

مقایسه فاصله ژنتیکی و مورفوفیزیولوژیکی برخی از ژنوتیپ‌های کلزا بر اساس نشانگر SDS-PAGE

مهدی کاکایی¹، علیرضا زبرجدی*^۲، علی مصطفایی³

¹ مربی دانشگاه پیام نور- گروه علمی مهندسی کشاورزی (ژنتیک و اصلاح نباتات)- تهران 4697-19395- ج.ا. ایران. و دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه

² استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، و استادیار گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی، دانشگاه رازی.

³ استاد مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

چکیده

گیاهان دانه روغنی نظیر کلزا نقش مهمی در تولید انرژی برای انسان دارند. اطلاع از تنوع ژنتیکی بر پایه نشانگرهای گوناگون در برنامه‌های به‌نژادی، و از جمله انتخاب والدین نقش مهمی دارد. در تحقیق حاضر، تنوع ژنتیکی 16 ژنوتیپ کلزا به کمک نشانگر پروتئینی SDS-PAGE و صفات مورفوفیزیولوژیکی در شرایط مزرعه و آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت. استخراج پروتئین‌های برگ در مرحله قبل از رسیدگی فیزیولوژیکی انجام شد و غلظت پروتئین‌ها توسط روش برادفورد تعیین گردید. سپس برای تفکیک پروتئین‌های استخراجی، از روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل آمید با کوماسی بلو R-250 و امتیازدهی باندها، تجزیه خوشه-ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد انجام شد و بر این اساس ژنوتیپ‌ها در دو کلاس مجزا قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای صفات مورفوفیزیولوژیکی نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در 5 گروه قرار می‌گیرند. به منظور تعیین همبستگی بین صفات مورفوفیزیولوژیکی و ملکولی از آزمون مانتل استفاده گردید و همبستگی معنی‌داری بین صفات مورفوفیزیولوژیکی و داده‌های ملکولی مشاهده شد. بنابراین، با توجه به فواصل ژنتیکی ژنوتیپ‌ها نسبت به هم، در برنامه‌های به‌نژادی برای بدست آوردن بالاترین مقدار هتروزیس، تلاقی ژنوتیپ‌های Milena و Opera و نیز ژنوتیپ‌های Dante با Sahara با توجه ضرایب تشابه نشانگرهای مورفوفیزیولوژیکی قابل توجیه است.

واژه‌های کلیدی: کلزا، نشانگر پروتئینی، فاصله ژنتیکی، صفات زراعی

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.)، از تیره چلیپاییان می باشد که یک گونه آمفی دیپلوئید طبیعی حاصل از تلاقی گونه روغنی (*B. rapa*) با شلغم روغنی (*B. oleracea*) و دو برابر شدن کروموزوم های هیبرید حاصل می باشد. کلزا گیاه روغنی نسبتاً جدیدی است که امروزه به طور گسترده در بسیاری از کشورها کشت می شود (Weiss, 1983). دانه های روغنی پس از غلات دومین ذخایر غذایی جهان را تشکیل می دهند، این محصولات علاوه بر دارا بودن ذخایر غنی اسید چرب، حاوی پروتئین هم هستند. کلزا به عنوان یکی از مهمترین گیاهان روغنی در سطح جهان مطرح بوده و حدود 13 درصد روغن خوراکی جهان را تأمین می کند. کلزا در بین گیاهان روغنی، بدلائل زیادی از اولویت برخوردار است و به جهت نیاز کشور به دانه های روغنی، همواره سطح زیر کشت آن در حال افزایش است (Kakaei et al., 2009-a).

وجود تنوع ژنتیکی جهت انتخاب والدین در برنامه های اصلاح نباتات دارای اهمیت زیادی می باشد. از جمله روش های بررسی تنوع ژنتیکی، می توان به روش های مورفولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی اشاره کرد. اطلاع درباره تنوع و ارتباط ژنتیکی میان ژنوتیپ ها کمک بزرگی در تعیین راهبردهای توسعه محصولات به شمار می رود. الکتروفورز ژل اکریل آمید با حضور سدیم دو دسیل سولفات از جمله تکنیک های پر استفاده

است که در جدا سازی و تشخیص پروتئین کارآیی بالایی دارد (Laemmler, 1970). پروتئین ها بطور مستقیم توسط اسیدهای نوکلئیک کد گذاری می شوند بنابراین از نظر ژنتیکی، اختلاف در پروتئین ها باید در تغییر رفتار الکتروفورزی بیان شود (Mahmoudzadeh et al., 2003).

Shahnejate-Bushehri و همکاران (2005)، در مطالعه مقایسه فاصله ژنتیکی و مورفولوژیکی با هتروزیس بر اساس نشانگر RAPD در هیبریدهای جو گزارش کردند که الگوی نواری RAPD هیچ همسویی با صفات مورفولوژیک و زراعی نداشته است. Fareghi و همکاران (2007)، پروتئین های بذر و برگ یونجه را با SDS-PAGE مورد بررسی قرار دادند و تنوع بانندی را بین آنها مشاهده کردند.

در سال 2004، Mukhlesur & Hirata فاصله ژنتیکی گونه های مختلف کلزا را بر اساس الگوی بانندی پروتئین (SDS-PAGE) بذر و برگ، مطالعه و تنوع بانندی را بین آنها گزارش کردند. مطالعه فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگرهای ملکولی و مورفولوژیکی توسط دیگر محققان گزارش شده است (Fufa et al., 2005; Abbasi et al., 2009; Celebi et al., 2009; Kakaei et al., 2009).

