بررسی پروتئین‌های بذر در گونه‌های *Prosopis* از تیره حبوبات در ایران

فریبا رییسی للری[۱]، مریم کشاورزی[۲]، پریناز قدم[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۲۰
تاریخ تصویب: ۹۳/۸/۳

چکیده

Prosopis از تیره حبوبات زیر تیره ابریشم با چهار گونه خودرو و زراعی با اهمیت خوراکی و علوفه‌ای در ایران حضور دارد. دانه های این گیاه دارای مقادیر زیادی ترکیبات قندی و پروتئینی است. در این پژوهش با جمع آوری بذر از واحدهای جمعیتی از ٥ رویشگاه این گیاهان، ویژگی های الکتروفورزی پروتئین‌های بذر در ٤ گونه‌ی جنس Prosopis موجود در ایران مشتمل بر P. juliflora, P. farcta, P. cineraria و P. koelziana مورد مطالعه قرار گرفتند. هدف از این مطالعه استفاده تاکسونومیکی از ویژگی های الکتروفورزی پروتئینی ذخیره در بذر این گیاه برای تفکیک

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا (س)
[۲] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا (س)؛ Neshat112000@yahoo.com
[۳] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا (س)

این گونه ها در ایران بود. با استفاده از روش SDS- PAGE در مجموع ۲۲ باند به دست آمد. اطلاعات حاصل با روش‌های آماری چند متغیره مورد ارزیابی واقع شدند. در این پژوهش برای اولین بار در ایران (برای ٤ گونه) و در جهان برای گونه‌های P. farcta (هر دو واریته) و P.koelziana پروفیل های حاصل از الکتروفورز پروتئین های ذخیره‌ای بذر مطالعه شده و جدایی تاکسون های مورد بررسی تائید شد. برای نخستین بار آلبومین ذخیره ای بذر در Prosopis farcta var. farcta و P. farcta var. glabra و P. juliflora مطالعه شد. تفاوت الگوی الکتروفورزی در دو واریته مشاهده شد. گونه P. juliflora ازسایر گونه های مورد بررسی جدا بود. گونه P. koelziana در الگوی الکتروفورزی پروتئین بذر بیشترین شباهت را به P. juliflora نشان داد. ارزش تفکیکی یافته های پروتئینی مورد بحث واقع شده است.

واژه‌های کلیدی: *Prosopis*، الکتروفورز، پروتئین ذخیره بذر.

مقدمه

جنس *Prosopis* L. یا کهور یکی از جنس‌های مهم قبیله Mimosea متعلق به خانواده بزرگ Fabaceae است. این جنس دارای اهمیت خوراکی و علوفه‌ای بوده و کاربردهای دارویی مختلفی برای آن ذکر شده است (Mwangi and Swallow, 2005، Pasiecznik, et al. 2001). تعدادی از گونه‌های این جنس با خشک ترین مناطق جهان سازگاری دارد (Catalano, et al. 2008). در ایران سه گونه بومزاد (هر سه در بخشه *Prosopis*) شامل *P. cineraria* Druce، *P. farcta* J. F. Macbr. و *P. koelziana* Burkart، (Mottura, 2006) و نیز گونه زراعی *P. juliflora* D.C. وجود دارند.

در دهه‌های اخیر الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای در مطالعات طبقه بندی مورد استفاده قرار گرفته است. در اکثر موارد پروتئین موجود در بذر به عنوان تولیدات مستقیم ژن به کار می‌رود. پروتئین‌های افراد جمعیت‌ها یا گونه‌های مختلف در صورت داشتن حرکت یکسان در داخل یک ژل مشابه هستند و پس از رنگ‌آمیزی تولید باندهایی با عرض و شدت یکسان می‌نمایند. هریک از این باندها به

عنوان صفتی مجزا مورد بررسی قرار می‌گیرند.

پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر که منبع غذایی ارزشمندی برای انسان‌ها محسوب می‌شوند، در طی نمو گیاه به طور گسترده‌ای ساخته شده و تجمع می‌یابند. در طول رویش بذر، این پروتئین ها تغییر ماهیت داده و منجر به اسیدهای آمینه می شوند که منبع غذایی جنین در حال نمو است. پروفیل های پروتئین ذخیره بذر یکی از ابزارهای تعیین نزدیکی ژنتیکی در سطح مولکولی و حل مشکلات تاکسونومیکی و تبارشناختی است. از این اطلاعات تاکنون برای تفکیک رقم های زراعی، حصول اطمینان از تشخیص صحیح گونه، کمک به تفاسیر بیوسیستماتیکی، مطالعه روابط تبارشناختی گونه ها و تنوع ژنتیکی گیاهان مختلف بهره گرفته شده است.

Arslan و Ertugrul در سال ۲۰۱۰ با بررسی الگوهای حاصل از الکتروفورز پروتیئن ذخیره‌ای بذر در گونه هایی از گیاهان قبیله Hedysareae دریافتند الگوی خوشه‌بندی حاصل از تفسیر نتایج از لزوم انتقال *Sartoria hedysaroides* Boiss. Helder به *Hedysarum* L. حمایت می کند. این محققان الگوهای حاصل از الکتروفورز پروتئین ذخیره بذر را نشانگرهایی مفید در بررسی‌های تنوع ژنتیکی تشخیص دادند.

Mondal و Mondal (۲۰۱۱) در بررسی الگوهای حاصل از الکتروفورز پروتئین ذخیره بذر در خانواده های راسته حبوبات مشخص ساختند که تعیین حدود خانواده به صورت سه زیر خانواده مجزا مورد حمایت است. Emre در سال ۲۰۱۱ با بررسی الگوی باندینگ پروتئین های ذخیره‌ای بذر در ۹ تاکسون از جنس *Vicia* L. به ارزیابی تنوع درون و بین گونه ای این گیاهان پرداخت.

هدف از این مطالعه تشخیص محدویت های خاص و تعیین میزان قرابت های گونه های دارای شباهت ریختی بالا در جنس *Prosopis* در ایران بوده است. در این بررسی الگوهای الکتروفورزی پروتیئن بذر به منظور حصول روابط تباری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی پروتئین های بذر در گونه‌های مختلف کهور از نواحی مختلف پراکنش این گیاهان نمونه برداری صورت گرفت. کلیه نمونه‌های مورد بررسی در هرباریوم دانشگاه الزهرا نگاهداری می‌شوند (جدول ۱). جهت استخراج پروتئین ابتدا بذرها را از غلاف خارج کرده و ۱ گرم از بذر هر نمونه در هاون چینی ساییده شد. وقتی بذر کمی حالت پودری پیدا کرد به تدریج بافر Tris -HCl، ۰٫۱ M (pH=7.5) به بذرها اضافه و همزمان ساییده شد. عصاره به دست آمده را در لوله اپندروف تمیزی ریخته و به مدت

۱۵ دقیقه با سرعت ۱۷,۶۰۰g در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Emre, 2011).

نمونه ها در حجم معینی از بافر نمونه حل شده و برروی ژل آکریل آمید قرار گرفتند. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت و با جریان متغیر به مدت ۲ ساعت انجام شد. سپس ژل به مدت ۳۰ دقیقه در رنگ کوماسی بلو 0.1% R250 رنگ‌آمیزی و به مدت ۲٤ ساعت رنگ بری شد (Laemmli, 1970).

در بعضی نمونه ها از رنگ آمیزی با نیترات نقره استفاده شد. به این منظور ژل یک ساعت در محلول تثبیت کننده قرار گرفت و سه بار با اتانول ۵۰ درصد هربار به مدت ۲۰ دقیقه شستشو داده شد. سپس یک دقیقه در محلول تیوسولفات سدیم (Pre-treating) غوطه ور و سه بار به مدت ۲۰ ثانیه با آب شسته و در محلول رنگ آمیزی قرار گرفت و مجددا سه بار هر بار ۲۰ ثانیه توسط آب مقطر شسته شد و سپس از محلول آشکارکننده جهت ظهور باندهای پروتئینی استفاده شد.

