

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

فریبا ریسی لری^۱، مریم کشاورزی^۲، پریناز قدم^۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۰

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. دانه‌های این گیاه دارای مقادیر زیادی ترکیبات قندی و پروتئینی است. در این پژوهش با جمع‌آوری بذر از واحدهای جمعیتی از ۵ رویشگاه این گیاهان، ویژگی‌های الکتروفورزی پروتئین‌های بذر در ۴ گونه‌ی جنس *Prosopis* موجود در ایران مشتمل بر *P. cineraria*، *P. farcta*، *P. juliflora* و *P. koelziana* مورد مطالعه قرار گرفتند. هدف از این مطالعه استفاده تاکسونومیکی از ویژگی‌های الکتروفورزی پروتئینی نخیره 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 گونه‌ها 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 ۴ گونه) و در جهان برای گونه‌های *P. farcta* (هر دو واریته) و *P. koelziana* پروفیل‌های حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مطالعه شده و جدایی تاکسون‌های مورد بررسی تائید شد. برای نخستین بار آل‌بومین ذخیره‌ای 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* از سایر گونه‌های مورد بررسی جدا بود. گونه *P. koelziana* در الگوی الکتروفورزی پروتئین بذر بیشترین شباهت را به *P. juliflora* نشان داد. ارزش تفکیکی یافته‌های پروتئینی مورد بحث واقع شده است.

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

مقدمه

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

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 (Pasiecznik, Mwangi and Swallow, 2005) (et al. 2001). تعدادی از گونه‌های این جنس با خشک‌ترین مناطق جهان سازگاری دارد (Catalano, et al. 2008). در ایران سه گونه بومزاد (هر سه در بخشه *Prosopis*) شامل *P. farcta* J. F. Macbr.، *P. cineraria* Druce و *P. koelziana* Burkart (Mottura, 2006) و

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 پروتئین‌ها تغییر ماهیت داده و منجر به اسیدهای آمینه می‌شوند که منبع غذایی جنین در حال نمو است. پروفیل‌های 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 رقم‌های زراعی، حصول اطمینان از تشخیص صحیح گونه، کمک به تفاسیر بیوسیستماتیکی، مطالعه روابط تبارشناختی گونه‌ها و تنوع ژنتیکی گیاهان مختلف بهره گرفته شده است.

Ertugrul و Arslan در سال ۲۰۱۰ با بررسی الگوهای حاصل از الکتروفورز پروتئین ذخیره‌ای بذر در گونه‌هایی از گیاهان قبيله Hedysareae دریافتند الگوی خوشه‌بندی حاصل از تفسیر نتایج از لزوم انتقال به *Sartoria hedysaroides* Boiss. Helder *Hedysarum* L. حمایت می‌کند. 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 خانواده‌های 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 پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در ۹ تاکسون از جنس *Vicia* L. به ارزیابی تنوع درون و بین گونه‌ای این گیاهان پرداخت.

هدف از این مطالعه تشخیص محدودیت‌های خاص و تعیین میزان قرابت‌های گونه‌های دارای شباهت ریختی بالا در جنس *Prosopis* در ایران بوده است. در این بررسی الگوهای الکتروفورزی پروتئین بذر به منظور حصول روابط تباری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی پروتئین‌های بذر در گونه‌های مختلف کهور از نواحی مختلف پراکنش این گیاهان نمونه برداری صورت گرفت. کلیه نمونه‌های مورد بررسی در هرباریوم دانشگاه الزهراء 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 ۰.۱ M، Tris-HCl (pH=7.5) به بذرها اضافه و همزمان ساییده شد. عصاره به دست آمده را در لوله اپندروف تمیزی ریخته و به مدت

نسبی یا Rf هر باند پروتئینی براساس رابطه زیر به دست می‌آید:

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

برای رسم نمودار استاندارد وزن مولکولی پروتئین‌ها از پروتئین مارکرهای وزن مولکولی شامل بتا گالاکتوزیداز (β -galactosidase) ۱۱۶ کیلو دالتون، سرم آلبومین گاوی (albumin Bovine serum) ۶۶/۲ کیلو دالتون، اوآلبومین (Ovalbumin) ۴۵ کیلو دالتون، لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase) ۳۵ کیلو دالتون، اندونوکلاز محدودالتر Bsp981 (Restriction endonuclease) ۲۵ کیلودالتون، بتا لاکتوگلوبولین (β -lactoglobulin) ۱۸/۴ کیلو دالتون و لیزوزیم (Lysozyme) ۱۴/۴ کیلودالتون، 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

۱۵ دقیقه با سرعت ۱۷,۶۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Emre, 2011).