تحقیق حاضر با اهداف زیر اجراء گردید:

(1) بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های مختلف کلزا بر اساس نشانگر پروتئینی، (2) مقایسه نتایج حاصل از روش های مورفوفیزیولوژیکی و ملکولی بر اساس نشانگر پروتئینی در تعیین تنوع

رسیدگی فیزیولوژیک، ارتفاع بوته، نشت یونی به روش (Jiang & Huang, 2002)، قطر ساقه و تاریخ سبز شدن بودند. کلیه صفات فوق الذکر بر اساس روش‌های معمول و استاندارد اندازه‌گیری شدند (Kakaei, 2009).

استخراج پروتئین برگ

نمونه 0/3 گرمی از برگ‌های گیاهی (به تصادف از سه گیاه) برداشت شده از هر پلات داخل هاون چینی در ازت مایع کوبیده و پودر شد. سپس 0/8 میلی‌لیتر بافر استخراج کننده حاوی (تریس 50 میلی مولار با pH 8/5 حاوی 1 EDTA میلی مولار، 1 PMSF میلی مولار، 2- NP-40، 0/2، 20 MgCl₂ میلی مولار، 2 Mercaptoethanol) مخلوط گردید بر روی نمونه‌ها در میکروتیوپ‌های 2 میلی‌لیتری اضافه گردید. محتویات داخل هاون با بافر استخراج کاملاً مخلوط گردید، و به‌صورت همگن در آمد. میکروتیوپ‌ها به مدت یک ساعت در یخچال (4 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و سپس 1 میلی‌لیتر از مخلوط TCA- Aseton به میکروتیوپ‌ها اضافه شد، و به مدت 1 ساعت در دمای 20- نگهداری شد. سپس میکروتیوپ‌ها با دور 13500 rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد، به رسوب باقیمانده استون اضافه کرده و پس از 0/5 ساعت نگهداری در یخچال، سانتریفیوژ در مدت 10 دقیقه در دمای یخچال و دور 13500 rpm انجام گرفت و محلول رویی

ژنوتیپ‌ها و (3) دسته‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای صفات مورفوفیزیولوژیکی و ملکولی.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این آزمایش 16 ژنوتیپ کلزا بشرح جدول 1 در سال زراعی 87-1386 در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی¹ (RCBD) با 3 تکرار، در مزرعه آزمایشی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی با اقلیم نیمه خشک سرد تا معتدل مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر کرت شامل 5 خط 3 متری به فاصله 30 سانتی‌متر و فاصله کرت‌ها از هم 60 سانتی‌متر بود. صفات اندازه‌گیری شده شامل عملکرد دانه، تعداد دانه در نیام، طول نیام، تعداد نیام در شاخه اصلی، تعداد نیام در شاخه فرعی، تعداد شاخه فرعی در بوته، وزن هزار دانه، قطر نیام، میزان قند محلول به روش (Kennedy, 1987)، میزان تجمع پرولین (Bates et al., 1973)، پروتئین کل (Mostafaie, 2003)، مقدارنسبی آب برگ (Egret & Tevini, 2002)، میزان آب نگهداری شده در برگ‌های قطع شده، کاهش نسبی آب برگ (Tourneux et al., 2003)، میزان آب نسبی از دست رفته (Yang et al., 1991)، فلورسانس، درصد سبزینگی برگ، تعداد روز تا نیام‌دهی کامل، تعداد روز تا اواسط گلدهی، طول دوره پر شدن دانه، تعداد روز تا

¹- Randomized Complete Block Design

رنگ‌بری آن توسط محلول رنگ بر (متانول) اسیداستیک گلاسیال و آب مقطر تا روشن شدن زمینه ژل ادامه یافت و سپس ژل توسط اسکن نوع HP، اسکن گردید. مطالعات الکتروفورزی مواد در آزمایشگاه الکتروفورز مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گرفت.

رتبه‌بندی و تجزیه آماری داده‌ها

باندها بر اساس حضور و عدم حضور در هر نمونه امتیازدهی شدند. ماتریس دو طرفه ارقام و متغیرها بر اساس صفر و یک تشکیل شده و سپس آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTsys pc Version 2.02e انجام گرفت. تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت و در نهایت دندروگرام بر اساس روش UPGMA ترسیم شد. جهت بررسی همسویی و مقایسه نتایج داده‌های ملکولی و داده‌های زراعی از آزمون مانتل استفاده گردید. بدین منظور داده‌های کمی کد گذاری گردیده و به داده‌های کیفی تبدیل گردیدند، سپس ماتریس ضرایب تشابه جاکارد برای آنها محاسبه گردید. به منظور انجام آزمون مانتل محاسبه ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های کمی (مربوط به اندازه‌گیری‌های مورفوفیزیولوژیکی) و داده‌های کیفی (مربوط به باندهای پروتئینی) لازم است ابتدا، با روش کدگذاری داده‌های کمی به کیفی تبدیل شده و سپس ماتریس تشابه آن‌ها محاسبه شود. رسم

دور ریخته شد و پودر سفید رنگ (پروتئین استخراجی) باقی می‌ماند. بعد از استخراج پروتئین‌های برگ، مقدار پروتئین به روش (Bradford, 1979) اندازه‌گیری شد.