قبل از اینکه عصاره‌های حاصل از استخراج روی ژل برده شوند سنجش پروتئین به روش براد- فورد انجام گرفت. وزن مولکولی پروتئین های مورد مطالعه با تعیین Rf (Relative factor) و مقایسه با نمودار استاندارد وزن مولکولی تعیین شد. حرکت نسبی یا Rf هر باند پروتئینی براساس رابطه زیر به دست می‌آید:

$$Rf = \frac{\text{فاصله‌ای که هر باند روی ژل حرکت می‌کند}}{\text{فاصله‌ای که برومونول بلو طی می‌کند}}$$

برای رسم نمودار استاندارد وزن مولکولی پروتئین‌ها از پروتئین مارکرهای وزن مولکولی شامل بتا گالاکتوزیداز (ß-galactosidase) ۱۱٦ کیلو دالتون، سرم آلبومین گاوی (albumin Bovine serum) ٦٦/۲کیلو دالتون، اوآلبومین (Ovalbumin) ٤٥ کیلو دالتون، لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase) ۳۵ کیلو دالتون، اندونوکلئاز محدودالاثر Bsp981 (Restriction endonuclease) ۲۵ کیلودالتون، بتا لاکتوگلوبولین (ß -lactoglobulin) ۱۸/٤کیلو دالتون و لیزوزیم (Lysozyme) ۱٤/٤کیلودالتون، استفاده شد. مخلوط این پروتئین‌ها بر روی ژل برده شد و Rf آنها محاسبه گردید. رابطه بین لگاریتم وزن مولکولی این پروتئین‌ها و Rf آنها نمودار استاندارد وزن مولکولی را به وجود آورد. سپس Rf پروتئین‌های مورد بررسی نیز محاسبه گردید و با استفاده از نمودار استاندارد، وزن مولکولی آنها تعیین شد.

به منظور تجزیه و تحلیل آماری باندهای پروتئینی، ابتدا تعداد باندها مشخص گردید. مقادیر Rf یا حرکت نسبی برای باندهای

پروتئینی به دست آمد و وزن مولکولی آنها محاسبه شد. به منظور آنالیزهای آماری چند متغیره در هر نمونه بر اساس وجود(کد۱) یا فقدان (کد۰) هر باند پروتئینی کد دهی شدند. در آنالیز های آماری چند متغیره از روش‌های تجزیه خوشه ای استفاده شد (Ingrouille, 1986). برای تعیین موقعیت هر باند پروتئینی در SDS-PAGE علاوه بر استفاده از دانسیتومتر، از مطالعات چشمی نیز می توان استفاده کرد. برای تعیین میزان شباهت میان گونه‌های بررسی شده از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard Coefficient) استفاده شد:

$$J=\frac{a}{a+b+c}$$

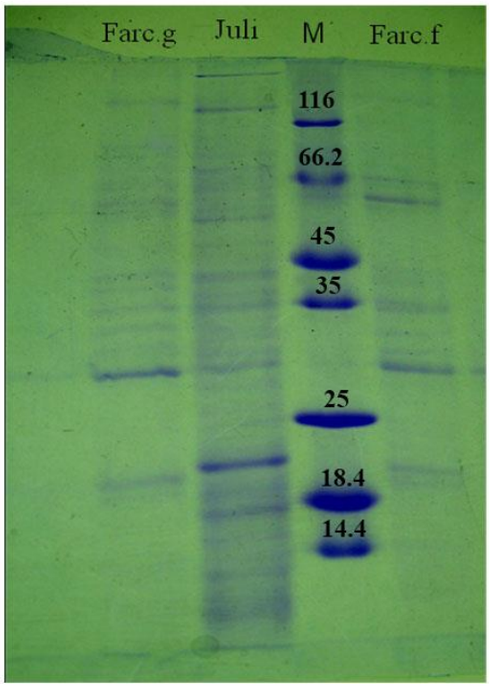
اگر P تعداد باند های پروتئینی باشد که در گونه‌های مورد بررسی وجود دارد، P=a+b+c+d آنگاه a تعداد باندهای موجود در هر دو نمونه، b تعداد باندهای انحصاری گونه اول، c تعداد باندهای انحصاری گونه دوم است. به منظور آنالیزهای آماری چند متغیره، باندهای پروتئینی باندهای پروتئینی به عنوان صفات کیفی در نظر گرفته شدند.

