SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین روش تحقیق و مقاله نویسی علوم انسانی

کارگاه آنلاین پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

The study of inter /intra variety variation in electrophoregrams of seed proteins in chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Abstract: Genetic variation in germplasm has an important role in identification of varieties. Electrophoretic patterns of the protein fractions are directly related to the genetic background of the proteins and can be used to certify the genetic makeup.Discrimination of chickpea cultivars was achieved by analysis of seed protein by two types of polyacrilamide gel electrophoresis . PAGE is a valid technique increasingly being utilized as an approach for species and cultivars identification. Each variety or a group of varieties exhibit characteristic protein banding patterns.

On the basis of these patterns they can be identified accordingly. Discrimination of chickpea cultivars was achieved by analysis of seed protein by two types of polyacrilamide gel electrophoresis. Eleven cultivars of *Cicer arietinum*(Chickpea) were analysed for total seed protein profile using sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Acid-PAGE for specific proteins to ascertain the extent of genetic variation and its geographical distribution. A considerable variation in protein banding pattern was observed among these cultivars. Inter-specific variation was more as compared to intra-specific variation.

Key words: A-PAGE,Cultivar, SDS-PAGE, chickpea, *Cicer arietinum*, protein, seed

بررسی تنوع درون و بین واریته ای نخود (*Cicer arietinum* L.) با استفاده از الکتروفورز پروتئین های کل و خاص

فاطمه محمودی* دانشگاه تربیت معلم تهران ،دانشکده علوم ،گروه زیست شناسی
دکتر احمد مجد**دانشگاه تربیت معلم تهران ،دانشکده علوم ،گروه زیست شناسی
دکتر مصطفی ولیزاده دانشگاه تبریز ،دانشکده کشاورزی ،گروه اصلاح نباتات
email :fmahmoodi2@yahoo.com

چکیده: تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم نقش مهمی در ایجاد و شناسایی واریته جدید ایفا می کند .الگوی الکتروفورزی بخش های پروتئینی در ارتباط مستقیم با زمینه ژنتیکی پروتئین می باشد و برای تعیین ساختارژنتیکی می تواند مورد استفاده قرار گیرد. هر واریته یا گروهی از واریته ها الگوها ی پروتئینی ویژه خود دارند که بر اساس این الگوها ،هر واریته به طور دقیق مورد شناسایی قرار می گیرد.
در این پژوهش تعداد یازده کولتیوارنخود زراعی(*Cicer arietinum* L.) که سطح زیر کشت بیشتری در کشورمان دارند انتخاب شدند وبه منظور بررسی دقیق تنوع درون و بین واریته ای الکتروفورز پروتئین های محلول در نمک (پروتئین های کل) با استفاده SDS-PAGE انجام شد. همچنین برای بررسی تنوع پروتئین های محلول در اسید (پروتئین های خاص)از روش Acid -PAGE استفاده شد.تنوع بین واریته ای قابل ملاحظه ای در الگوی باندینگ پروتئین ها مشاهده می شود.در کل نتایج نشان دهنده تنوع بین واریته ای بیش از تنوع درون واریته ای است.

کلمات کلیدی:نخود،پروتئین ذخیره ای ، کولتیوار ،SDS-PAGE، Acid –PAGE ،. *Cicer arietinum* L .

مقدمه:

