تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال پنجم، شماره شانزدهم، پاییز ۱۳۹۲، صفحه ۷۵-۸۴
دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۲۴ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۰۳/۲۵

استفاده از الگوهای پروتئینی در بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام منتخب کلزا

رؤیا رضوی‌زاده [۱]* و فاطمه رستمی [۲]
[۱] استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران، ایران

چکیده

تنوع پروتئینی دانه‌ها و برگ‌های لپه‌ای پنج روزه چهار رقم منتخب گیاه کلزا شامل الایت، اکاپی، تاسیلو و زرفام با استفاده از ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات به منظور شناسایی نشانگرهای پروتئینی بررسی شد. میزان پروتئین محلول کل در پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه ارقام کلزا تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت در حالی‌که این مقدار در برگ‌های لپه‌ای متفاوت بود. الگوهای پروتئینی و بررسی باندها با برنامه ImageJ تفاوت‌های در خور توجهی را نشان دادند. بیان نسبی شش باند پروتئینی در دانه‌ها و برگ‌های لپه‌ای متفاوت بود و سه نشانگر پروتئینی از الگوی پروتئینی دانه و برگ‌های لپه‌ای شناسایی گردید. نتایج بررسی روابط بر اساس حضور و غیاب باندهای پروتئینی ویژه در الگوی پروتئینی دانه نشان داد که ارقام تاسیلو و الایت دارای بیشترین شباهت بودند.

واژه‌های کلیدی: پروتئین برگ‌های لپه‌ای، پروتئین ذخیره‌ای دانه، کلزا، نشانگرهای پروتئینی

مقدمه

پروتئین‌ها، محصولات نهایی مسیرهای ژنتیکی هستند که در مراحل مختلف حیات سلول و در پاسخ به نیازهای سلولی تولید و به سوی جایگاه‌های مناسب هدف‌گیری می‌شوند (Nelson and Cox, 2007). در میان انواع پروتئین‌های گیاهی، پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر (SSPs) که در سطوح بالا و در مراحل انتهایی نمو بذر گیاهان در آنها تجمع می‌یابند (Sánchez-Romero *et al*; 2002؛ Sergeant *et al*., 2009) به عنوان ابزاری برای بررسی تنوع ژنتیکی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. مطالعه SSPs اطلاعات مهمی در مورد روابط خویشاوندی در گیاهان به ویژه گیاهانی با ارزش غذایی بالا به دست می‌دهد. به دلیل ثابت‌تر بودن نوع و میزان SSPs در بذرهای بالغ نسبت به سایر بافت‌های گیاهی (Magni *et al*., 2007)، تحلیل آنها می‌تواند ابزاری برای شناسایی ارقام و گونه‌های گیاهی باشد (Kakaei and Kahrizi, 2011). در مقابل، پروتئین‌های رویشی (VSPs) (پروتئین‌های موجود در بافت‌های رویشی گیاه مانند: ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها و غده‌ها) تحت تأثیر شرایط محیطی و تنش‌ها قرار می‌گیرند (Tamkoc and

* razavi.roya@gmail.com

.Arsalan, 2010)