نمونه‌ها در حجم معینی از بافر نمونه حل شده و بر روی 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 R250 0.1% رنگ‌آمیزی و به مدت ۲۴ ساعت رنگ بری شد (Laemmli, 1970).

در بعضی نمونه‌ها 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 هر بار 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 مجدداً 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 پروتئین‌های مورد مطالعه با تعیین Rf (Relative factor) و مقایسه با نمودار استاندارد وزن مولکولی تعیین شد. حرکت

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.

پروتئینی به دست آمد و وزن مولکولی آنها محاسبه شد. به منظور آنالیزهای آماری چند متغیره در هر نمونه بر اساس وجود (کد ۱) یا فقدان (کد ۰) هر باند پروتئینی کد دهی شدند. در آنالیزهای 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

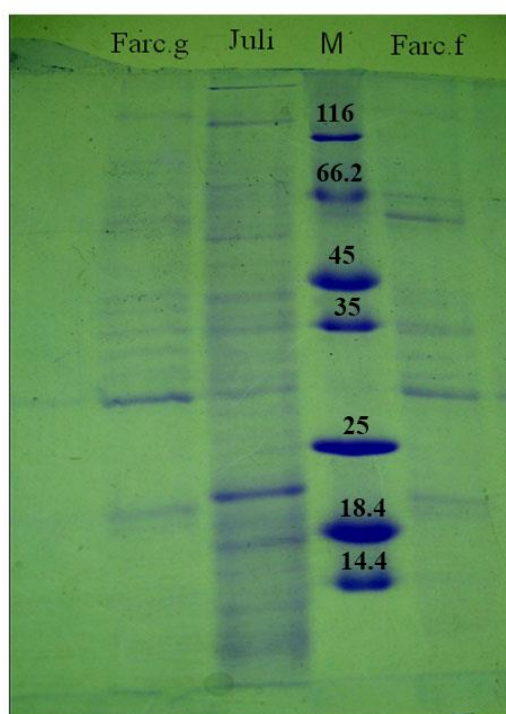
جدول ۱: نام تاکسون، محل جمع‌آوری و شماره هرباریومی گیاهان مطالعه شده در این پژوهش

| نام تاکسون | محل جمع‌آوری و شماره هرباریومی |
|--|---|
| <i>P. cineraria</i> Druce | دزفول، صفی آباد، باغ گیاهشناسی فدک، رئیسی للری، ۹۰۲ |
| <i>P. juliflora</i> D.C. | جزیره خارک، کشاورزی، ۹۰۴ |
| <i>P. koelziana</i> Burkart | هرمزگان، بوشهر، حاجی آباد، عسکری، ۹۰۱ |
| <i>P. farcta</i> var <i>farcta</i> J.F.Macbr | خوزستان، گتوند، رئیسی للری، ۹۱۹ |
| <i>P. farcta</i> var <i>glabra</i> Burkart | فارس، داراب، رئیسی للری، ۹۲۲ |

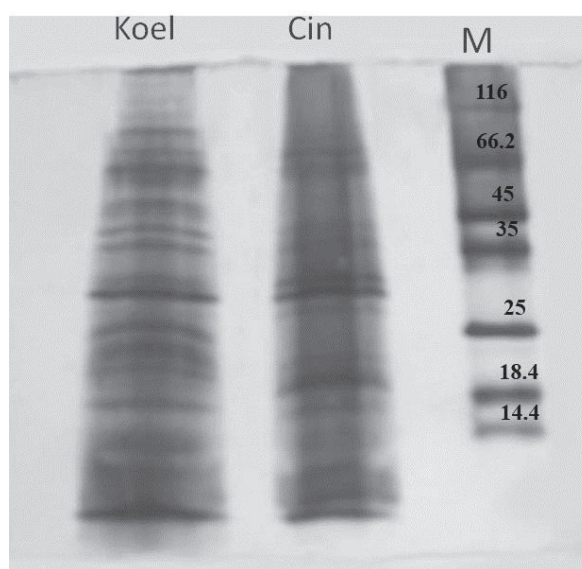
نتایج

رنگ آمیزی نیترات نقره رنگ آمیزی 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 (شکل ۳).