جدول ۱: نام تاکسون، محل جمع‌آوری و شماره هرباریومی گیاهان مطالعه شده در این پژوهش

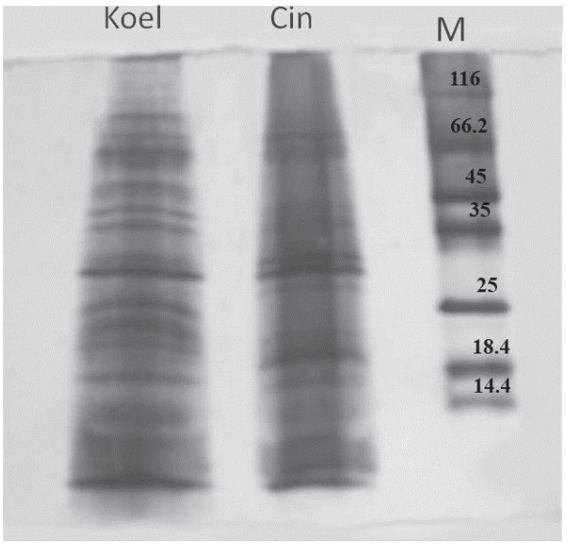
نام تاکسون	محل جمع‌آوری و شماره هرباریومی
P. cineraria Druce	دزفول، صفی آباد، باغ گیاهشناسی فدک، رئیسی للری، ۹۰۲،
P. juliflora D.C.	جزیره خارک، کشاورزی، ۹۰٤
P. koelziana Burkart	هرمزگان، بوشهر،حاجی آباد، عسکری، ۹۰۱
P. farcta var *farcta* J.F.Macbr	خوزستان، گتوند، رئیسی للری، ۹۱۹
P. farcta var *glabra* Burkart	فارس، داراب، رئیسی للری، ۹۲۲

نتایج

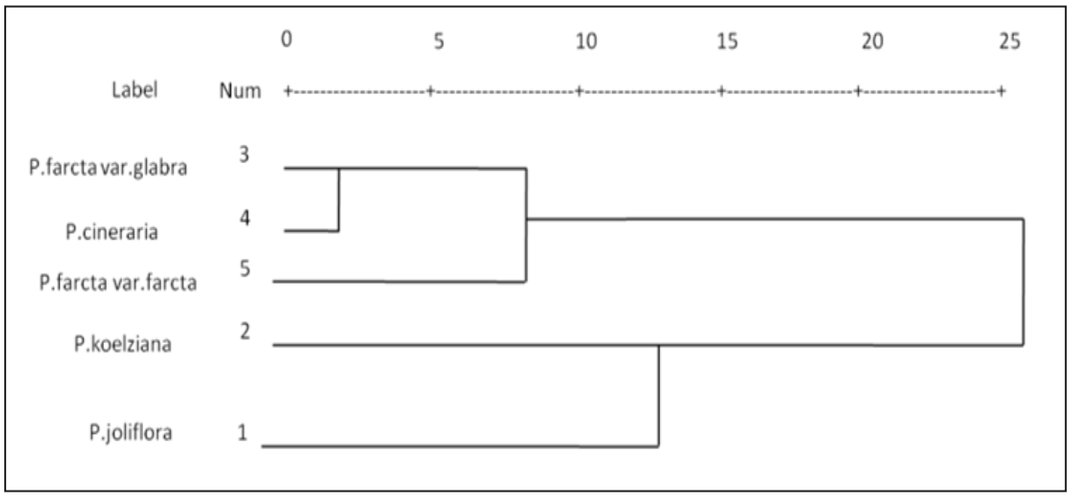
پروفیل حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره ای بذر در گونه های کهور معرف وجود ۲۲ باند می‌باشد (شکل ۱). در این بررسی دو گونه *P. cineraria* و *P. koelziana* غلظت پروتئینی کمتری نسبت به سایر گونه‌ها داشتند به همین علت این دو نمونه به طور جداگانه روی ژل برده شد و به روش رنگ آمیزی نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۲). وزن مولکولی مربوط به باندها با استفاده از پروتئین استاندارد (جدول ۲) و ضریب تشابه جاکارد محاسبه شد (جدول ۳). نمودار خوشه بندی به روش Ward بر اساس صفات وجود یا فقدان باندهای پروتئینی رسم شد (شکل۳).