کلـزا (*Brassica napus*)، بـه خـانواده چلیپائیـان (Brassicaceae)، از گیاهان زراعی مهـم در مدیترانـه و برخی مناطق خاورمیانه متعلـق اسـت (Bybordi, 2010) که به عنوان یک گیاه دانه روغنـی بـا ارزش در سراسـر جهـان کشـت مـی‌شـود (Sadia *et al*., 2009). درصـد بالای پروتئین و اسیدهای چرب غیر اشباع مانند اولئیک اسـید، همچنـین میـزان انـدک اسـیدهای چـرب اشـباع موجود در بذرهای این گیـاه ارزش غـذایی و اقتصـادی آن را افـزایش داده اسـت (Nasr *et al*., 2006). کلـزا دانه‌هایی با ۴۰ درصد روغن و حدود ۱۵ درصد پروتئین (بـه عنـوان ترکیبـات ذخیـره‌ای اصـلی) تولیـد مـی‌کنـد (Norton and Harris, 1975؛ Gunstone *et al*., 1995). مطالعـات مولکـولی و بیوشـیمیایی، مسـیرهای بیوسنتزی مسؤول تولید و تجمع پـروتئین و روغـن را در بـذر *B. napus* مشـخص کـرده‌انـد (Rawsthorne, 2002؛ Schwender and Ohlrogge, 2002؛ Hill *et al*., 2003؛ Schwender *et al*., 2003، Goffman *et al*., 2004؛ Kubis *et al*., 2004؛ Ruuska *et al*., 2004). با وجود اینکه امـروزه اسـتفاده از تکنیـک‌هـای الکتروفـورز دو بعـدی (2-DE) و روش‌هـای شناسـایی پروتئین به وسیله اسپکتروفتومتر جرمـی (MS) گسـترش یافته اسـت (Aebersold and Mann, 2003؛ Gorg *et al*., 2003؛ Agrawal *et al*., 2005)، بررسی SSPs بـا اسـتفاده از ژل الکتروفـورز یـک بعـدی، بـه ویـژه SDS-PAGE، همچنان به عنـوان روشـی سـاده، سـریع، ارزان و رایـج بـرای مطالعـه و مقایسـه تفـاوت الگـوی پروتئینـی ارقـام و گونـه‌هـای مختلـف گیـاهی و تنـوع ژنتیکـی آنهـا مطـرح اسـت. از آنجـا کـه بررسـی تنـوع ژنتیکی نقش مهمـی در بـه نـژادی ژنتیکـی گیاهـان ایفـا می‌کنـد، کـاربرد نشـانگرهای پروتئینـی نظیـر SSPs در مطالعه تنـوع ژنتیکـی ژرم پلاسـم بـه منظـور اسـتفاده در برنامه‌های اصلاح نباتات بسیار مورد توجه است (Javid *et al*., 2004). الگـوی الکتروفـورزی پـروتئین‌هـای ذخیره‌ای بذر در مطالعات قبلی نیز اسـتفاده شـده اسـت. برای نمونه نشانگرهای پلی‌مورفیسم ژنتیکـی گونـه‌هـای *Brassica* در بـنگلادش، ژاپـن، چـین و دانمـارک بـا روش SDS-PAGE توسـط Rahman و Hirata (۲۰۰۴) تشـخیص داده شـد. همچنـین، Kakaei و Kahrizi (۲۰۱۱) بـه مطالعـه پروفایـل پـروتئین‌هـای ذخیـره‌ای دانـه در ارقـام مختلـف *B. napus* و تنـوع ژنتیکی آنها پرداختند.

با توجـه بـه ارزش غـذایی و اقتصـادی بسـیار بـالای ارقام مختلف کلـزا و بـه دلیـل محـدود بـودن اطلاعـات موجود در مورد تفاوت‌هـای پروتئینـی (Rahman and Hirata, 2004) و تنوع ژنتیکی میان آنها، مطالعه حاضر به منظور تکمیل اطلاعات در زمینه آنالیزهای مقایسـه‌ای و تنوع ژنتیکی ارقام مختلف کلزا به وسـیله الکتروفـورز یـک بعـدی (SDS-PAGE) صـورت گرفتـه، شناسـایی برخـی ارقـام منتخـب کلـزا بـا اسـتفاده از نشـانگرهای پروتئینی ذخیره‌ای بذر و مقایسه با پروتئینی‌های رویشـی (برگ‌های لپه‌ای) انجام گردیده است. به دلیل وابستگی جوانه‌زنی بذر به لپه‌ها به ویژه در مراحل ابتـدایی رشـد، الگوی پروتئینی برگ‌هـای لپـه‌ای پـس از گذشـت پـنج روز از کشت در محیط MS نیـز توسـط SDS-PAGE بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت

بذر چهار رقم کلزا (الایت، اکاپی، تاسیلو و زرفـام)

از مرکز تولید دانه‌های روغنی وزارت جهاد کشاورزی استان اصفهان تهیه شد. دانه‌های بالغ هر رقم پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه و آب ژاول ۲۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴ تا ۵ مرتبه در زیر لامینار و تحت جریان هوای استریل شستشو و در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۱ درصد آگار، ۳ درصد سوکروز کشت داده شدند. شیشه‌های کشت حاوی بذر در اتاق رشد با شرایط تنظیم شده دمایی و در فتوپریود ۸/۱۶ ساعت نور/تاریکی به مدت ۴ هفته قرار گرفتند تا گیاهان رشد نمایند و پس از پنج روز از برگ‌های لپه‌ای هر رقم به منظور استخراج پروتئین و ژل الکتروفورز یک بعدی استفاده شد.

