مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۳، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۱، ۳۲٦-۳۱۹

کاربرد نشانگر پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در جداسازی هفت رقم سویا (*Glycine max*)

رویا رضوی زاده .Ph.D[1*]، علی اکبر احسانپور .Ph.D[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: razavi.roya@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۷/۱۲

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تفاوت هفت رقم بذر سویا تحت کشت در ایران بر اساس الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر با استفاده از روش SDS-PAGE می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پروتئین محلول کل دانه از هفت رقم سویا تحت کشت در ایران شامل: GK، L17، ساری، ۰۳۳، ۰۳۲، تلار و سحر استخراج و اندازه‌گیری شد. سپس الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه‌های هفت رقم سویا با روش SDS-PAGE بررسی گردید. تراکم نسبی باندهای پروتئینی به وسیله نرم افزار آنالیز شد. همچنین بر پایه حضور و غیاب باندها و با تحلیل خوشه‌ای، روابط خویشاوندی ارقام سویا ارزیابی گردید.

نتایج: نتایج حاصل از آنالیز محتوای پروتئین کل در بذرهای هفت رقم سویا نشان داد که تنها در یک رقم محتوای پروتئین کل به صورت معنی‌داری نسبت به سایر واریته‌ها کمتر بود. در این مطالعه بر روی ژل ۱۱ باند اصلی و پلی مورفیک برای بررسی تنوع ژنتیکی تشخیص داده شد و آنالیز گردید. در این باندها تفاوت در شدت بیان پروتئین‌ها در میان ژنوتیپ‌های مختلف مشاهده شد. روابط خویشاوندی میان هفت رقم سویا بر پایه الگوی پروتئینی دانه‌های سویا بررسی گردید و رقم‌هایی که دارای بیشترین و کمترین شباهت بودند مشخص شدند.

نتیجه گیری: الگوی پروتئینی بذرهای سویا بر پایه حضور و عدم حضور باندهای پروتئینی می‌تواند تنوع ژنتیکی را مشخص سازد و همچنین شناساگرهای پروتئینی خاصی معرفی کند که در شناسایی ارقام مختلف استفاده گردد.

واژگان کلیدی: الکتروفورز، سویا، نشانگر پروتئینی

مقدمه

سویا از محصولات مهم دانه‌های روغنی می‌باشد و در کشورهایی مثل ایران هم در فصل بهار و هم در فصل پاییز به خوبی رشد می‌کند. سویا از خانواده Fabaceae و تیره بقولات، گیاهی است یکساله به طول ۵۰ تا ۶۰ سانتی‌متر با برگ‌های سه قسمتی و دارای گل‌های کوچک سفید یا بنفش می‌باشد. این گیاه به‌خاطر دانه‌های سرشار از پروتئین آن کشت داده می‌شود. محصولات سویا حاوی هر سه ماده غذایی اصلی یعنی پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی بوده و همچنین حاوی سایر عناصر غذایی از جمله ویتامین‌ها، کلسیم، آهن، املاح معدنی و اسید فولیک می‌باشد. این گیاه از نظر پروتئین بسیار غنی بوده و یک منبع خوبی از ایزوفلاون‌ها می‌باشد که دارای فواید زیادی در تامین سلامتی است. دانه سویا شامل آمینو اسیدهای سیستئین و متیونین است که بدن به هیچ وجه نمی‌تواند آن‌ها را بسازد. سویا حاوی ۴۰ تا ۴۲ درصد پروتئین با کیفیت خوب و ۱۸ تا ۲۲ درصد روغن (شامل ۸۵ درصد اسیدهای چرب اشباع نشده و فاقد کلسترول) می‌باشد و از لحاظ تغذیه‌ای در رژیم غذائی انسان مطلوب و حائز اهمیت است (۱). سویا در میان لگوم‌های غذایی از محصولات مهم در سراسر جهان شناخته شده است. رقم‌های سویای کشت شده از نظر نوع و محتوای پروتئینی به میزان زیادی از یکدیگر متفاوتند. بنابراین درک تنوع ژنتیکی ارقام زراعی و ارتباط بین آن‌ها ارزشمند است و سبب سهولت در انتخاب نوع رقم و انتقال ژن‌های مفید در میان ارقام کشت شده می‌گردد. همچنین حداکثر استفاده از منابع ژرم پلاسم در دسترس و موجود فراهم می‌شود. وسعت و محدوده تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم می‌تواند از طریق خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگرهای ژنتیکی بررسی گردد. سپس نشانگر مشخص شده به اصلاح کنندگان گیاهان کمک خواهد کرد تا رقم‌های مناسبی برای برنامه‌های هیبریداسیون و دورگه گیری انتخاب کنند (۲). به هر حال علی رغم اهمیت وجود تنوع ژنتیکی در میان گونه‌ها و کاربرد آن، هنوز ساختار ژنتیکی جمعیت سویا در آسیا نامشخص است (۳).