الکتروفورز پروتئین برگ استخراجی

در این تحقیق برای الکتروفورز پروتئین از روش SDS-PAGE استفاده شد. SDS-PAGE در ژل جدا کننده 12/5 درصد و ژل متراکم کننده 5 درصد به روش لاملی با بعضی تغییرات انجام گرفت (Mostafaie, 2003). ابتدا مقدار پروتئین نمونه‌ها به روش فوق تعیین و سپس مقدار 15 میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل بار گذاری گردید. از پروتئین‌های اوترانسفرین (78 کیلو دالتون)، آلبومین گاوی (66 کیلو دالتون)، اوآلبومین (45 کیلو دالتون)، اکتینیدین (29 کیلو دالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (18 کیلو دالتون) و لیزوزیم (14 کیلو دالتون) به عنوان نشانگر در ژل استفاده گردید. الکتروفورز با ولتاژ 50 ولت در ژل متراکم کننده به مدت 0/5 ساعت و ولتاژ 150 ولت در ژل جدا کننده به مدت 1/5 ساعت با دستگاه پاور ساپلای نوع Vocam انجام شد.

رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید

بعد از الکتروفورز، کار رنگ آمیزی با کوماسی بلو بریلیانت R-250 صورت گرفت، پس از 1 ساعت قرار گرفتن ژل در محلول رنگ،

دادند. بر اساس ماتریس تشابه بر مبنای ضریب جاکارد (جدول 2) کمترین تشابه و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ های Rainbow با Celecious، Licord با ARC-5 با ضریب تشابه صفر می باشد. که می توان جهت بدست آوردن بیشترین مقدار هتروزیس، از تلاقی آنها بهره برد، و بیشترین تشابه و کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به ژنوتیپ Milena با Dante، SLM-046، Geronimo و Zarfam با ضریب تشابه 1 و ژنوتیپ Celecious با ARC-5 - Geronimo با SLM-046 - Zarfam و Geronimo و ARC-2 با Talent دارای ضریب تشابه 1 بودند.

هیستوگرام آزمون مانتل نشانگر پروتئینی با داده های زراعی توسط نرم افزار XL-STAT انجام پذیرفت.

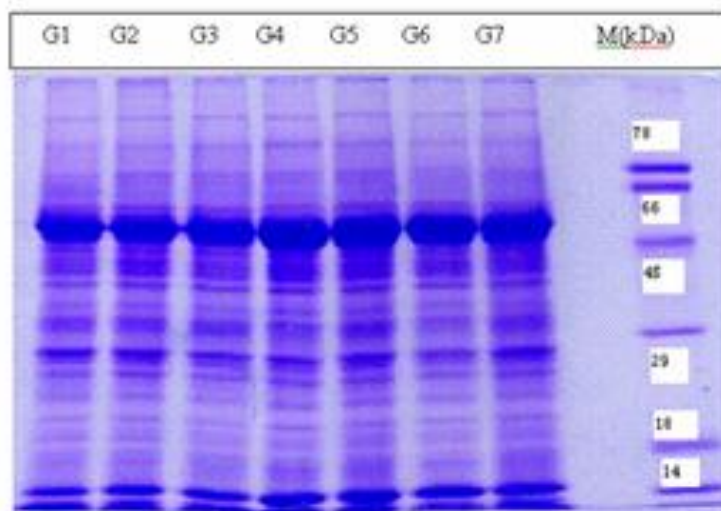
نتایج و بحث

در مجموع برای ژنوتیپ های مورد مطالعه 35 باند (شامل باندهای ضعیف و قوی) مشاهده گردید (شکل 1 و 2)، اگرچه باندهای پروتئینی مشترک زیادی در بین ژنوتیپ های مذکور وجود داشت، اما باندهای اختصاصی نیز مشاهده گردید که خاص هر ژنوتیپ بودند. باندهای پروتئینی علاوه بر اینکه از نظر محل قرار گرفتن روی ژل و وزن ملکولی متفاوت بودند از نظر تراکم و شدت نیز با یکدیگر تفاوت نشان

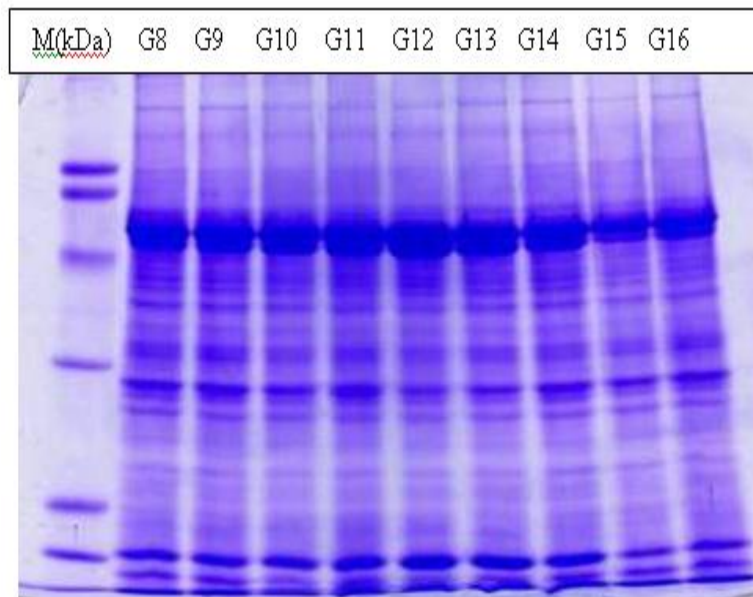
جدول 1- ژنوتیپ های مورد استفاده در آزمایش.