استخراج پروتئین بذر و برگ‌های لپه‌ای

پس از جداسازی پوسته ۵۰ بذر از هر رقم، لپه‌ها و رویان موجود در بذرها با استون چربی‌زدایی شده، پودر فاقد چربی (defatted powder) لپه‌ها و رویان حاصل از هر رقم پس از خشک شدن در دمای اتاق برای استخراج SSPs استفاده شد (Ehsanpour *et al.*, 2010). استخراج پروتئین با استفاده از بافر استخراج حاوی ۵۰ میلی‌مولار تریس، اسیدیته ۷/۵، ۱ میلی‌مولار DTT، ۲ میلی‌مولار Na2EDTA، ۳ میلی‌مولار ۲-مرکاپتواتانول و به نسبت ۱ به ۳۰ (وزنی/حجمی) بر اساس روش Rostami و Ehsanpour (۲۰۰۹) انجام شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۲ تا ۳ ساعت روی شیکر مدل POLE IPI PARS با سرعت ۵۰ دور در دقیقه تکان داده شد، سپس به مدت ۲۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ و ۴ درجه سانتیگراد توسط سانتریفیوژ مدل SIGMA 3k20 سانتریفیوژ گردید. پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود در محلول رویی هر رقم کلزا توسط استون سرد به نسبت ۱ به ۴ (حجمی/حجمی) رسوب داده شد و به مدت ۲۵ دقیقه در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری و مجدداً به مدت ۲۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ و ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. در نهایت، رسوب پروتئینی هر رقم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شد و در ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج مذکور همگن و به مدت ۱۵ دقیقه با شرایط قبلی سانتریفیوژ شد. به طور مشابه، استخراج پروتئین از برگ‌های لپه‌ای کلزا (۰/۱ گرم بافت) صورت گرفت و در نهایت، رسوب پروتئینی هر رقم در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج مذکور همگن و به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ و ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کل و بررسی الگوی پروتئینی استفاده شد.

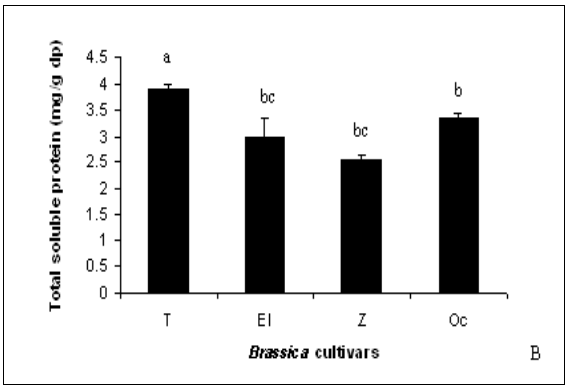
سنجش پروتئین کل و SDS-PAGE

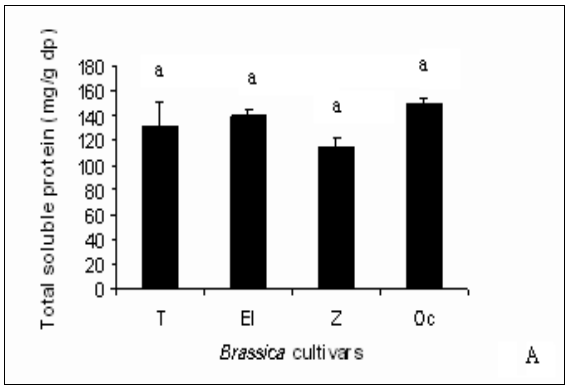
اندازه‌گیری پروتئین کل (mg/g defatted powder) بر اساس روش تغییر یافته Bradford (۱۹۷۶)، با استفاده از BSA به عنوان پروتئین استاندارد انجام (Olson and Markwell, 2007) و پس از یکسان‌سازی نمونه‌ها، الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و پروتئین‌های برگ‌های لپه‌ای با استفاده از ژل جداکننده (separating) ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم کننده (stacking) ۵ درصد به وسیله تانک الکتروفورز ساخت شرکت PEQLAB مدل ۱۶۱۴-۴۵ و با استفاده از نشانگر پروتئینی Preotein ladder PLUS PS11 در ۱۳۰ ولت انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره (Salehi and McCarthy, 2002)،

تـراکم نسـبی بانـدهای پروتئینـی بـا نـرم‌افـزار ImageJ بررسـی شـد. روابـط خویشـاوندی ارقـام *Brassica* بـر پایه حضور یا عدم حضور بانـدهای پروتئینـی در ژل بـه وسـیله تحلیـل خوشـه‌ای UPGMA و ضـریب Jaccard در نرم‌افـزار NTSYSpc2 تحلیـل شـد (Rohlf, 2000). همه آزمایش‌هـا در ۳ تکـرار انجـام و داده‌هـای حاصـل توسط نـرم‌افـزار Sigma state 2 و تحلیـل ANOVA و آزمـون دانکـن در سـطح معنـی‌داری $P<0.05$ مقایسـه شدند.

مشاهدات

اندازه‌گیری پروتئین محلول کـل SSPs در لپـه‌هـا و رویان چهار رقم کلزا شامل الایت، اکاپی، تاسیلو و زرفام تفـاوت معنـی‌داری نشـان نـداد، در حـالی کـه پـروتئین محلول کل برگ‌های لپه‌ای در برخی ارقام متفاوت بود. رقم تاسیلو بیشترین میزان پروتئین محلول کـل را نسـبت به سـایر ارقـام دارا بـود و ارقـام الایـت و زرفـام از نظـر محتوای پروتئین کل تفاوتی نداشتند (شکل ۱).