تکنیک‌های مولکولی امکان بررسی ژنتیکی دقیق‌تر و بررسی عوامل محیطی تنوع را امکان پذیر می‌سازد و سبب دقت بیشتر در اندازه‌گیری و ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌گردد. از میان تکنیک‌های بیوشیمیایی، انواع نشانگرهای DNA شامل RFLP، PBR، SSCP، DGGE، ARMS، AFLP، STS و ALP، RAPD، DAF، و SCAR و میکرو ستلایت‌ها می‌باشند. البته استفاده از روش‌های نیازمند به این نشانگرها اغلب پیچیده بوده و در مقایسه با مارکرهای پروتئینی مستلزم صرف وقت و هزینه‌های بسیار زیاد می‌باشد (۴). تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE به طور وسیع برای بررسی تنوع پروتئینی دانه در محصولات زراعی استفاده شده است (۴). این روش همچنین می‌تواند به عنوان یک ابزار مفید و مورد اطمینان برای تشخیص رقم‌های زراعی خاص استفاده گردد (۵ و ۶). پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه به دلیل اینکه به میزان زیادی مستقل از نوسانات محیطی هستند برای مطالعه تنوعات ژنتیکی ارزشمندتر از پروتئین‌های رویشی (vegetative proteins) می‌باشند (۷). بررسی تنوع ژنتیکی و الگوی تنوع در جمعیت‌های سویا در آسیا تاکنون از طریق پروتئین‌های دانه انجام گردیده است (۸ و ۹). Dabhal (۱۰) تنوع معنی‌داری در میان برخی رقم‌های سویا شناسایی کرد که سبب گروه بندی در ۱۷ خوشه گردید. Bushehri و همکاران (۱۱) پیشنهاد کردند که SDS-PAGE یک ابزار قوی برای شناسایی رقم‌های سویا در مقایسه با الگوی ایزوزیمی آن‌ها می‌باشد. پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه همچنین برای بررسی و مطالعه ارتباط تکاملی و فیلوژنی چندین محصول زراعی دیگر نیز به کار گرفته شده اند. برای مثال Ahmad و همکاران (۱۲) روابط فیلوژنتیکی را در میان گونه‌های *Cicer* بر اساس داده‌های حاصل از SDS-PAGE گزارش و پیشنهاد نمودند که *Cicer reiculatum* نیای وحشی ارقام نخود (chickpea) است.

تحقیقاتی که روی ژرم پلاسم گیاهان زراعی صورت می‌گیرد می‌تواند تولید روغن خوراکی و ارزش تغذیه‌ای این محصولات را از نظر کیفیت روغن و پروتئین آن‌ها افزایش دهد. در کشورهای در حال توسعه که تقاضای بالایی برای سویا وجود دارد چنین اطلاعاتی کمتر در دسترس می‌باشد. بر اساس مطالعات ما بررسی‌های دقیق در مورد تنوع ژرم پلاسم سویا بر اساس الکتروفورز پروتئین‌های بذر در ایران صورت نگرفته است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی تنوع ژنتیکی و پروتئینی بذر هفت واریته مختلف سویا تحت کشت در ایران و گروه بندی آن‌ها با استفاده از نشانگرهای پروتئینی، از نوع پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر می‌باشد. اطلاعات حاصل می‌تواند در انتخاب ارقام سویا با اندوخته پروتئینی غنی‌تر برای کشت کمک نماید.

مواد و روش‌ها

ابتدا دانه‌های هفت رقم سویا به نام‌های GK، L17، ساری، ۰۳۳، ۰۳۲، تلار و سحر از مرکز تولید دانه‌های روغنی وزارت جهاد کشاورزی استان اصفهان تهیه گردید. پس از جداسازی پوسته دانه‌های سویا، لپه‌ها و جنین موجود در آن‌ها توسط نیتروژن مایع تبدیل به پودر گردیدند. سپس جهت چربی زدایی پودرهای حاصله از هر رقم، به آن‌ها استون سرد اضافه شد (۱۳). پودرهای فاقد چربی دانه برای هر رقم سویا در دمای اتاق و به مدت ۸ ساعت در جریان هوا خشک گردیدند. سپس به پودر های خشک شده هر رقم، محلول ۵۰ میلی‌مولار بافر تریس محتوی ۱میلی مولار DTT، ۲ میلی مولار EDTA و ۲ میلی مولار مرکاپتواتانول pH=۷/۵ به نسبت ۱ به ۲۰ وزنی/حجمی اضافه و به مدت ۲ تا ۳ ساعت بر روی شیکر مدلPOLE IPI PARS، با سرعت ۵۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تکان داده شدند (۱۳). پس از این مدت سوسپانسیون‌های حاصله به مدت ۲۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد توسط سانتریفوژ ساخت شرکت SIGMA مدل 3K20 سانتریفوژ گردیدند. پس از این مرحله، محلول رویی از رسوب جدا و پروتئین‌ها توسط اضافه نمودن استون به نسبت ۱ به ۴ وزنی/حجمی رسوب داده شدند. رسوب‌های پروتئینی برای هر رقم سویا به مدت ۲۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده و سپس به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردیدند. در این مرحله پس از جداسازی محلول رویی از رسوب، رسوب پروتئین‌ها در دمای اتاق و به مدت ۱ ساعت خشک شدند. رسوب پروتئینی هر رقم سویا در نهایت در ۴۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج ذکر شده، حل شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردیدند. پس از این مرحله، محلول رویی هر رقم سویا برای ارزیابی پروتئین استفاده شد. اندازه گیری پروتئین کل (میلی‌گرم در گرم پودر فاقد چربی) بر اساس روش تغییر یافته Bradford با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albomin) به عنوان استاندارد انجام گرفت (۱۴).