کد ژنوتیپ	ژنوتیپ	مبداء
Genotype code	Genotypes	Source
G1	Licord	Germany
G2	Milena	Germany
G3	Sahara	Danisco
G4	Celecious	Svalof
G5	Sunday	Danisco
G6	Talaye	Iran
G7	Shiralee	Australia
G8	Dante	Germany
G9	ARC-2	U.S.A
G10	ARC-5	U.S.A
G11	SLM-046	Germany
G12	Geronimo	Rostica-france
G13	Zarfam (Reg*Cob)	Iran
G14	Talent	Germany
G15	Rainbow	Australia
G16	Opera	Sw-sweden

Table 1- Genotypes used in experiment.



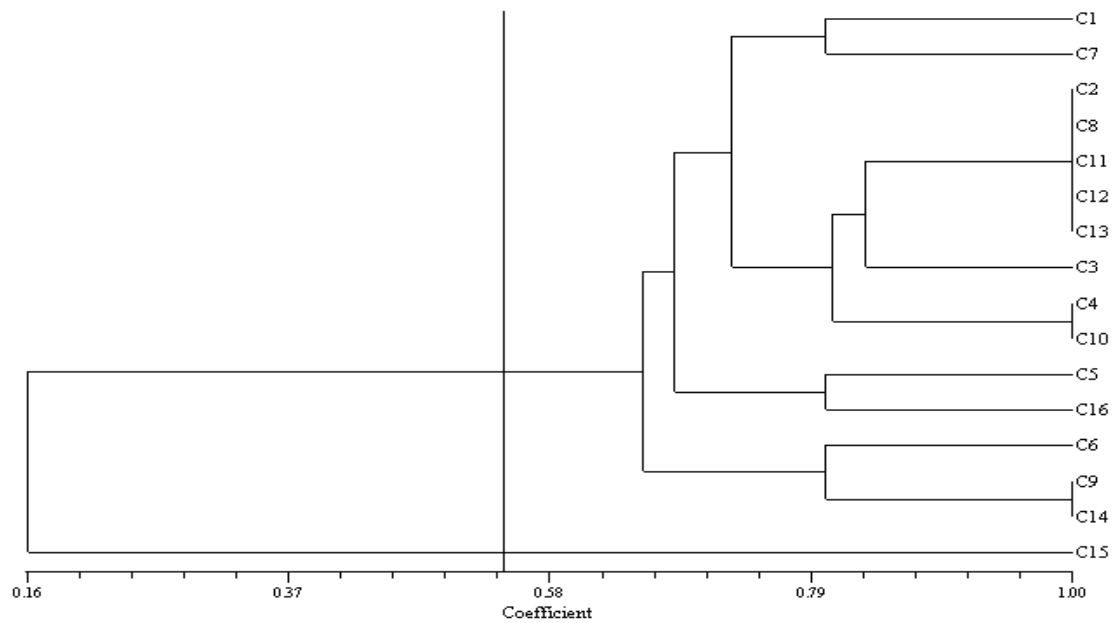
شکل 1- تفکیک پروتئین‌های محلول برگ‌ی ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده SDS-PAGE.
Genotypes: (G1)Milena, (G2) Sahara, (G3) Celecious, (G4) Sunday, (G5) Talaye,
(G6)Shiralee and (G7)Licord.
Figure 1- Separation of soluble leaf proteins of rapeseed genotypes using SDS-PAGE.



شکل 2- تفکیک پروتئین‌های محلول برگ‌ی ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده SDS-PAGE.
Genotypes: (G8) Dante, (G9) ARC-2, (G10)ARC-5, (G11)SLM-046, (G12)Geronimo,
(G13)Zarfam, (G14) Talent, (G15) Rainbow, (G16) Opera
Figure 2- Separation of soluble leaf proteins of rapeseed genotypes using SDS-PAGE.

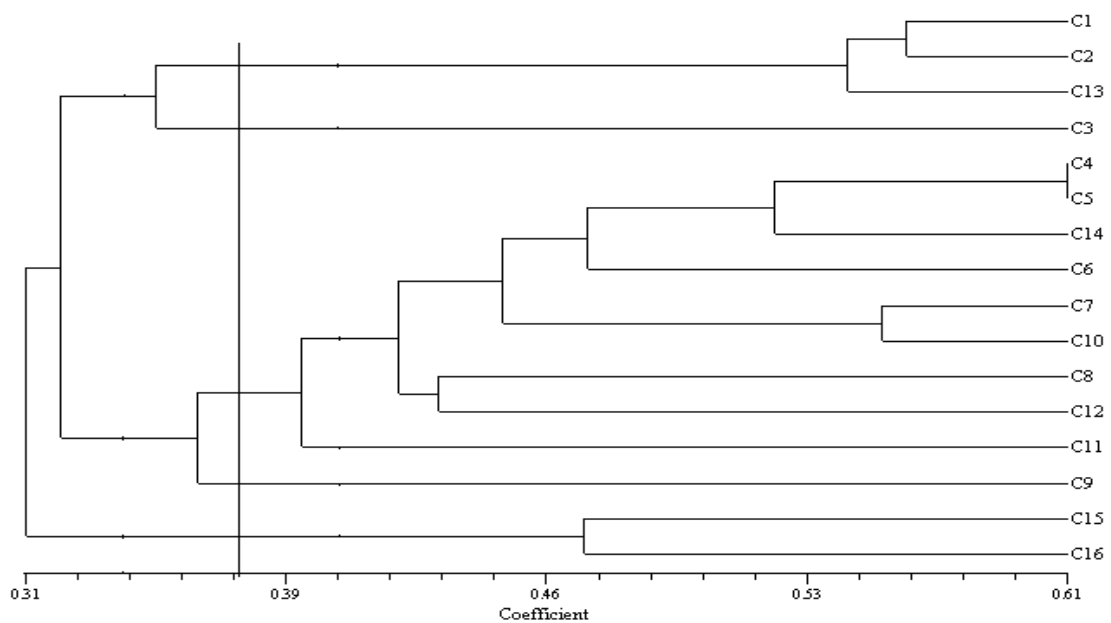
شامل ژنوتیپ‌های 1، 2 و 13، گروه دوم ژنوتیپ شماره 3، گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های (4، 5، 6، 7، 8، 10، 11، 12 و 14)، گروه چهارم ژنوتیپ 9 و در گروه پنجم ژنوتیپ‌های 15 و 16 قرار گرفت. ماتریس ضریب تشابه جاکارد حاصل از نشانگر پروتئینی و داده‌های مورفوفیزیولوژیکی با استفاده از آزمون مانتل با هم مقایسه شدند (شکل 5). نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌هایی که بر اساس داده‌های کمی شباهت بیشتری با هم دارند از نظر داده‌های ملکولی (نشانگر پروتئینی) نیز شباهت بیشتری با هم دارند، در نتیجه تنوع در سطح مولکولی، تنوع در سطح مزرعه را تأیید می‌کند. بنابراین در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تنوع وجود داشته که با توجه به فواصل ژنتیکی ژنوتیپ‌ها نسبت به هم در برنامه‌های به‌نژادی برای بدست آوردن بالاترین مقدار هتروزیس، تلاقی ژنوتیپ Milena و Opera و نیز ژنوتیپ‌های Dante با Sahara با توجه ضرایب تشابه نشانگرهای مورفوفیزیولوژیکی قابل توجیه است. جهت موفقیت برنامه‌های به‌نژادی، اطلاع از میزان قرابت ژنتیکی والدین حائز اهمیت است. بر اساس نتایج بدست آمده تنوع ژنتیکی خوبی بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی وجود دارد.