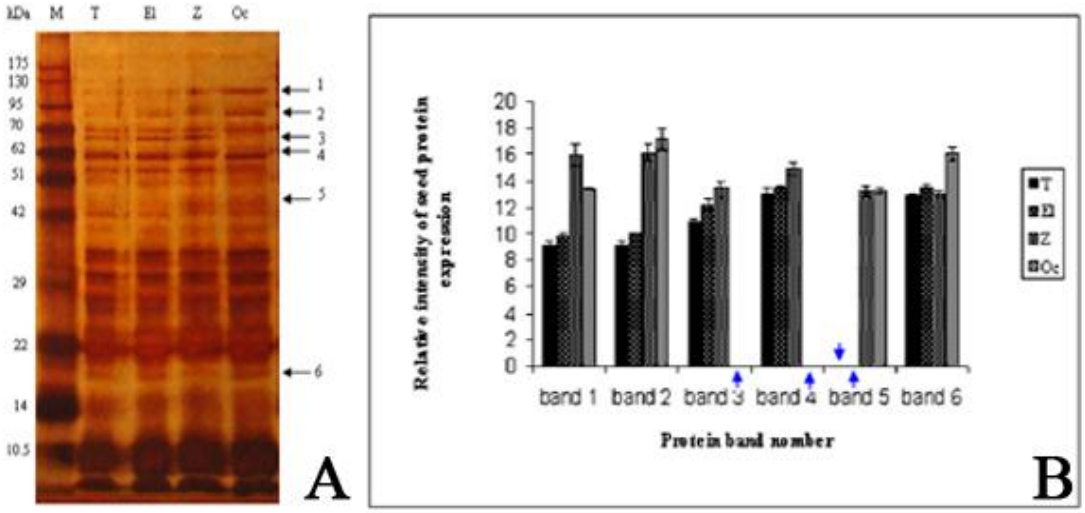


شکل ۱– A) میزان پروتئین محلول کل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر (SSPs) در لپه‌ها و رویان در چهار رقم کلـزا بـه ترتیـب شـامل: تاسـیلو (T)، الایت (El)، زرفام (Z) و اکاپی (Oc)؛ B) میزان پروتئین محلول کل برگ‌های لپه‌ای. dp: پودر فاقد چربی (defatted powder). داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± Std و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.

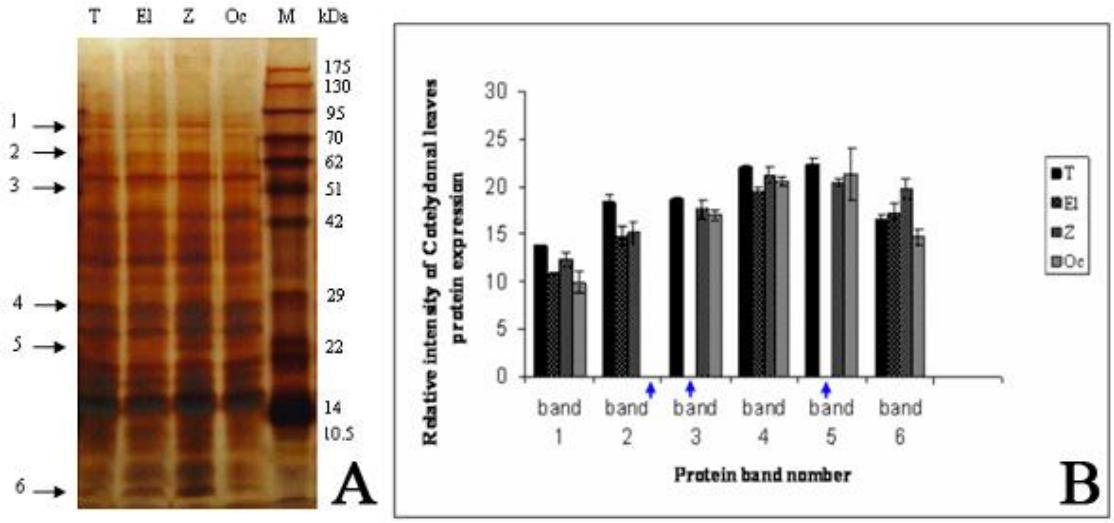
بررسی الگوی پروتئینی بذر و برگ‌های لپه‌ای چهار رقم کلزا بـا اسـتفاده از SDS-PAGE و آنـالیز بانـدهای پروتئینی با نرم‌افزار ImageJ، تفاوت معنی‌داری در بیـان نسبی ۶ باند پروتئینی در دانه‌ها و برگ‌های لپـه‌ای ارقـام کلـزا مشـخص کـرد. نتـایج ایـن بررسـی نشـان داد کـه باندهای پروتئینی ۱ و ۲ به ترتیب بـا وزن تقریبـی ۱۱۰ و ۸۰ کیلو دالتون در بـذر ارقـام تاسـیلو و الایـت کمتـرین سطح بیان و باند ۶ (۲۰ کیلـو دالتـون یـا کمتـر) در رقـم اکاپی بیشترین سطح بیان را داشت. علاوه بـر ایـن، بیـان باندهای ۳ (با وزن تقریبی ۶۷ کیلو دالتـون) و ۴ (بـا وزن تقریبی ۶۲ کیلو دالتـون) در رقـم اکـاپی قابـل تشـخیص نبـود، در حـالی کـه بانـد ۵ (بـا وزن تقریبـی ۴۵ کیلـو دالتون) در ارقام تاسیلو و الایت مشاهده نشد (شکل ۲).