آنالیز SDS-PAGE با استفاده از ژل متمرکزکننده (Stacking) با غلظت ۵ درصد و ژل جداکننده (Separating) با غلظت ۱۲ درصد به وسیله تانک الکتروفورز ساخت شرکت PEQLAB مدل ۱۶۱۴-۴۵ و با استفاده از مارکر پروتئینی Preotein ladder PLUS PS11 انجام گرفت (۱۵). پس از الکتروفورز در ۱۳۰ ولت، باندهای پروتئینی با استفاده از نیترات نقره رنگ آمیزی شده و تراکم نسبی باندهای پروتئینی به وسیله نرم افزار Image J آنالیز گردید.

همه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام و داده‌ها با کمک نرم افزار SAS و آنالیز ANOWA و آزمون دانکن در سطح p<۰/۰۵ مقایسه گردیدند. همچنین بر پایه حضور و غیاب باندها و با تحلیل خوشه‌ای UGMA و استفاده از ضریب Jacard روابط خویشاوندی ارقام سویا با کمک نرم افزار NTSYSpc2 ارزیابی گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز محتوای پروتئین کل در بذرهای هفت رقم سویا به نام‌های GK (A)، L17 (B)، ساری (C)، ۰۳۳(D) ، ۰۳۲ (E)، تلار (F) و سحر (G) نشان داد که تنها در واریته C محتوای پروتئین کل به طور معنی داری کمتر از سایر واریته‌ها می‌باشد. در حالی‌که در بین سایر ارقام تفاوت معنی داری از لحاظ میزان پروتئین محلول مشاهده نشد (شکل ۱).

آنالیز الگوی پروتئینی بذرهای هفت رقم سویا در شکل ۲ الف و ب نشان داده شده است. بر اساس میزان حرکت نسبی پروتئین‌های دانه بر روی ژل، در این مطالعه ۱۱ باند اصلی و پلی مورفیک برای بررسی تنوع ژنتیکی تشخیص داده شد و آنالیز گردید. پلی مورفیسم مشاهده شده در این باندها بر اساس تفاوت در تعداد و شدت بیان پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در میان ژنوتیپ‌های مختلف می‌باشد. الگوی پروتئینی دانه‌های هفت رقم سویا مشخص کرد که باند ۲ (با وزن تقریبی ۱۳۰ کیلو دالتون) و باند ۱۰ (با وزن تقریبی ۳۵ کیلو دالتون) تنها در رقم B حضور داشته و بیان آن‌ها در سایر رقم‌های سویا مشاهده نشد.

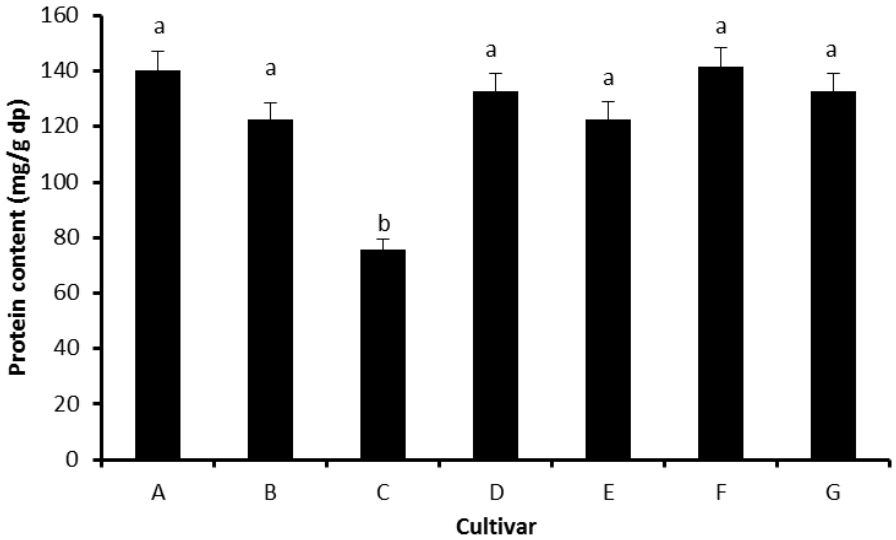
پس از بررسی میزان بیان باندهای پروتئینی مشخص گردید که باند ۱ (با وزن تقریبی ۱۷۵ کیلو دالتون) در رقم‌های E و G و باند ۳ (با وزن تقریبی ۶۲ کیلو دالتون) در رقم A قابل تشخیص نبوده در حالی‌که بیان این باندهای پروتئینی در سایر ارقام سویا مشاهده شد. سطح بیان باند ۱ در رقم C در مقایسه با سایر ارقام به طور معنی داری بیشتر بود. باند ۳ بیشترین بیان را در ارقام B و C و کمترین سطح بیان را در ارقام F و G نشان داد.

