پذیری آنها با هم اختلاف نشان دادند ولی این اختلاف در بین نتاج به ۲ باند کاهش یافت. در ناحیه شماره ٤، تعداد ٦ باند که اغلب ضخامت‌های کمی داشتند و پرتحرک‌ترین پروتئین‌ها بودند قرار داشتند. در این ناحیه نیز والدین از نظر ٤ باند با یکدیگر اختلاف نشان دادند. این اختلاف در نتاج به ۲ باند کاهش یافت. به عبارت کلی‌تر نواحی شماره ۳ و ٤ متنوع‌ترین نواحی بودند. به‌ویژه اینکه ژنوتیپ‌ها و گونه‌های والدینی را به وسیله باندهای پروتئینی این ناحیه می‌توان به خوبی تعریف نمود. دورگ بودن نتاج حاصل از تلاقی بین‌گونه‌ای 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 نتاج 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 ومقایسات لازم را انجام داد (Blackman & Payne, 1987). نامتجانس بودن الگوهای الکتروفورزی و یا شدت باندها می‌تواند در اثر عواملی نظیر تعداد متفاوت 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 نتاج 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

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 نتاج حاصل از تلاقی بین فستوکا و لولیوم 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 لولیوم به سادگی و با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک از والدین قابل تشخیص نیستند (Hahn & Schoberlein, 1999). از این رو استفاده از روش SDS-PAGE تاکنون کمک شایان توجهی را به محققان در این زمینه کرده است. در این مطالعه نیز نتاج حاصل از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای شباهت‌های مورفولوژیک زیادی به والد مادری داشتند که قضاوت را مشکل می‌نمود. از این رو استفاده از پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر توانست ضمن تفکیک نتاج از والدین، تنوع قابل توجهی را بین نتاج نشان دهد.

استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای در این تحقیق ضمن بیان تنوع ژنتیکی موجود در مواد مورد مطالعه، دورگ بودن نتاج حاصل از تلاقی‌ها را نیز تأیید نمود. لازم به ذکر است در بسیاری از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای نتاج 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. به‌طوری‌که مقایسه باندهای پروتئینی حاصل از نتاج و 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.
– 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 Pigon 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

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 Hymalayan 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 enzme 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 timoty (*Phleum pretense*) under different systems pf 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*. Physioligia Plantarum, 101: 526-532
between drought and hormonal responses. Plant and Cell Physiology, 37: 966-975.
– Masood, M.S., Oikuno K. and Anwae, 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* speciesas 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 Asadicorom, 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 intera-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. Hosseinizadeh[1], H. Mirzaie-Nodoushan[*2] and Sh. Mehrpour[3]

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.