شکل 3 دندروگرام حاصل از نشانگر پروتئینی بر اساس ضریب جاکارد را نشان می‌دهد (ضریب کوفتتیک برای آن $r = 0/9$ می‌باشد که برآزش مناسب دندروگرام با داده‌ها را نشان می‌دهد). با توجه به این تجزیه، ژنوتیپ‌ها در فاصله 0/58 در دو گروه قرار گرفت: گروه اول شامل ژنوتیپ‌های 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14 و 16 و گروه دوم شامل ژنوتیپ شماره 15 می‌باشد. جدول 3 ماتریس تشابه جاکارد بر اساس نشانگر مورفوفیزیولوژیکی (داده‌های زراعی) را نشان می‌دهد. بر اساس داده‌های جدول 3 مشخص شد که کمترین تشابه و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ Milena و Opera با ضریب تشابه 0/17 و ژنوتیپ Dante با Sahara با ضریب تشابه 0/17، ژنوتیپ Licord با ژنوتیپ Geronimo و Licord با ضریب تشابه 0/18 بود. بر طبق جدول مذکور بیشترین شباهت و کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به ژنوتیپ Sunday با Celecious با ضریب تشابه 0/61 می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های مورفوفیزیولوژیکی بر اساس ضریب جاکارد در شکل 4 ارائه شده است. بر اساس این تجزیه، ژنوتیپ‌ها در فاصله 0/39 به 5 گروه تقسیم شدند: گروه اول



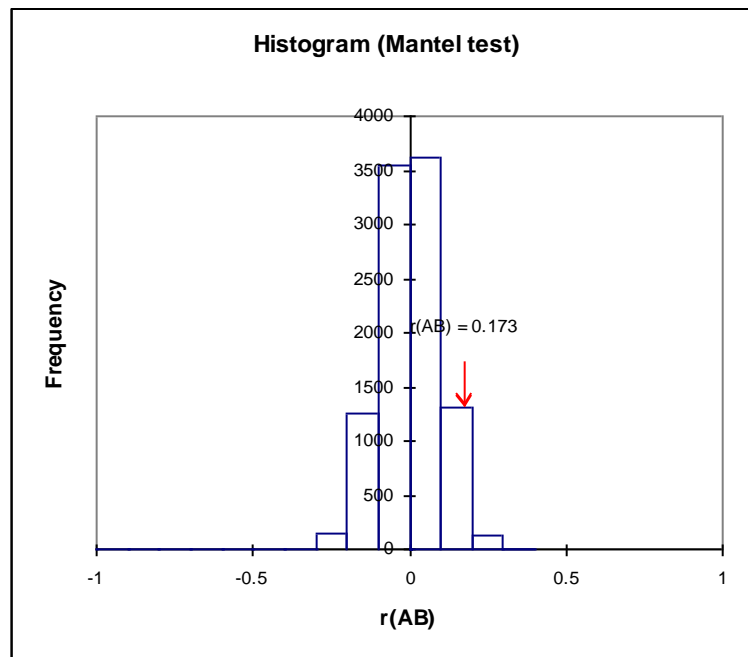
شکل 3- دندروگرام حاصل از نشانگر پروتئینی بر اساس ضریب جاکارد.

Figure 3- Dendrogram obtained from protein markers based on the Jaccard's coefficient.



شکل 4- دندروگرام حاصل از داده‌های کیفی مورفوفیزیولوژیک بر اساس ضریب جاکارد.

Figure 4- Dendrogram obtained from qualitative of morpo-physiological data based on the Jaccard's coefficient.



شکل 5- هیستوگرام آزمون مانتل نشانگر پروتئینی با داده‌های مورفوفیزیولوژیکی. این نمودار توزیع p -value دو دامنه را نشان می‌دهد (فلش قرمز مقدار p -value مربوط به همبستگی محاسبه شده را نشان می‌دهد). بنابراین با توجه به این مقدار می‌توان در مورد مقدار همبستگی و معنی دار بودن آن قضاوت نمود.

Figure 5- Histogram of Mantel test for protein marker with morpho-physiological data. This graph was shown two tailed distribution of P-value (the red arrow revealed the amount of P-value related to calculated correlation). Thus according to it, the amount and significance of correlation could be Judged.

اساس ضریب تشابه جاکارد مطالعه کردند، و جمعیت‌هایی که بیشترین فاصله ژنتیکی را با هم داشتند جهت تلاقی و دستیابی به بیشترین هتروزیس پیشنهاد کردند. Salem و همکاران (2008)، در مطالعه تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های گندم بر اساس نشانگر DNA (ریزماهواره) و صفات مورفولوژیکی تفاوت معنی‌داری در بین واریته‌های مورد مطالعه بر اساس صفات مورفولوژیکی و نشانگر مولکولی میکروساتلایت گزارش کردند. Moradi (2008)، ماتریس‌های

بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس صفات زراعی، نشانگرهای پروتئینی، ایزوزیم‌ها و نشانگرهای DNA به‌طور جداگانه و همزمان توسط محققین مختلف در برخی گیاهان گزارش شده است (Rousseeuw, 1990; Weegels *et al.*, 1996; Waines & Murphy 2005; Kole, 2006; Bhutta, 2006; Kumar & Miaja, 2007; Leal *et al.*, 2008; Hettel *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2007). Rafezi و همکاران (2009) کاربرد نشانگر بیوشیمیایی (پروتئین‌ها) در مطالعه جمعیت‌های آگروپیرون و بررسی تشابه بین گونه‌ها را بر

از صفات مورفولوژیکی با نشانگرهای پروتئینی و RAPD حاکی از تفاوت بین روش‌ها در تعیین تنوع ژنتیکی می‌باشد. ضریب همبستگی بین صفات مورفولوژیکی و نشانگر پروتئینی (گلیادین) 0/183، بین صفات مورفولوژیکی و نشانگر RAPD، 0/088 در حالیکه ضریب همبستگی بین نشانگر پروتئینی و نشانگر RAPD، 0/106 محاسبه گردید. Raouda و همکاران (2007) تنوع ژنتیکی و روابط بین 14 ژنوتیپ جو را با استفاده از نشانگرهای SSR و صفات فیزیولوژیکی ارزیابی نمودند. اگرچه بر مبنای آزمون مانتل همبستگی پائینی ($r=0.276$) بین روش‌های مورد استفاده دیده شد اما هر کدام از روش‌ها به تنهایی تنوع قابل توجهی را بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند. در مجموع پیشنهاد می‌گردد جهت برنامه‌های اصلاحی علاوه بر در نظر گرفتن صفات مهم مورفوفیزیولوژیک از صفات مولکولی (در سطح DNA و پروتئین) و روابط بین آنها بهره گرفته شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت مالی دانشگاه رازی و مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و کلیه عزیزانی که ما را در اجراء تحقیق و بازبینی مقاله (از جمله سرکار خانم مهندس لیلا زارعی) یاری نموده‌اند کمال تشکر می‌گردد.

تشابه حاصل از نشانگر RAPD و داده‌های زراعی در برخی ژنوتیپ‌های گندم دوروم را با استفاده از آزمون مانتل را مقایسه کرد و مشاهدات زراعی و نشانگر RAPD را همسو گزارش کرد، که با نتایج مطالعه حاضر مطابق بود. Yu و همکاران (2005)، فواصل ژنتیکی بین لاین‌های کلزا (*Brassica napus*) را بر اساس صفات مورفولوژیکی، ایزوزیم‌ها، پروتئین‌ها و نشانگرهای DNA به‌منظور پیش بینی عملکرد و هتروزیس هیبریدها مورد استفاده قرار دادند. فواصل ژنتیکی بدست آمده بر اساس صفات مورفولوژی از 0/455 تا 0/833 با میانگین 0/648، بر اساس صفات مولکولی (RAPD) از 0/309 تا 0/553 با میانگین 0/434 و بر مبنای نشانگر پروتئینی از 0/143 تا 0/535 با میانگین 0/297 محاسبه شد. نتایج مطالعه همبستگی بین این سه نوع فواصل ژنتیکی بدست آمده نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. از طرف دیگر تشابه ژنتیکی بین کلیه والدین بر مبنای نشانگر پروتئینی و ایزوزیم‌ها بیشتر از تشابه بر اساس داده‌های مولکولی و مورفولوژیکی بود. Ojaghi & Akhundova (2010) در مطالعه تنوع ژنتیکی 102 لاین گندم دابل هاپلوئید از صفات مورفولوژیکی، نشانگرهای پروتئینی و RAPD استفاده نمودند. نتایج بدست آمده بیانگر استفاده همزمان از هر سه روش برای مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گندم نان می‌باشد. همچنین مقایسه دندروگرام بدست آمده

جدول 2- ماتریس تشابه جاکارد بر اساس نشانگر پروتئینی (داده‌های مولکولی).

	Licord	Milena	Sahara	Celecious	Sunday	Talaye	Shiralee	Dante	ARC-2	ARC-5	SLM-046	Gernimo	Zarfam	Talent	Rainbow	Opera
Milena	0.667															
Sahara	0.500	0.833														
Celecious	0.800	0.833	0.667													
Sunday	0.500	0.833	0.667	0.667												
Talaye	0.333	0.667	0.500	0.500	0.500											
Shiralee	0.800	0.833	0.667	0.667	0.667	0.500										
Dante	0.667	1.000	0.833	0.833	0.833	0.667	0.833									
ARC-2	0.500	0.833	0.667	0.667	0.667	0.800	0.667	0.833								
ARC-5	0.800	0.833	0.667	1.000	0.667	0.500	0.667	0.833	0.667							
SLM-046	0.667	1.000	0.833	0.833	0.833	0.667	0.833	1.000	0.833	0.833						
Gernimo	0.667	1.000	0.833	0.833	0.833	0.667	0.833	1.000	0.833	0.833	1.000					
Zarfam	0.667	1.000	0.833	0.833	0.833	0.667	0.833	1.000	0.833	0.833	1.000	1.000				
Talent	0.500	0.833	0.667	0.667	0.667	0.800	0.667	0.833	1.000	0.667	0.833	0.833	0.833			
Rainbow	0.000	0.167	0.200	0.000	0.200	0.250	0.200	0.167	0.200	0.000	0.167	0.167	0.167	0.200		
Opera	0.600	0.667	0.500	0.500	0.800	0.333	0.800	0.667	0.500	0.500	0.667	0.667	0.667	0.500	0.250	1

Table 2- Jaccard's similarity matrix based on protein marker (molecular data).

جدول 3- ماتریس تشابه جاکارد بر اساس نشانگر مورفوفیزیولوژیکی (داده‌های زراعی).

	Licord	Milena	Sahara	Celecious	Sunday	Talaye	Shirale	Dante	ARC-2	ARC-5	SLM-046	Gernimo	Zarfam	Talent	Rainbow	Opera
Milena	0.56															
Sahara	0.41	0.32														
Celecious	0.36	0.35	0.36													
Sunday	0.35	0.33	0.35	0.61												
Talaye	0.26	0.30	0.32	0.46	0.57											
Shirale	0.32	0.44	0.25	0.55	0.39	0.43										
Dante	0.27	0.45	0.17	0.42	0.52	0.43	0.45									
ARC-2	0.39	0.30	0.32	0.48	0.33	0.43	0.44	0.38								
ARC-5	0.29	0.33	0.42	0.50	0.48	0.39	0.56	0.41	0.40							
SLM-046	0.29	0.40	0.29	0.53	0.48	0.28	0.33	0.41	0.27	0.36						
Gernimo	0.18	0.35	0.24	0.52	0.50	0.35	0.35	0.43	0.29	0.38	0.32					
Zarfam	0.56	0.53	0.32	0.29	0.45	0.43	0.24	0.38	0.30	0.33	0.33	0.29				
Talent	0.29	0.27	0.29	0.57	0.48	0.39	0.47	0.29	0.22	0.36	0.50	0.38	0.27			
Rainbow	0.28	0.41	0.28	0.26	0.20	0.22	0.26	0.35	0.20	0.30	0.37	0.25	0.33	0.37		
Opera	0.18	0.17	0.37	0.33	0.43	0.41	0.29	0.30	0.23	0.45	0.32	0.40	0.29	0.45	0.47	1

Table 3- Jaccard's similarity matrix based on protein marker (Agronomy data).

1. Abbasi SJ, Tullah F, Marwat KB, Khani IA, Muniri I (2009) Molecular analysis of genetic diversity in *Brassica* species. Pakistan Journal of Botany. 41: 167-176.
2. Bates IS, Waldern RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress. Plant and Soil. 39: 205-207.
3. Bhutta WM, Akhtar J, Ibrahim M, Shahzad A (2006) Genetic variation between Pakistani wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker-. African Journal of Botany 72: 280-283.
4. Bradford MM (1979) A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
5. Celebi A, Acik L, Aytac Z (2009) Biosystematics studies among *ebenus* L. species based on morphological, RAPD-PCR and seed protein analysis in turkey. Pakistan Journal of Botany. 41: 2477-2486.
6. Egret M, Tevini M (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium choenoprasum*). Environmental and Experimental Botany 48: 43-49.
7. Fareghi SH, Farshadfar M, Farshadfar E (2007) Study of chemical composition and nutrition value of perennial Lucerne (*Medicago sativa* L.) and genetic diversity based on SDS-PAGE markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 15: 196-210.
8. Fufa H, Baenziger PS, Beecher BS, weikat ID, Graybosch RA, Eskridge KM (2005) Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. Euphytica 145: 133-146.
9. Hettel M, Gills T, Pomeranz SK (2008) Cluster and principle components analysis of wheat cultivars based upon coefficient of parentage. Journal Plant Genetics 14: 433-441.
10. Jiang Y, Huang B (2002) Protein Alterations in Tall Fescue in Response to Drought Stress and Abscisic Acid. Crop Science 42:202-207.
11. Kakaei M, Mostafaie A, Zebarjadi A R (2009-b) Protein pattern of seven genotypes of *Brassica napus* by sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis. Proc. of 6th National Biotechnology Congress of Iran. Aug. 13-15, 2009. Tehran-Iran. Pp 1-5.
12. Kakaei M (2009) Effects of genotype and drought stress on physiological, morphological, phenological and biochemical traits in winter rape (*Brassica napus* L.). M.Sc. Thesis, Islamic azad university, kermansha -Iran.
13. Kakaei M, Zebarjadi AR, Mostafaie A, Zebarjadi M (2009-a) Evaluation of oil yield canola under drought stress. Proc. of 1th Iranian oil seed plant Congress, Esfahan university, Iran. Pp 132.
14. Kaufman L, Rousseeuw PJ (1990) Finding groups in data: An introduction to cluster analysis, John Wiley and Sons, In., New York.
15. Kennedy JF (1987) Carbohydrate Analysis: A practical approach by M.F. Chaplin, J.F. Kennedy. Oxford.
16. Kole C (2006) Cereals and Millets (Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants). Springer. P. 373.

17. Kumar D, Miaja T (2007) Genetic variation between Pakistan wheat (*Triticum aestivum* L.) based on agromorphological traits, RAPD and SSR markers. *Journal Plant Genetics* 14: 61-70.
18. Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
19. Leal M, Brown R, Wei L (2008) Genetic diversity in *Triticum tuashii* based on morphological traits and storage proteins. *Journal Plant Genetics* 17: 152-160.
20. Ruiz M, Aguiriano E, Fite R, Carrillo JM (2007) Combined use of gliadins and SSRs to analyse the genetic variability of the Spanish collection of cultivated diploid wheat (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*). *Genetic Resources and Crop* 54: 1849-1860.
21. Mahmoudzadeh A, Haidari R, Jamalomid M (2003) Estimation of genetic distance among Tea varieties using protein electrophoresis and polymorphism for esterase. *Journal Science Natural Resource* 2: 73-80.
22. Moradi A (2008) Evaluation of genetic diversity in genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum* var durum) by using of molecular markers and agronomic traits. M.Sc. Thesis. Razi university., Kermanshah-Iran.
23. Mostafaie A (2003) Theoretical and practical guide Protein Electrophoresis in Gel. yadavaran Publishers .
24. Ojaghi J, Akhundova E (2010) Genetic diversity in doubled haploids wheat based on morphological traits, gliadin protein patterns and RAPD markers. *African Journal of Agriculture Reasearch* 13: 1701-1712.
25. Rafezi A, Farshadfar M, Farshadfar E (2009). Investigation of intra-specific variation in *Agropyron elongatum* L. using biochemical (proteins) marker. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 16: 247-253.
26. Mukhlesur RMD, Hirata Y (2004) Genetic diversity in *Brassica* species using SDS-PAGE analysis. *Journal of Biological Sciences* 4: 234-238.
27. Raoudha A, Hatem CM, M'barek BN, Chaabane R, Leila BK, Jeannette BH (2007) Simple sequence repeat markers and physiological characterization of some local Tunisian barley accessions. *Journal of Cell and Molecular Biology* 6: 19-29.
28. Salem KF, El-Zanaty AM, Esmail RM (2008) Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using morphological characters and microsatellite Markers. *World Journal of Agricultural Sciences* 4: 538-544.
29. Shahnejate-bushehri AA, Torabi S, Omidi M, Ghannadha MR (2005) Comparison of genetic and morphological distance with heterosis with RAPD Markers in hybrids of Barley. *International Journal of Agriculture and Biology* 7: 592- 595.
30. Tourneux C, Devaux A, Camacho MR, Mamani P, Ledent JF (2003) Effect of water shortage on six potato genotypes in the highlands of Bolivia (II): water relations, physiological parameters. *Agronomie* 23: 181-190.
31. Waines SK, Murphy AW (2005) Cluster analysis of breed wheat genotypes grown in divers rainfed environments. *Journal Plant Genetics* 11: 289-297.
32. Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD (1996) Functional properties of wheat glutenins. *Journal of Cereal Science* 23: 1-17.
33. Weiss EA (1983) Oilseed crops. Longman group limited, New York, USA.
34. Yang RC, Jana S, Clarke JM (1991) Phenotypic diversity and associations of some potentially drought-responsive characters in durum wheat. *Crop Science* 31: 1484-1491.

35. Yu CY, Hu SW, Zhao HX, Guo AG (2005) Genetic distances revealed by morphological characters, isozymes, proteins and RAPD markers and their relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 110: 511-518.

Comparison of Genetic and Morpho-physiological Distance via SDS-PAGE Marker in Some Rapeseed Genotypes

Kakaei M.¹, Zabarjadi A.R.^{2*}, Mostafaie A.³

¹ Agriculture (Genetic and Plant Breeding) Department, Payame Noor University, 19395-4697, I. R. of IRAN. and MSc Azad University Branch of Kermanshah.

² Dept. of Plant Breeding and Agronomy, Faculty of Agriculture and Dept. of Biotechnology for Environmental Stress Razi university, Kermanshah, Iran.

³ Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences

Abstract

Oilseed crops such as rapeseed have the important role in the production of energy for humans. The most important part of plant breeding programs understanding of genetic diversity to classify population based on different markers for selecting the suitable parents. In this research, genetic diversity of 16 genotypes of rapeseed was evaluated using SDS-PAGE protein markers and morpho-physiological traits in the field and laboratory conditions. Extraction of leaf proteins was performed before physiological maturity and then concentration of proteins was measured by Bradford method. For separating and patterning of the extracted proteins, SDS-PAGE technique via poly acrylamide electrophoresis was used. After staining of proteins by coomassie blue R-250 and scoring of the bands, cluster analysis was computed based on Jaccard coefficient which that the genotypes classified into 2 separate groups. Results of cluster analysis based on agronomical traits shown that the studied genotypes classified into 5 groups. Correlation between morphological and molecular traits was assessed using Mantel test and significant positive correlation was observed between them. Thus according to genetic distances between the genotypes, we can use cross between Milena and Dante for obtain the highest amount of heterosis in future breeding program and hybridization between Opera and Sahara based on morpho-physiological markers according to similarity coefficient is justified.

Key word: *Brassica napus*, Protein Marker, Genetic Distance, Morpho-physiological traits

*Corresponding author : Alireza Zebarjadi

Email: zebarjadi@yaho.com