در مورد باندهای ۴ (با وزن تقریبی ۶۰ کیلو دالتون) و ۵ (با وزن تقریبی ۵۵ کیلو دالتون) و ۶ (با وزن تقریبی ۵۱ کیلو دالتون) و

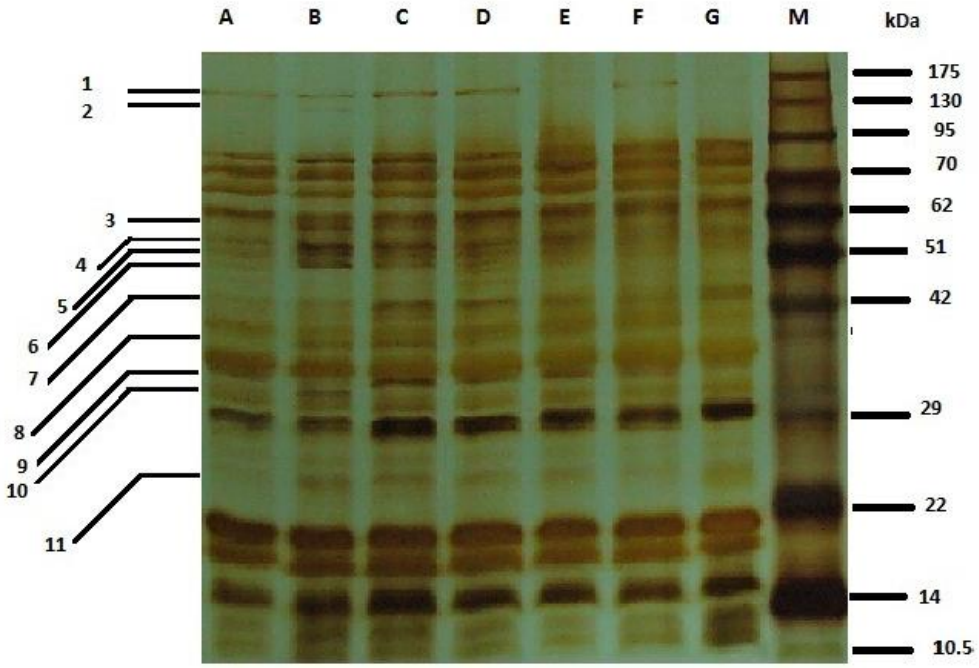
۱۱ (با وزن تقریبی ۲۵ کیلو دالتون) نیز بیشترین سطح بیان در واریته B مشاهده شد در حالی که باند ۹ (با وزن تقریبی ۳۵ کیلو دالتون) کمترین سطح بیان را در واریته B داشت.

در مورد باندهای ۷ (با وزن تقریبی ۴۴ کیلو دالتون) و ۸ (با وزن تقریبی ۴۰ کیلو دالتون) و ۹ حداکثر میزان بیان پروتئین‌ها در رقم C مشاهده شد. کمترین سطح بیان باندهای ۷ و ۸ و ۱۱ مربوط به واریته F بود.