حبوبات دانه های خشک خوراکی هستند که به تیره بقولات تعلق دارند.بذور رسیده و خشک حبوبات دارای ارزش غذایی زیاد با قابلیت نگهداری طولانی می باشند.نخود زراعی(*Cicer arietinum* L.) ۲۸/۹- ۲۵/۳% پروتئین دارد). (Hulse,1991) نخود زراعی نسبت به سایر حبوبات سازگاری بیشتری با شرایط اقلیمی کشور داشته و می تواند بخشی از پروتئین مورد نیاز کشور را تامین کند.چون پاسخ به گزینش برای افزایش عملکرد در ارقام نخود بسیار پائین است ، لذا بررسی جنبه های بیو شیمیایی نخود وگزینش بر اساس نشانگر های بیو شیمیایی احتمالا برای افزایش پاسخ به گزینش می تواند سودمند باشد(Muchlbauer,1988).
نشانگر های پروتئینی با توجه به اینکه کمتر تحت تاثیر تغییرات محیطی قرار گرفته و تنوع بین ارقام را در سطح بالایی نشان می دهند،می توانند به عنوان یک الگوی مناسب برای مطالعه ارقام ،واریته هاو گونه های مختلف انواع گیاهان مورد استفاده قرار گیرند(Avise,1994).
پروتئین های ذخیره ای دانه درحبوبات به طور گسترده ای مورد مطالعات بیوشیمیایی از روش SDS-PAGE قرار گرفته اند(Muchlbauer,1988) .این دسته از پروتئین ها برای تعیین خویشاوندان وحشی گیاهان و مطالعه فرایند اهلی شدن آنها ونیز تعیین میزان شباهت بین ژنوم ها ی مختلف مورد بررسی فراوان قرار می گیرند.شناسایی و تشخیص کولتیوار با استفاده از PAGE و پروتئین های ذخیره ای دانه در گیاه نخود توسط (Singh *et al*, 1991) انجام شد.همچنین در بررسی دیگری پروتئین های ذخیره ای دانه از کولتیوار های نخود خوراکی و هشت گونه یکساله نخود وحشی استخراج شدند و با روش SDS-PAGE مقایسه شدند (Ahmad *et al*,1992). در مطالعه دیگر،برای تعیین

ارتباط بین کولتیوارهای نخود خوراکی بررسی های الکتروفورزی انجام شد و نتایج نشان داد که نخود های تیپ دسی و کابلی واریته هایی از نخود خوراکی می باشند(Kharkwal,1999) .
الکتروفورز پروتئین های خاص (محلول در اسید) برای مطالعه تنوع ژنتیکی در گیاهان تیره بقولات بسیار محدود انجام شده است.در یک تحقیق بااستفاده ازالکتروفورز پروتئین های ذخیره ای محلول در اسید با روش A-PAGE تفاوت های بین ارقام زراعی عدس مشخص شد(Hussein *et al*,1989).با بررسی های انجام شده ،تا کنون هیچگونه پژوهشی بر روی پروتئین های محلول در اسید در گیاه نخود انجام نشده است.به همین دلیل در پژوهش حاضرمورد بررسی قرار گرفت .
موضوع این پژوهش مطالعه دوری و نزدیکی کولتیوارهایی از نخود خوراکی شامل انواع دسی و کابلی است که بیشتردرکشورکشت می شوند.دراین بررسی الکتروفورزپروتئینهای کل(Total proteins) با روش SDS-PAGE و الکتروفورز پروتئین های خاص(Specific proteins) با روشA- PAGE انجام شد.

مواد و روش ها:
یازده کولتیوار مورد بررسی در این پژوهش بر اساس سطح میزان کشت آنها در ایران و اختلاف در توزیع جغرافیایی ، انتخاب شدند. بذرهااز مرکز بین المللی تحقیقات دیم – کرمانشاه تهیه شدند. مشخصات ارقام در جدول شماره ۱آورده شده است .
آماده سازی نمونه بذر: برای استخراج پروتئین ها دانه ها به صورت تک بذر به خوبی آرد شدند.۰/۲گرم آرد از هر کولتیوار درون لوله اپندورف ریخته و یک میلی لیتر بافر استخراج شامل (Tris-Hcl ۰/۰۵مولار، SDS%۲ ، ساکارز ۵%، β-مرکاپتو اتانول۱%)به آن اضافه شدو نمونه ها به وسیله vortexer به خوبی هم زده شدند.نمونه ها در rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت که حاوی پروتئین های استخراج شده است ،جداسازی و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد .

آماده سازی ژل:
پروتئین های بذر به روش SDS-PAGE (Laemmli,1970) با استفاده از ژل پلی اکریلامید %۱۰الکتروفورز شدند.الکتروفورزدر۱۰۰ولت به مدت۶-۵ ساعت انجام شد.پس ازپایان الکتروفورز،ژلهابامحلول۲%(w/v) کوماسی برلیانت بلو R۲۵۰ رنگ آمیزی شدند و به مدت ۱۲-۱۰ ساعت در محلول رنگ بر قرار گرفتند به طوری که فقط باند های پروتئینی مشخص شدند.سپس از ژلها عکسبرداری صورت گرفت .
برای پروتئین های خاص به روش A- PAGE(Lafiandra,1991) در بافر آمونیوم لاکتات با استفاده از ژل پلی اکریلامید ۷% الکتروفورز در۲۰۰ ولت به مدت ۳-۲ ساعت انجام شد وپس از رنگ آمیزی با آب مقطر رنگ بری شدندو سپس عکس برداری شدند.