شکل ۱: تصویر الگوی باندی بر روی ژل الکتروفورزی ۱۲٪ (رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو)
(Farc. g: *P. farcta* var. *glabra*, Juli: *P. juliflora*, M: marker, Farc.f: *P. farcta* var. *farcta*)



شکل ۲: تصویر الگوی باندی بر روی ژل الکتروفورزی ۱۲٪ (رنگ آمیزی شده با نیترات نقره)
(Koel*: P. koelziana*, Cin: *P. cineraria*, M: marker)



شکل۳: نمودار خوشه بندی به روش Ward بر اساس ویژگی های الکتروفورزی در گونه های کهور مورد بررسی

از ۲۲ باند مشاهده شده، یک باند در بین هر چهار گونه مشترک بود. ٤ باند در *P. juliflora* به صورت انحصاری وجود داشت. در *P. farcta* var. *farcta* یک باند و در *P. farcta* var. *glabra* نیز دو باند انحصاری وجود داشت. بین *P. juliflora* و *P. farcta* var.*glabra* ۳ باند مشترک و بین این گونه و *P. farcta* var *farcta* ٤ باند مشترک وجود داشت. بین *P.juliflora*، *P. koelziana* و *P.cineraria* ۳ باند مشترک در هر مورد وجود داشت. بین دو واریته ی *P. farcta* ٥ باند مشترک دیده شد. بین گونه‌های *P. cineraria* و *P. koelziana* ۳باند و بین *P. cineraria* و *P. farcta* var. *farcta* ٤ باند مشترک دیده شد. بین *P. cineraria* و *P.farcta* var. *glabra* بیشترین تعداد باندهای مشترک (٦ باند) وجود داشت. بین *P. farcta* var. *farcta* و *P. koelziana* ۳ باند مشترک وجود داشت. بین *P. koelziana* و *P.farcta* var. *glabra* نیز۳ باند مشترک بود. بر این اساس گونه‌های *P. cineraria* و *P. farcta* var. *glabra* بیشترین نزدیکی را داشتند.

جدول۲: حضور و فقدان باندهای پروتئینی در گونه‌های کهور مورد بررسی
(علائم اختصاری گونه‌ها مطابق شکل‌های ۲ و ۳)

Farc.f	Cin	Farc.g	Koel	Juli	MW
۰	۰	۰	۰	۱	۱۱۲/۲
۰	۰	۱	۰	۰	۱۰٤/۷۱
۱	۰	۰	۰	۰	۱۰۰
۰	۰	۰	۰	۱	۹۷/۷۲
۱	۰	۰	۰	۰	۸۱/۲۸
۰	۰	۰	۱	۱	۸۵/۷۵

Farc.f	Cin	Farc.g	Koel	Juli	MW
۰	۱	۱	۰	۰	۷۰/۷۹
۰	۰	۰	۰	۱	٦۷/۸
۰	۱	۱	۰	۰	٦٤/٥٦
۱	۰	۱	۰	۰	٦۳/۰۹
۰	۰	۰	۱	۱	٥۸/۸۸
۱	۱	۱	۱	۱	٤٦/۷۷
۰	۰	۰	۰	۱	٤۱/٦۸
۱	۱	۱	۰	۱	۳۹/۸۱
۱	۰	۰	۰	۱	۳۸
۱	۱	۱	۰	۰	۳٤
۱	۱	۱	۱	۰	۲۹/٥۱
۱	۱	۱	۰	۰	۲۳/۹۸
۱	۱	۱	۰	۰	۱۹/۹
۰	۰	۱	۱	۱	۱۷/۷۸
۰	۱	۰	۱	۱	۱٦/۲۱
۱	۰	۰	۰	۰	۱۳/۸

جدول ۳: ضریب تشابه جاکارد براساس ویژگی های الکتروفورزی پروتیئن بذر در گونه های *Prosopis*

	P. juliflora	*P. koelziana*	*P. farcta* var. *glabra*	*P. cineraria*	*P. farcta* var. *farcta*
P. juliflora	–	۰/٥	۰/۱٥	۰/۱۷	۰/۲۱
P. koelziana	۰/٥	–	۰/۲۱	۰/۲۷	۰/۲
P. farcta var.	۰/۱٥	۰/۲۱	–	۰/٦	۰/۳٥
P. cineraria	۰/۱۷	۰/۲۷	۰/٦	–	۰/۳
P. farcta var.	۰/۲۱	۰/۲	۰/۳٥	۰/۳	–

بحث

در این پژوهش برای اولین بار در ایران (برای ٤ گونه) و در جهان برای گونه‌های *P.farcta* (هر دو واریته) و *P.koelziana* پروفیل‌های حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مطالعه و با هم مقایسه شدند. بر اساس الگوی باندینگ پروتئین، گونه‌های *P. cineraria* و *P. farcta* var. *glabra* بیشترین نزدیکی را داشتند. این بررسی امکان جدایی ٤ گونه و دو واریته *P.farcta* را فراهم کرد. پیش از این Burghardt and Palacios در سال ۱۹۹۷ توانسته بودند براساس الکترو فورز پروتئین بذر در دیگر گونه‌های *Prosopis* این گونه‌ها را از هم جدا کنند.

در این پژوهش برای اولین بار در دنیا آلبومین ذخیره ای بذر در گونه‌هایی از *Prosopis* یعنی گونه‌ی *Prosopis farcta* var. *farcta* و *P. farcta* var. *glabra* و *P. juliflora* مطالعه شد. شباهت نسبتا زیادی در وجود یا فقدان باند های آلبومینی در این سه گونه دیده شد. از ۱۸ باند مشاهده شده،۱۱ باند بین *P. juliflora* و *P. farcta* var. *glabra* و ۱۰ باند بین دو واریته *P. farcta* و ۸ باند بین *P. juliflora* و *P. farcta var.farcta* مشترک است. همچنین سه باند در *P.farcta* var. *glabra* و یک باند در *P. juliflora* به صورت انحصاری وجود داشت. بیشترین تشابه بین دو واریته *P. farcta* وکمترین تشابه بین *P. juliflora* و *P. farcrta* var. *farcta* مشاهده شد. Vaz در سال ۲۰۰٤ گونه های *Lathyrus* را از نظرآلبومین بررسی و آنها را به این وسیله از هم تفکیک نمود. ارزش تفکیکی بررسی آلبومین در بررسی حاضر نیز اثبات شده است.

بر اساس مطالعات تشریحی، ریخت‌شناسی و گرده‌شناسی *P. cineraria* و *P. koelziana* به هم نزدیک هستند(رئیسی للری، ۱۳۹۱) و بیشترین شباهت را نشان می‌دهند. واریته‌های *P. farcta* با *P.cineraria* خویشاوندی نشان دادند. واریته ها غالبا بر اساس وجود یا فقدان کرک در شاخ و برگ از هم تفکیک می شوند. در تحقیق حاضر مشخص شد که دو واریته فوق از نظر الگوی الکتروفورزی پروتئین نیز جدا هستند.

گونه *P. juliflora* از سایر گونه ها جدا واقع شد و نزدیکی کمتری با سایر گونه های مورد بررسی نشان می‌دهد. Burkart در سال ۱۹۷٦ این گونه را به علت تفاوت های ریختی در بخشه جدا گانه (*Algarobia*) قرار داد که نسبت به سه گونه دیگر در بررسی حاضر دورتر است. این جدایی در این بررسی نیز تائید می‌شود.

در خصوص *P. koelziana* در سال ۱۹۷٦ Burkart، احتمال منشا دورگه (بین *P. farcta* و *P. cineraria*) را مطرح نمود اما در این پژوهش با وجود نزدیکی این گونه‌ها به هم، شواهدی مبنی بر دورگه بودن آن مشاهده نشد به علاوه الگوی الکتروفورزی پروتئین های بذر این گونه بیشتربه گونه *P. juliflora* شباهت داشت. نظر به سازش این گیاهان به زیستگاه‌های خشک و ارزش آنها در حفظ خاک مناطق گرم و خشک، بررسی تنوع ژنتیکی آنها در ایران جهت پژوهش‌های آتی توصیه می‌شود.

منابع

رئیسی للری، ف. (۱۳۹۱). بررسی بیوسیستماتیکی *Prosopis*(Fabaceae) در ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشگاه الزهرا، تهران.

Arslan, E. and Ertugrul, K.;(2010). Genetic relationships of the genera *Onobrychis*, *Hedysarum* and *Sartoria* using seed storage proteins. Turk. J. Bio. 34:67-73.

Burkart, A. (1976). A monograph of the genus *prosopis* (Legominosae subfam mimosoideae). J. Arnold Arbor., 57:450-535.

Burghardt, A.D., Palacios R.A.;(1997). Electrophoretic characterization of the American sections *Prosopis*(Leguminosae: Mimosoideae). Bull. Int. Group for the Study of Mimosoideae, 20: 71-83.

Catalano, S.A., Vilardi, J.C., Tosto, D. and Saidman, B.O.;(2008). Molecular phylogeny and diversification history of *Prosopis* (Fabaceae: Mimosoideae). Biol. J. Linnean Soc., 93: 621–640.

Emre, I.;(2011). Determination of genetic diversity in the *Vicia* L. (Section *Vicia*) by using SDS-PAGE. Pakistan J. Bot., 43(3): 1429-1432.

Ingrouille, M.J.;(1986). The construction of cluster webs in numerical taxonomic investigation. Taxon, 35:541-545.

Laemmli, U.K.; (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Mondal, A.K. and Mondal (Parui), S.;(2011). "Circumscription of the families within Leguminales as determined by cladistic analysis based on seed protein." Afr. J. Biotechnol., 10(15):2850-2856.

Mottura, M.C. ;(2006). Development of microsatellites in *Prosopis* spp. and their application to study the reproduction system. PhD thesis, Georg-August University of Göttingen.

Mwangi, E. and Swallow, B.;(2005). Invasion of *Prosopis juliflora* and local livelihoods: Case study from the lake Baringo area of Kenya. ICRAF Working Paper – no. 3. Nairobi: World Agroforestry Centre.

Pasiecznik, N.M., Felker, P., Harris, P.J.C., Harsh, L.N., Cruz, G., Tewari, J.C., Cadoret, K. and Maldonado, L.J.; (2001).: The *Prosopis juliflora* - *Prosopis pallida* Complex: A Monograph. HDRA, Coventry, UK. pp.172.

Vaz. A.C., Pinheiro, C., Martins, J. M. N.;(2004). Cultivar discrimination of Portuguese *Lupinus albus* by seed protein electrophoresis: the importance of considering "glutelins" and glycoproteins. Field Crops Res., 87: 23-34.