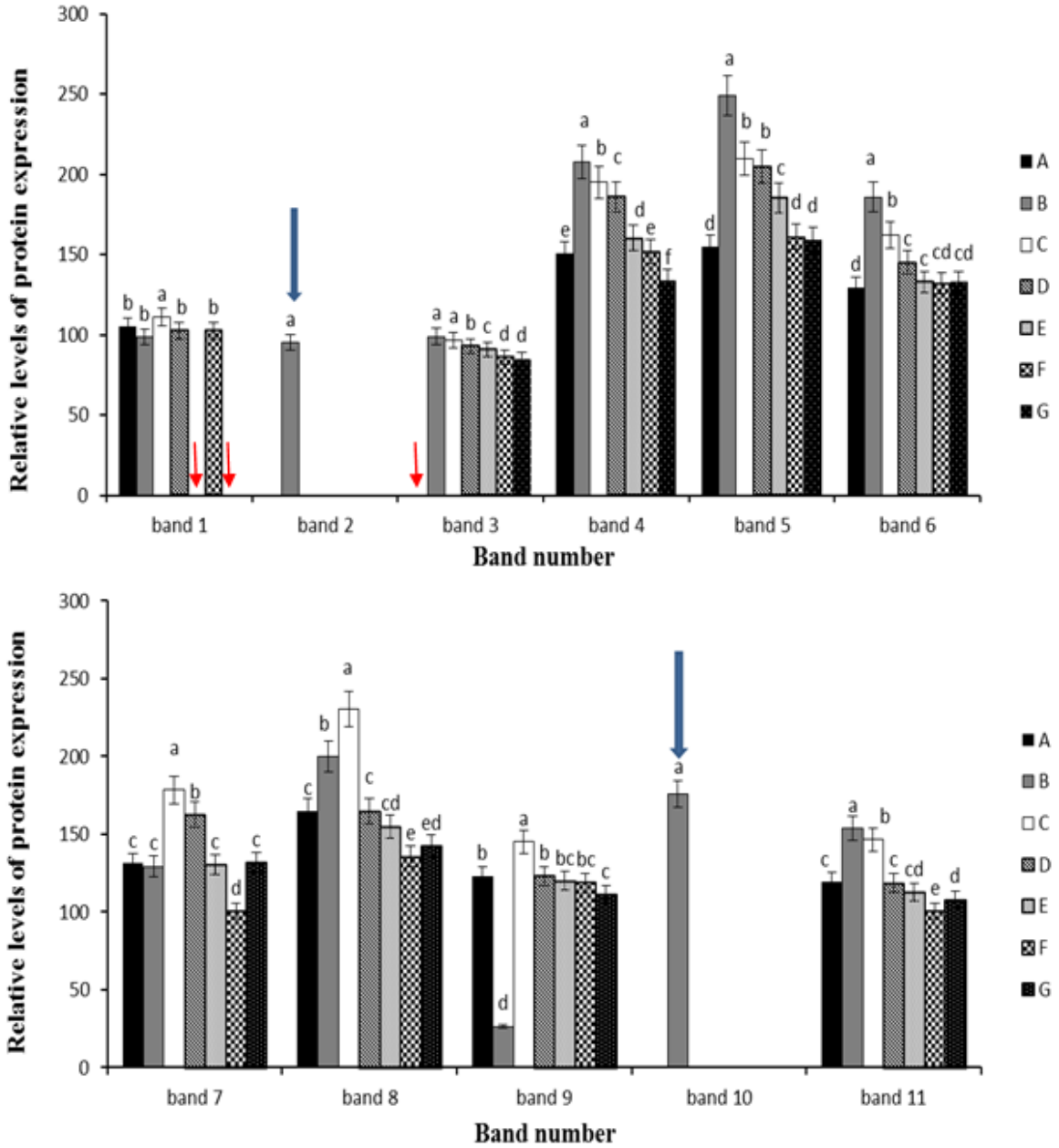
در این مطالعه، روابط خویشاوندی میان هفت رقم سویا بر پایه الگوی پروتئینی دانه‌های سویا بررسی گردید. دندروگرام حاصل نشان داد که رقم‌های E و G و رقم‌های C و D (با ۸۵ درصد شباهت) دارای بیشترین شباهت با یکدیگر هستند و پس از آن رقم‌های A و F (با بیش از ۷۰ درصد شباهت) بیشترین شباهت را نشان دادند. درحالی‌که رقم B کمترین شباهت (حدود ۳۳ درصد) را با سایر ارقام داشت (شکل ۳).



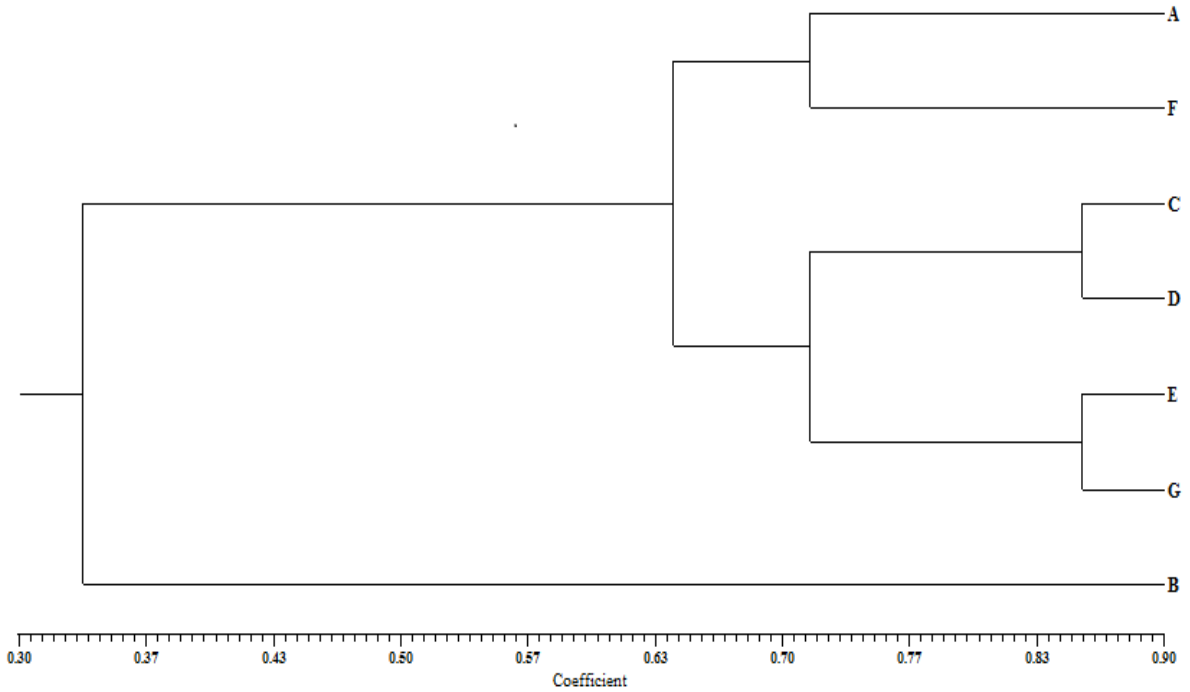
شکل ۱: محتوای پروتئین محلول ذخیره‌ای دانه‌های هفت رقم سویا به ترتیب GK (A)، L17 (B)، ساری (C)، ۰۳۳ (D)، ۰۳۲ (E)، تلار (F) و سحر (G)، dp، پودر فاقد چربی(defatted powder). داده‌ها میانگین ۳ تکرار±SD و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (P≤۰/۰۵) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۲ : الف-الگوی الکترفورزی(SDS-PAGE) پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در رقم‌های سویا به ترتیب GK (A)، L17 (B)، ساری (C)، ۰۳۳ (D) ، ۰۳۲ (E)، تلار (F) و سحر (G) و M: مارکر پروتئینی