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



شکل ۱: تصویر الگوی بانندی 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 بانندی بر روی ژل الکتروفورزی ۱۲٪ (رنگ آمیزی شده با نیترات نقره)
(Koel: *P. koelziana*, Cin: *P. cineraria*, M: marker)

| Farc.f | Cin | Farc.g | Koel | Juli | MW |
|--------|-----|--------|------|------|-------|
| ۰ | ۱ | ۱ | ۰ | ۰ | ۷۰/۷۹ |
| ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۶۷/۸ |
| ۰ | ۱ | ۱ | ۰ | ۰ | ۶۴/۵۶ |
| ۱ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۶۳/۰۹ |
| ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۱ | ۵۸/۸۸ |
| ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۴۶/۷۷ |
| ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۴۱/۶۸ |
| ۱ | ۱ | ۱ | ۰ | ۱ | ۳۹/۸۱ |
| ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۳۸ |
| ۱ | ۱ | ۱ | ۰ | ۰ | ۳۴ |
| ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۰ | ۲۹/۵۱ |
| 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 | ۱۶/۲۱ |
| ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱۳/۸ |

جدول ۳: ضریب تشابه جاکارد براساس ویژگی‌های الکتروفورزی پروتئین بذر در گونه‌های *Prosopis*

| | <i>P. juliflora</i> | <i>P. koelziana</i> | <i>P. farcta</i> var. <i>glabra</i> | <i>P. cineraria</i> | <i>P. farcta</i> var. <i>farcta</i> |
|-----------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| <i>P. juliflora</i> | - | ۰/۵ | ۰/۱۵ | ۰/۱۷ | ۰/۲۱ |
| <i>P. koelziana</i> | ۰/۵ | - | ۰/۲۱ | ۰/۲۷ | ۰/۲ |
| <i>P. farcta</i> var. | ۰/۱۵ | ۰/۲۱ | - | ۰/۶ | ۰/۳۵ |
| <i>P. cineraria</i> | ۰/۱۷ | ۰/۲۷ | ۰/۶ | - | ۰/۳ |
| <i>P. farcta</i> var. | ۰/۲۱ | ۰/۲ | ۰/۳۵ | ۰/۳ | - |

بحث

P. farcta var. *glabra* بیشترین نزدیکی را داشتند. این بررسی امکان جدایی ۴ گونه و دو وارسته *P. farcta* را فراهم کرد. پیش از این Burghardt and Palacios در سال ۱۹۹۷ توانسته بودند براساس الکتروفورز پروتئین بذر در دیگر گونه‌های *Prosopis* این گونه‌ها را از هم جدا کنند.

در این پژوهش برای اولین بار در ایران (برای ۴ گونه) و در جهان برای گونه‌های *P. farcta* (هر دو وارسته) 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. cineraria خویشاوندی نشان دادند. واریته‌ها غالباً بر اساس وجود یا فقدان کرک در شاخ و برگ از هم تفکیک می‌شوند. در تحقیق حاضر مشخص شد که دو واریته فوق از نظر الگوی الکتروفورزی پروتئین نیز جدا هستند.

گونه *P. juliflora* از سایر گونه‌ها جدا واقع شد و نزدیکی کمتری با سایر گونه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. Burkart در سال ۱۹۷۶ این گونه را به علت تفاوت‌های ریختی در بخشه جداگانه (*Algarobia*) قرار داد که نسبت به سه گونه دیگر در بررسی حاضر دورتر است. این جدایی در این بررسی نیز تأیید می‌شود.

در خصوص *P. koelziana* در سال ۱۹۷۶ Burkart، احتمال منشأ دورگه (بین *P. cineraria* و *P. farcta*) 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 پروتئین‌های بذر این گونه بیشتر به 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.

در این پژوهش برای اولین بار در دنیا آل‌بومین ذخیره‌ای بذر در گونه‌هایی از *Prosopis* یعنی گونه‌ی *Prosopis farcta* var. *farcta* و *P. farcta* var. *glabra* و *P. juliflora* مطالعه شد. شباهت نسبتاً زیادی در وجود یا فقدان باند‌های 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 *P. juliflora* و ۸ باند بین *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* و کمترین تشابه بین *P. farcta* var. *farcta* و *P. juliflora* مشاهده شد. Vaz در سال ۲۰۰۴ گونه‌های *Lathyrus* را از نظر آل‌بومین 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 (رئیس‌المری، ۱۳۹۱) و بیشترین شباهت را نشان می‌دهند. واریته‌های *P. farcta* با

منابع

- رئیزی لری، ف. (۱۳۹۱). بررسی بیوسیستماتیکی *Prosopis* (Fabaceae) در ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشگاه الزهراء، 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* (Leguminosae 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.