نتایج و بحث:
نتایج به دست آمده از آنالیز الکتروفورگرامها نشان داد که،۱۸باند در همه کولتیوار ها قابل مشاهده است .نمونه ها بر اساس حضور یا عدم حضوروضخامت وشدت رنگ باندهای پروتئینی تقسیم بندی شدند.الگوی نوار بندی پروتئین های کل در این روش چهار ناحیه مجزا را نشان می دهد . ناحیه A شامل پروتئین های با وزن مولکولی کم که در۳ /۱انتهای ژل قرار دارد.نوارهای چند شکل در این ناحیه بسیار اندک می باشد.ناحیه B که در قسمت میانی ژل قرار دارد و شامل پروتئین های با وزن مولکولی متوسط است که بیشترین تعداد نوارهای چند شکلی در این ناحیه مشاهده می شوند. نواحی D,C پروتئین های با وزن مولکولی بالا(HMW) هستند که می توان یک ناحیه واحد به حساب آورد در این ناحیه نیز نوار های چند شکل به ندرت مشاهده می شود. بر اساس شباهت در الگوی باندینگ در هر دو روش،کولتیوارهای نوع دسی (دانه کوچک ،رنگ تیره)شماره های ۷و۸ در یک گروه قرار میگیرند که با نتایج Masood و همکاران در ۱۹۹٤ و Kharkwal در ۱۹۹۹همسویی دارد.در نمونه شماره ٦بیشترین تغییرات (وجود باندهای ضعیف و ضخامت قابل توجه باندهای مشترک با سایر نمونه ها) مشاهده می شود . Chauhan در سال ۲۰۰۲واریته های مختلف سورگوم را بر اساس ضخامت و شدت رنگ باندهای پروتئینی از هم تفکیک کرد .بر این اساس بیشرین شباهت در نمونه های ۹و ٦ وجود دارد. روش Acid –PAGE تفاوت های بین نمونه های اصلاح شده و بومی رابا ظهور نوارهای پروتئینی جدید در نمونه های اصلاح شده به خوبی نشان می دهد که احتمالا طی مراحل اصلاح (دو رگ گیری های متوالی)ایجاد شده اند.یافته های ما مشابه نتایج Chauhan در سا ل ۲۰۰۲ روی کولتیوارهای سورگوم می باشد.

منابع :

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

Anon, 1999. Agricultural Statistics of Pakistan. Gov. of Pak., Min. of food, Agri. and Livestock, Eco. Wing Islamabad, Pakistan.

Avise, J.C., 1994. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool., 23: 465-481.

Chauhan, P., C. Ram, A. Mann and V.P. Sangwan, 2002. Molecular weight analysis of seed proteins of forage sorghum. Seed Sci. Tech., 30: 11-16.

Hulse, J.H., 1991. Nature, composition and utilization of grain legumes. In: Uses of tropical Legumes. A. Patancheru (Ed.). Proceedings of a Consultants' Meeting, 27-30 March 1989, ICRISAT Centre. ICRISAT, Patancheru, A., India, pp: 502- 324.

Hussain,,A.,Bushuk,w.,1989.Discrimination of cultivars of Lentil (Lens culinaris Medic.) by electrophoresis of seed proteins.Can. J. Plant Sci.69: 243-246

Kharkwal, M.C., 1999. Seed storage proteins and intraspecific relationships in *Cicer arietinum* L. Ind. J. Genet. Pl. Breed., 59: 59-64.