شکل ۲: ب - آنالیز میزان نسبی بیان پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در رقم‌های سویا به ترتیب GK (A)، L17 (B)، ساری (C)، ۰۳۳ (D)، ۰۳۲ (E)، تلار (F) و سحر (G). داده‌ها میانگین ۳ تکرار±SD و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (P≤۰/۰۵) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۳: دندروگرام بررسی روابط خویشاوندی بر اساس باندهای پروتئینی دانه در رقم‌های سویا به ترتیب: GK (A)، L17 (B)، ساری (C)، ۰۳۳ (D)، ۰۳۲ (E)، تلار (F) و سحر (G)

بحث

داشتن اطلاعات کافی در مورد درجه تشابه ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان اهمیت خاصی در برنامه اصلاح گیاهان دارد. چنین اطلاعاتی برای شناسایی گروه‌های ناهمگون و انتخاب والدها در دورگه گیری و ایجاد هیبریدها مفید و با ارزش است (۱۶). الکتروفورز پروتئین‌ها یک ابزار قوی برای تشخیص تنوع ژنتیکی است و مخصوصا SDS-PAGE پروتئین‌های دانه به عنوان یک تکنولوژی قابل اطمینان در نظر گرفته می‌شود. به دلیل اینکه اکثر روش‌های الکتروفورزی تولید تعداد زیادی باند بر روی ژل‌ها می‌نمایند که معمولا بیشتر از آن چیزی است که از طریق یک الگوی ایزوزیم به دست می‌آید (۱۷). شناساگرهای مولکولی نظیر نشانگر DNA و نشانگر پروتئینی می‌توانند به عنوان ابزار مفید و قابل اعتماد در شناسایی و تعیین تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی رقم‌ها و گونه‌های گیاهی استفاده شوند (۱۸ و ۱۹). الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها می‌تواند باندهایی را به عنوان نشانگر مولکولی معرفی نماید و در این خصوص بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به دلیل عدم تاثیر پذیری آن‌ها از محیط اهمیت خاصی دارند (۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۳). از طرف دیگر پروتئین‌ها در بذرهای بالغ ثابت‌تر از بافت‌های رویشی گیاهی می‌باشند (۲۴). بنابراین الگوی پروتئینی بذرهای سویا بر پایه حضور و عدم حضور باندهای پروتئینی به عنوان نشانگرهای پروتئینی می‌تواند تنوع ژنتیکی را در میان ارقام مشخص سازد. در این مطالعه حضور باند ۲ (با وزن تقریبی ۱۳۰ کیلو دالتون) و باند ۱۰ (با وزن تقریبی ۳۵ کیلو دالتون) در پروتئین‌های دانه سویا رقم B می‌تواند به عنوان شناساگر پروتئینی برای این رقم سویا معرفی گردد. همچنین عدم حضور باند ۱(با وزن تقریبی ۱۷۵کیلو دالتون) در الگوی پروتئینی دانه در رقم‌های E و G و عدم حضور باند ۳ (با وزن تقریبی ۶۲ کیلو دالتون) در رقم A می‌تواند به عنوان نشانگر برای این ارقام پیشنهاد گردد.