نتـایج بررسـی الگـوی الکتروفـورزی پـروتئین در برگ‌های لپه‌ای چهار رقم کلزا (شکل ۳) بیشترین میزان بیان بانـد ۱ بـا وزن تقریبـی ۸۰ کیلـو دالتـون را در رقـم تاسیلو و سپس زرفام نشان داد. همچنین، بانـدهای ۲ (بـا وزن تقریبی ۶۳ کیلو دالتون) و ۶ (با وزن تقریبی ۳ کیلو دالتون) به ترتیب بیشترین سطح بیان را در ارقام تاسیلو و زرفام نشان دادند. افزایش سـطح بیـان بانـد ۴ (۲۷ کیلـو دالتون) در رقم تاسیلو تشخیص داده شد. بانـد پروتئینـی با وزن مولکولی ۶۳ کیلو دالتون (باند ۲) در رقـم اکـاپی

مشاهده نشد در صورتی که بیان باندهای ۳ و ۵ به ترتیب با وزن تقریبی ۵۱ و ۲۲ کیلو دالتون در رقم الایت تشخیص داده نشد. این بررسی نشان داد که رقم تاسیلو علاوه بر دارا بودن بیشترین محتوای پروتئین محلول کل نسبت به سایر ارقام، دارای بیشترین سطح بیان نسبی باندهای ۱، ۲ و ۴ نیز بود.

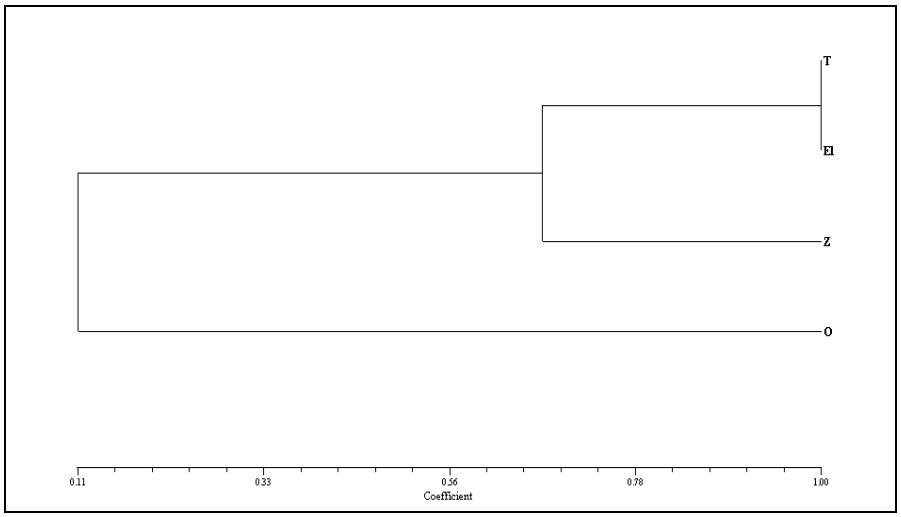


شکل ۲- A) الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر (SSPs) چهار رقم کلزا به ترتیب شامل: تاسیلو (T)، الایت (El)، زرفام (Z) و اکاپی (Oc) و M: نشانگر پروتئینی؛ B) آنالیز میزان بیان نسبی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر چهار رقم کلزا. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±Std.



شکل ۳- A) الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ‌های لپه‌ای چهار رقم کلزا به ترتیب شامل: تاسیلو (T)، الایت (El)، زرفام (Z) و اکاپی (Oc) و M: نشانگر پروتئینی؛ B) آنالیز میزان بیان نسبی پروتئین‌های برگ‌های لپه‌ای چهار رقم کلزا. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± Std.

بر اساس حضور و عدم حضور (غیاب) باندهای پروتئینی ویژه‌ای شامل باندهای ۳، ۴ و ۵ در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر روابط خویشاوندی چهار رقم منتخب کلزا در این مطالعه بررسی شد. این نتایج نشان داد که ارقام تاسیلو و الایت دارای بیشترین شباهت با یکدیگر بوده، رقم اکاپی کمترین شباهت را با سایر ارقام داشت. همچنین، ارقام تاسیلو و الایت بیشترین شباهت را با رقم زرفام داشتند (شکل ۴).



شکل ۴- دندروگرام بررسی روابط خویشاوندی بر اساس باندهای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر (SSPs) در بذر چهار رقم کلزا به ترتیب شامل: تاسیلو (T)، الایت (El)، زرفام (Z) و اکاپی (Oc). داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± Std.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، محتوای پروتئین محلول کل در بذر هیچ کدام از ارقام منتخب کلزا تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. نتایج این بررسی با نتایج به دست آمده از مطالعه محتوای پروتئین محلول کل در چهار رقم پسته ایرانی مشابه بود (Ehsanpour *et al*., 2010). اثر پذیری پروتئین‌های موجود در بافت‌های رویشی گیاهان (VSPs) از شرایط کشت و تغییرات محیطی احتمالاً می‌تواند یکی از دلایل متفاوت بودن محتوای پروتئین محلول کل برگ‌های لپه‌ای بین ارقام مورد مطالعه کلزا در این تحقیق باشد.

پروتئین‌ها، ترکیباتی ضروری در اغلب عملکردهای سلولی هستند. شناساگرهای پروتئینی به ویژه پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود در بذر گیاهان (SSPs) به دلیل عدم تأثیر پذیری از شرایط محیطی (Magni *et al*., 2007) و پایدارتر بودنشان نسبت به پروتئین‌های موجود در بافت‌های رویشی، ابزار و تکنولوژی معتبر و قدرتمندی در شناسایی ارقام و گونه‌های گیاهی معرفی شدند (Jha and Ohri, 1996؛ Javid *et al*., 2004؛ Iqbal *et al*., 2005؛ Seferoglua *et al*., 2006؛ Criley *et al*., 2008). بنابراین، پروفایل الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذرها می‌تواند باندهای پروتئینی ویژه‌ای را به صورت نشانگر مطرح نماید (Razavizadeh and Ehsanpour, 2013). بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی بر پایه نشانگرهای مولکولی مانند پروتئین‌ها می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نباتات نقش تعیین‌کننده‌ای داشته باشد. در مطالعه حاضر، عدم بیان ۳ باند پروتئینی در ژل مربوط به دانه شامل باندهای ۶۷ (باند ۳)، ۶۲ (باند ۴) در رقم اکاپی و ۴۵ کیلو دالتونی (باند ۵) در ارقام تاسیلو و الایت و نیز سه باند پروتئینی در ژل مربوط به برگ‌های لپه‌ای شامل باند ۶۳ (باند ۲) در رقم اکاپی، ۵۱ (باند ۳) و ۲۲ کیلو دالتونی (باند ۵) در رقم الایت به عنوان نشانگرهای پروتئینی ارقام منتخب کلزا شناخته شد. به طور مشابه، در مطالعات قبلی، شناسایی واریته‌های Ipomoea (Das and Mukherjee, 1995)، ارقام پسته ایرانی

(Ehsanpour *et al*., 2010) و برخی ارقام سویا (Razavizadeh and Ehsanpour, 2013) بر پایه مطالعه الگوی پروتئینی SSPs صورت گرفته است. علاوه بر این، شناساگرهای پروتئینی SSPs به منظور بررسی روابط تاکسونومیک و تشخیص واریته‌های کشت شده برخی گونه‌های گیاهان مهم زراعی مانند: blackgram (Ghafoor *et al*., 2002؛ Ghafoor and Ahmad, 2005)، *Capsicum annuum* L. (Anu and Peter, 2003)، *Solanum* (Menella *et al*., 1999)، *Vigna* spp. (Rao *et al*., 1992)، *Arachis hypogaea* (Javid *et al*., 2004)، wheat (Siddigui and Naz, 2009) و *Vigna unguiculata* (Win *et al*., 2011) نیز به کار گرفته شده است. بنابراین، این دسته از نشانگرهای مولکولی قابل به کارگیری در تشخیص و جداسازی ارقام مختلف *Brassica* نیز هستند.

نتایج حاصل از بررسی روابط خویشاوندی بر پایه حضور یا عدم حضور باندهای پروتئینی خاص در ژل مربوط به دانه نشان داد که ارقام تاسیلو و الایت بیشترین شباهت را با یکدیگر را داشتند. مشابه با مطالعه حاضر، حضور و غیاب باندهای پروتئینی در مطالعات پیشین نیز برای تشخیص تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی گونه‌های عدس (Ahmad *et al*., 1997) و ارقام پسته ایرانی (Ehsanpour *et al*., 2010) استفاده شده است.

سپاسگزاری

نویسندگان لازم می‌دانند ازحمایت‌های دانشگاه پیام نور مرکز نجف‌آباد برای انجام این پژوهش قدردانی نمایند.

منابع

Aebersold, R. and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422: 198-207.

Agrawal, G. K., Yonekura, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H. and Rakwal, R. (2005) System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part I: technologies in proteome establishment. Journal of Chromatogr B 815: 109-123.

Ahmad, M., Fautrer, A. G., Burritt, D. J. and Mcneil, D. L. (1997) Genetic diversity and relationships in Lens species and their F1 interspecific hybrids as determined by SDS-PAGE. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 25(2): 99-108.

Anu, A. and Peter, K. V. (2003) Analysis of seed protein of 29 lines of *Capsicum annuum* L. by polyacrylamide gel electrophoresis. Genetic Resources and Crop Evolution 50: 239-243.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistry 72: 248-254.

Bybordi, A. (2010) Effects of salinity and N on the Growth, photosynthesis and N Status of canola (*Brassica napus* L.). Notulae Scientia Biologicae 2(2): 92-97.

Criley, R. A., Roh, M. S., Kikuchi, M. and Manshardt, R. M. (2008) A comparison of *Gardenia augusta* cultivars using isozymes and RAPD markers. Acta Horticulturae 766:

461-468.

Das, S. and Mukherjee, K. K. (1995) Comparative study on seed proteins of Ipomoea. Seed Science and Technology 23(2): 501-509.

Ehsanpour, A. A., Shojaie, B. and Roatami, F. (2010) Characterization of seed storage protein patterns of four Iranian Pistachios using SDS-PAGE. Natural Science 2(7): 737-740.

Ghafoor, A. and Ahmad, Z. (2005) Diversity of agronomic traits and total seed protein in blackgram *Vigna mungo* (L.) Hepper. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 47(2): 69-75.

Ghafoor, A., Ahmad, Z., Qureshi, A. S. and Bashir, M. (2002) Genetic relationship of *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilezek based on morphological traits and SDS-PAGE. Euphytica 123: 367-378.

Goffman, F. D., Ruckle, M., Ohlrogge, J. and Shachar-Hill, Y. (2004) Carbon dioxide concentrations are very high in developing oilseeds. Plant Physiology and Biochemistry 42: 703-708.

Gorg, A., Weis, W. and Dunn, M. J. (2003) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 4: 3665-3685

Gunstone, D. F., Harwood, J. L. and Padley, F. B. (1995) The lipid handbook. Chapman and Hall, London.

Hill, L. M., Morley-Smith, E. R. and Rawsthorne, S. (2003) Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. Plant Physiology 131: 228-236.

Iqbal, S. H., Ghafoor, A. and Ayub, N. (2005) Relationship between SDS-PAGE markers and *Ascochyta blight* in chickpea. Pakistan Journal of Botany 37(1): 87-96.

Javid, A., Ghafoor, A. and Anwar, R. (2004) Seed storage protein electrophoresis in groundnut for evaluating genetic diversity. Pakistan Journal of Botany 36(1): 25-29.

Jha, S. S. and Ohri, D. (1996) Phylogenetic relationships of *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. (pigeonpea) and its wild relatives based on seed protein profiles. Genetic Resources and Crop Evolution 43(3): 27-281.

Kakaei, M. and Kahrizi, D. (2011) Study of seed proteins pattern of *brassica napus* varieties via sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis. International Research Journal of Biotechnology 2(1): 026-028.

Kubis, S. E., Pike, M. J., Everett, C. J., Hill, L. M. and Rawsthorne, S. (2004) The import of phosphoenolpyruvate by plastids from developing embryos of oilseed rape *Brassica napus* (L.) and its potential as a substrate for fatty acid synthesis. Journal of Experimental Botany 55: 1455-1462.

Magni, C., Scarafoni, A., Herndl, A., Sessa, F., Prinsi, B., Espen, L. and Duranti, M. (2007) Combined 2-D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome. Phytochemistry 68: 997-1007.

Menella, G., Sanaja, V. O., Tonini, A. and Magnifico, V. (1999) Seed storage protein characterization of *Solanum* sp. and of cultivars and androgenetic lines of *S. melogena* L. by SDS-PAGE and AE-HPLC. Seed Science and Technology 27: 23-35.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nasr, N., Khayami, M., Heidari, R. and Jamei, R. (2006) Genetic diversity among selected varieties of *Brassica napus* (Cruciferae) based on the biochemical composition of seeds. Journal of (University of Tehran) 32(1): 37-40.

Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2007) Lehninger principles of biochemistry. 5th edition, W. H. Freeman and Company, New York.

Norton, G. and Harris, J. F. (1975) Composition changes in developing rape seed (*Brassica napus* L.). Planta 123: 163-174.

Olson, B. J. S. C. and Markwell, J. (2007) Assays for determination of protein concentration. Current Protocols in Protein Science 3.4: 1-29.

Rahman, M. M. and Hirata, Y. (2004) Genetic diversity in Brassica species using SDS PAGE analysis. Journal of Biological Science 4(2): 234-238.

Rao, R., Vagliol, M. D., D'Urzo, M. P. and Month, L. (1992). Identification of *Vigna* spp. through specific seed storage polypeptides. Euphytica 62: 39-43.

Rawsthorne, S. (2002) Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. Progress in Lipid Research 41: 182-196.

Razavizadeh, R. and Ehsanpour, A. A. (2013) Application of seed storage protein marker for identification of seven soybean (*Glycine max*) cultivars. Journal of Cell and Tissue 3(4): 319-326 (in Persian).

Rohlf, F. J. (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York.

Rostami, F. and Ehsanpour, A. A. (2009) Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under *in virto* culture. Malaysian Applied Biology Journal 32(2): 49-54.

Ruuska, S. A., Schwender, J. and Ohlrogge, J. B. (2004) The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. Plant Physiology 136: 2700-2709.

Sadia, M., Salman, A. M., Rabbani, M. A. and Pearce, S. R. (2009) Electrophoretic characterization and the relationship between some *Brassica* species. Electronic Journal of Biology 5(1): 1-4.

Salehi, Z. and McCarthy, J. E. G. (2002) Structure and function of cap-associated proteins in yeast. PhD. Thesis, University of Manchester, Institute of Sciences and Technology (UMIST), Manchester, England.

Sánchez-Romero, C., Perán-Quesada, R., Barceló-Muñoz, A. and Pliego-Alfaro, F. (2002) Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. Plant Physiology and Biochemistry 40: 1043-1049.

Schwender, J. and Ohlrogge, J. B. (2002) Probing *in vivo* metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. Plant Physiology 130: 347-361.

Schwender, J., Ohlrogge, J. B. and Shachar-Hill, Y. (2003) A flux model of glycolysis and the

oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. Journal of Biological Chemistry 278: 29442-29453.

Seferoglua, S., Seferoglua, H. G., Tekintasa, F. E. and Baltab, F. (2006) Biochemical composition influenced by different locations in Uzun pistachio cv. (*Pistacia vera* L.) grown in Turkey. Journal of Food Composition and Analysis 19: 461-465.

Sergeant, K., Pinheiro, C., Hausman, J. F., Ricardo, C. P., and Renaut, J. (2009) Taking advantage of nonspecific trypsin cleavages for the identification of seed storage proteins in cereals. Journal of Proteome Research 8: 3182-3190.

Siddigui, M. F. and Naz, N. (2009) Protein landmarks for diversity assessment in wheat genotypes. African Journal of Biotechnology 8(9): 1855-1859.

Tamkoc, A. and Arsalan, E. (2010) Comparison of agronomic characters, total seed storage proteins and their use for genotypes discrimination in the Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). Biotechnology and Biotechnological Equipment 24(1): 1573-1576.

Win, K. T., Aung, Z. O., New, K. L., Thein, M, S. and Yutaka, H. (2011) Diversity of Myanmar cowpea accessions through seed storage polypeptides and its cross compatibility with the subgenus *Ceratotropis.* Journal of Plant Breeding and Crop Science 3(5): 87-95.

The use of protein patterns in genetic diversity analysis in some *Brassica napus* cultivars

Roya Razavizadeh * and Fatemeh Rostami

Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, PO BOX 19395-3697 Tehran, Iran

Abstract

In this study, protein variations of seeds and five-day old cotyledonal leaves of four selected *Brassica napus* cultivars including Elite, Ocapy, Tasilo and Zarfam were analyzed by SDS-PAGE to identify protein markers. The amount of total soluble protein of seed storage proteins did not show significant differences in all cultivars whereas it was different in cotyledonal leaves. Protein patterns of seeds and cotyledonal leaves showed significant differences using SDS-PAGE and consequence analysis of bands by ImageJ program. Relative expression of six protein bands in seeds and five-day old cotyledonal leaves were significantly different. Three protein markers were identified by protein patterns of seed and cotyledonal leaves. The results of relationship analysis based on presence and absence of the specific protein bands in protein pattern of seed storage proteins showed that Tasilo and Elite cultivars had the highest similarities.

Key words: Canola, Cotyledonal leaves protein, Seed storage protein, Protein markers

* razavi.roya@gmail.com