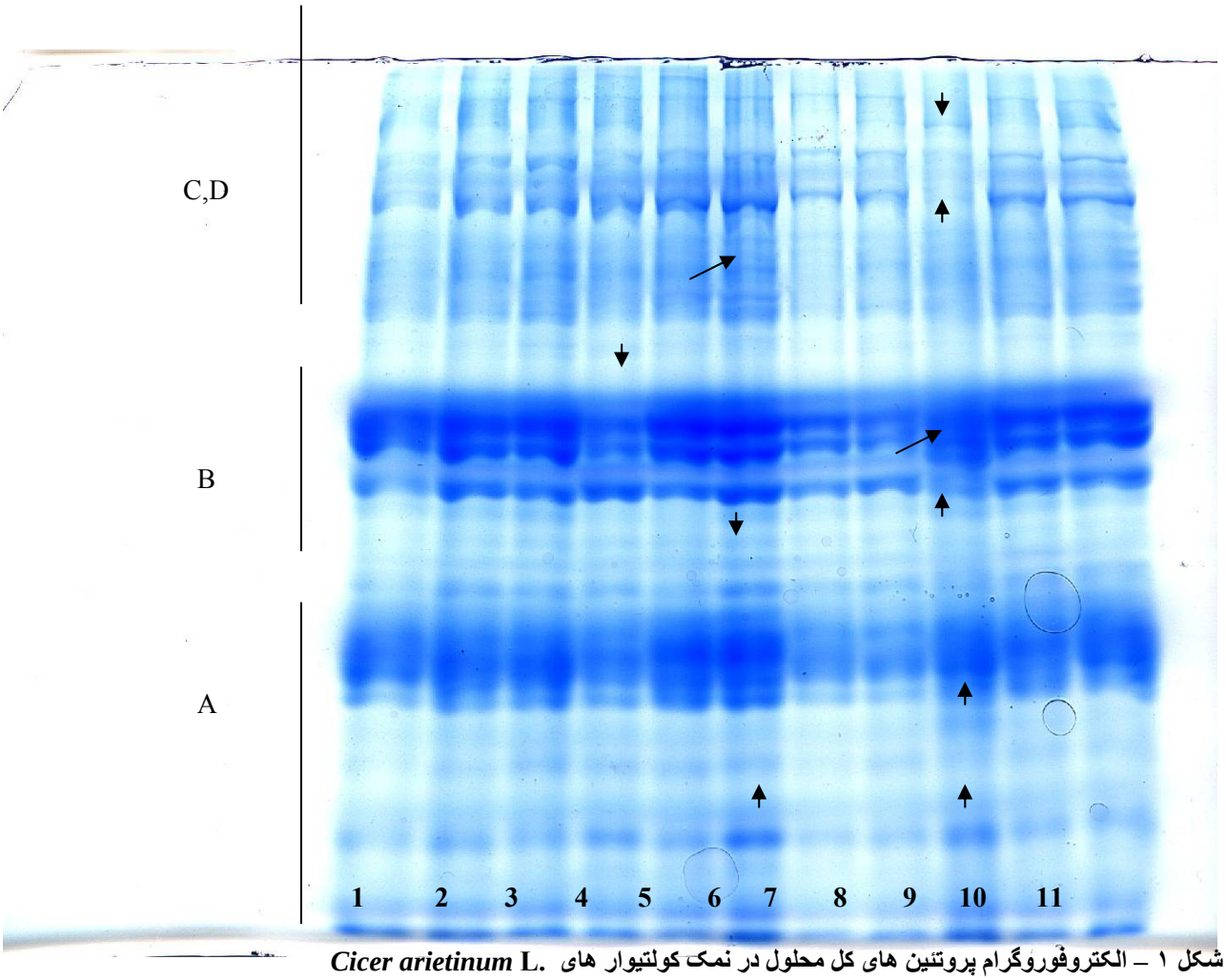
Lafiandra,D.,Kasarda,D.P.,1985.One and two dimentional polyacrilamide gel electrophoresis in asingle gel.Cerealchem.62(5):314-319

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 22: 680-685.

Masood, M.S., K. Oikuno and R. Anwar, 1994. Inter and intra-specific variation in SDS- PAGE electrophoregrams of total seed protein in wheat, barley and their wild relatives In: Genetic resources of cereals and their utilization in Pakistan. A.A. Jaradat (Ed.). Proceedings of National Saminar, 8-10 Feb. Islamabad, Pakistan. IPGRI., pp: 125.