مشابه با مطالعه حاضر، الگوهای SDS-PAGE پروتئین‌های بذر به عنوان شناساگرهای پروتئینی برای شناسایی و مقایسه رقم‌های *Poa pratensis* (۱۹)، جو دو سر (*oat*) (۲۱)، گونه‌های وحشی آلو (*pronus*) (۲۵)،گونه‌های *Triticum aestivum* (۲۶ و ۲۷)، رقم‌های Timothy (*Phleum pratense*) (۲۸)، رقم‌های براسیکا (۲۹) و گونه‌های پسته (۳۰) استفاده شده‌اند.

نتایج بررسی روابط خویشاوندی براساس الگوی پروتئینی دانه‌های ارقام سویا نشان داد که رقم‌های E و G و رقم‌های C و D بیشترین شباهت و رقم B کمترین شباهت را با سایر ارقام

دارد. مشابه با یافته‌های ما حضور و یا عدم حضور باند در الگـوی پروتئینـی بـه منظـور آشـکار سـازی پلـی مورفیسـم رقـم‌هـای Brassica استفاده شده اسـت (۳۱). در مطالعـه‌ای کـه بـر روی ارقام مختلف سویا در کشور پاکستان و سایر ارقـام از کشـورهای دیگر صورت گرفت مشخص شد که تنوع ژنتیکی بین واریته‌های پاکسـتان و آمریکـا خیلـی بیشـتر از تنـوع ژنتیکـی بـین ارقـام پاکستان و کره جنوبی و یا ژاپن بود (۳۲). همچنین در تحقیقـی دیگر بررسی تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌های سویا با استفاده از تکنیک AFLP بر روی ارقام برزیل صورت گرفته است (۱۶).

در کل نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد کـه تنـوع کافی در مورد پروتئین‌های ذخیره‌ای دانـه در میـان ارقـام سـویا مورد مطالعه وجود دارد و می‌توان رقم‌های زراعی سویا را با ایـن روش از یکدیگر جدا نمود. همچنین پیشنهاد مـی‌شـود بـر روی ژنوتیپ‌هایی که الگوهای باندهای پروتئینی مشابهی دارنـد سـایر آنالیزهای بیوشیمیایی و الکتروفورز 2D صورت گیرد تا اخـتلاف احتمالی آن‌ها نیز مشـخص شـود و مـدیریت بهتـر در مـورد ژن بانک گونه‌های گیاهی صورت گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به توضیحات ذکر شده می‌تـوان نتیجـه گیـری نمودکـه الگوی باندهای پروتئینی و سطح بیان پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در ارقام مختلف سـویا مـی‌توانـد نشـانگرهای پروتئینـی خاصـی معرفی نماید که در شناسایی ژنوتیپ‌ها استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله لازم مـی‌داننـد از خـانم مهنـدس فاطمـه رستمی به خاطر همکـاری بـا ایـن پـژوهش صـمیمانه قـدردانی نمایند.

منابع

1. Aslam M, Mirza MS, Shah SM, Shafeeq S, et al. Crop Production Bulletin. Pak.Agric. Res. Council: Islamabad, Pakistan. 1995; 6: pg. 1.

2. Ghafoor A, Zahoor A, Qureshi AS, Bashir M. Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE. Euphytica. 2002; 123: 367-377.

3. Abe J, Xu DH, Suzuki Y, Kanazawa A, et al. Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs. Theor. Appl. Genet. 2003; 106: 445–453.

4. Das S, Mukarjee KK. Comparative study on seed proteins of *Ipomea*. Seed Sci. Technol. 1995; 23: 501-509.

5. Camps G, Vernetti Fde-J, Augustin E, Irigon D. Morphological and electrophoretical characterization of twenty soybean cultivars. Pesqui. Agropecu. Bras. 1994; 29(11): 1779-1787.

6. Jha SS, Ohri D. Phylogenetic relationships of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (pigeonpea) and its wild relatives based on seed protein profiles. Genet. Resour. Crop Evol. 1996; 43: 275–281.

7. Gepts P. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir (Eds.), Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts. 1989; 64-82.

8. Han O, Abe J, Shimamoto Y. Genetic diversity of soybean landraces in Korea. Korean J. Crop Sci. 1996; 44: 256–262.

9. Hirata T, Abe J, Shimamoto Y. Genetic structure of the Japanese soybean population. Genet. Resour. Crop Evol. 1999; 46: 441–453.

10. Dobhal VK. Genetic divergence in soybean. Legume Res. 1995; 18 (1): 29-34.

11. Bushehri SAA, Abd-Mishani C, Yazdi-Samadi B, Sayed-Tabatabaei BE. Variety specific electrophoretic profiles of soybean cultivars. Iranian J. Agric. Sci. 2000; 31(1): 55-61.

12. Ahmad F, Slinkard AE. Genetic relationships in the genus *Cicer* L., as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins. Theor Appl Genet. 1992; 84: 688-692.

13. Rostami F, Ehsanpour, A A. Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under *in vitro* cultivar. Malays Appl Biol. 2009; 38(2): 49-54.

14. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254.

15. Hames, B.D. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, In: Gel electrophoresis of proteins. 2th Ed. Oxford University Press, New York.1990.

16. Bonato AV, CalvoII ES, Geraldi IO, Arias AA. Genetic similarity among soybean (Glycine max (L) Merrill) cultivars released in Brazil using AFLP markers. Genet. Mol. Biol. 2006; 29(3): 692-704.

17. Nielsen G, Johansen HB. Proposal for the identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordein and 39 isoenzyme loci of 47 reference varieties. Euphytica. 1986; 35(3):717-728.

18. Criley RA, Roh, MS, Kikuchi M, Manshardt RM. A Comparison of *Gardenia augusta* cultivars using isozymes and RAPD markers. Acta Hortic. 2008; 766: 461-468.

19. Tamkoc A, Arslan E. Comparison of agronomic characters, total seed storage proteins and their use for genotypes discrimination in the kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). Biotechnol Biotec Eq. 2010; 24(1): 1573-1576.

20. Jha SS, Ohri D. Phylogenetic relationships of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (pigeonpea) and its wild relatives based on seed protein profiles. Genet Resour Crop Ev. 1996; 43(3): 275-281.

21. Dvoracek V, Curn V, Moudry J. Suitability of oat-seed storage-protein markers for identification of cultivars in grain and flour samples. Plant, Soil Environ. 2003; 49 (11): 486-491.

22. Javid A, Ghafoor A, Anwar R. Seed storage protein electrophoresis in groundnut for evaluating genetic diversity. Pakistan J Bot. 2004; 36(1): 25-29.

23. Iqbal SH, Ghafoor A, Ayub N. Relationship between SDS-PAGE markers and *Ascochyta blight* in chickpea. Pakistan J Bot. 2005; 37(1): 87-96.

24. Magni C, Scarafoni A, Herndl A, Sessa F, et al. Combined 2D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome. Phytochem. 2007; 68: 997-1007.

25. Zeinalabedini M, Majourhat K, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, et al. Comparison of the use of morphological, protein and DNA markers in the genetic characterization of Iranian wild Prunus species. Sci Hortic. 2008; 116: 80-88.

26. Fufa H, Baenziger PS, Beecher BS, Dweikat I, et al. Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. Euphytica. 2005; 145: 133-146.

27. Zeb A, Zahir A, Ahmad T, Abdumanon A. Physiochemical characteristics of wheat varieties growing in the same and different ecological regions of Pakistan. Pakistan J Biol Sci. 2006; 9: 1823-1828.

28. Cai Q, Bullen MR. Identification of timothy cultivars by. SDS-PAGE analysis of seed storage proteins. Can. J. Plant Sci.1992; 72: 1215-1222.

29. Rahman MD. Mukhlesur and Yutaka Hirata. Genetic Diversity in Brassica Species Using SDS-PAGE Analysis. J Biol Sci. 2004; 4: 234-238.

30. Ehsanpour AA, Shojaie B, Rostami F. Characterization of seed storage protein patterns of four Iranian Pistachios using SDS-PAGE. 2010; 2 (7): 737-740.

31. Sadia M, Salman AM, Rabbani MA, Pearce S R. Electrophoretic characterization and the relationship between some *Brassica* species. Electron J Bio. 2009; 5(1): 1-4.

32. Faisal MAM, Afsari SQ, Muhammad A, Muhammad R K, et al. Evaluation of genetic diversity in soybean (*Glycine max*) lines using seed protein Electrophoresis. Aust J Crop Sci. 2009; 3(2): 107-112.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2013; 3(4): 319-326

Research Article

Application of Seed Storage Protein Marker for Identification of Seven Soybean (*Glycine max*) Cultivars

Razavizadeh R. Ph.D.[1*], Ehsanpour A.A .Ph.D.[2]

1. Department of Biology, Payame Noor University, PO BOX 19395-3697 Tehran, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: razavi.roya@gmail.com

Received: 13 Jun. 2012 Accepted: 3 Oct. 2012

Abstract

Aim: The purpose of this study is evaluation of seven different varieties of soybean seeds cultivated in Iran based on seed storage protein patterns using SDS-PAGE method.

Material and methods: First, total soluble protein extracted from seeds of seven different varieties of soybean cultivated in Iran including: GK, L17, Sari, 033, 032, Talar and Sahar were measured. The electrophoretic pattern of storage proteins of soybean seeds was evaluated by SDS_PAGE method. Relative density of protein bands was analyzed. Relationships among the seven varieties of soybeans were evaluated based on the presence or absence of protein bands and cluster analysis.

Results: Protein content of soybean seeds showed that total protein in only one variety decreased compared to other varieties. In this study, 11 polymorphic bands on a gel for evaluation of genetic variation were detected and analyzed. Differences in intensities of protein expression were observed among different genotypes. Relationships among the seven varieties of soybeans were studied based on protein patterns and the highest and lowest similarities among varieties were identified.

Conclusion: The protein pattern of soybean seeds based on the presence or absence of protein bands can identify genetic variation and will also introduce specific protein markers that might be used to identify different varieties.

Keywords: Electrophoresis, Protein marker, Soybean