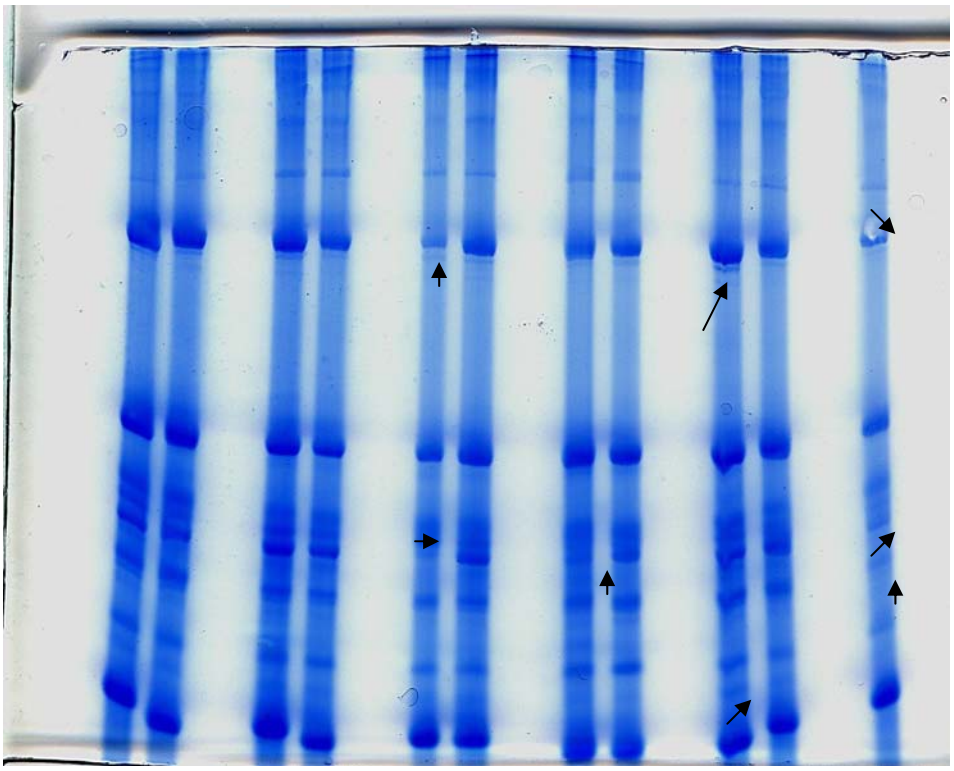
Muchlbauer, F.J., R.J. Redden, A.M. Nassib, L.D. Robertson and J.B. Smithson, 1988. Population improvement in pulse crops: an assessment of methods and techniques. In: World crops: Cool season Food Legumes. R.J. Summerfield (Ed.). Kluwer Academic Publishes, Dordrecht, The Netherlands, pp: 943-966.

Singh, H.P., P.V. Singh and R.P. Sexina, 1991. Identification of chickpea cultivar using PAGE of storage seed proteins. Ann. Biol. Ludhiana, 8: 167-175.



شکل ۱ – الکتروفوروگرام پروتئین های کل محلول در نمک کولتیوار های *Cicer arietinum* L.

فلش ها نشان دهنده اختلافات بین واریته ها میباشد



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

شکل ۲- الکتروفور گرام پروتئین های خاص (محلول در اسید) کولتیوارهای ***Cicer arietinum* L.**

جدول ۱– لیست کولتیوارهای استفاده شده برای بررسی تنوع پروتئینی در نخود

Number	Cultivars	Plant species	Type	Origion
1	Shiraz	*Cicer arietinum*	Kabuli	Local
2	Hashem	*Cicer arietinum*	Kabuli	ICARDA
3	Ardebil	*Cicer arietinum*	Kabuli	Local
4	ILC-482	*Cicer arietinum*	Kabuli	ICARDA
5	Grist	*Cicer arietinum*	Kabuli	Local
6	Biaenij	*Cicer arietinum*	Kabuli	Local
7	Kaka	*Cicer arietinum*	Desi	Local
8	Pirouz	*Cicer arietinum*	Desi	Local
9	Filip 90-96C	*Cicer arietinum*	Kabuli	ICARDA
10	Filip 93-93C	*Cicer arietinum*	Kabuli	ICARDA
11	JAM	*Cicer arietinum*	Kabuli	Local

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
روش تحقیق و مقاله نویسی علوم انسانی

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی