

رده بندی چند رقم کدو بر مبنای میزان پروتئین کل دانه

عباس صیامی، رضا حیدری و آرزو دست پاک

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۸۰/۹/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۸۱/۳/۳۰

چکیده

میزان پروتئین کل در بذر چهار رقم از گیاهان جنس کدو تعیین گردید. سه رقم از این گیاهان (ارقام قلمی، مشهدی و کاغذی) متعلق به گونه کدو مسمایی و یک رقم مربوط به گونه کدو تنبل بودند. نتایج بدست آمده بالاترین درصد پروتئین را در کدو تنبل (۳۷/۶۰ درصد) و پایین ترین میزان آن را در کدو مسمایی رقم مشهدی (۳۶/۴۷ درصد) نشان می‌دهد. تفکیک و جدا سازی نوارهای پروتئین ذخیره دانه طبق روش لامیلی و با استفاده از سیستم الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید بر روی سدیم دودسیل سولفات انجام گرفت. الکتروفورگرام حاصل از آنالیز پروتئین ذخیره دانه ها ۲۲ باند پروتئینی را نشان می‌دهد که وزن مولکولی آنها بین ۳/۷۳ تا ۱۵۶ کیلو دالتون متغیر است و ۱۲ باند پروتئینی در تمامی ارقام مشترک می‌باشند. نمودار دندانه‌ای مبتنی بر این ۲۲ باند پروتئینی و بر اساس ماتریس تشابه، درصد تشابه و همچنین فاصله ژنتیکی ارقام را به خوبی نشان می‌دهد. اولین خوشه نمودار شامل سه رقم متعلق به گونه کدو مسمایی و دومین خوشه متعلق به کدو تنبل است که تشابه بسیار کمی با خوشه اول داشته و دارای فاصله ژنتیکی نسبتاً زیادی با سه رقم متعلق به گونه کدو مسمایی می‌باشد. این مطالعات نشان دهنده آن است که پروتئین ذخیره دانه می‌تواند برای تعیین فاصله ژنتیکی ارقام نیز مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین ذخیره، الکتروفورز، جنس کدو.

مقدمه

رشد روز افزون جمعیت، افزایش مصرف مواد غذایی و محدود بودن منابع پروتئین حیوانی، ضرورت شناسایی و دست یابی به منابع پروتئین جدید و ارزان قیمت را ایجاب می‌نماید. برای دست یابی به این هدف، هر سال مطالعات

گسترده‌ای توسط متخصصین و پژوهشگران بخصوص در مورد شناسایی و استخراج پروتئین از منابع جدید گیاهی، تشخیص و تفکیک و مطالعه اجزای پروتئین گیاهان (۷، ۸ و ۹) ترکیب و نوع اسیدهای آمینه آنها (۱۰، ۱۷ و ۱۹) و تأثیر عوامل مختلف بر روی تغییرات پروتئین در



تنبل)^۳ صورت گرفت. این گیاهان از مناطق شمالی استان آذربایجان غربی (خوی و سلماس) جمع‌آوری گردیدند. زمینهای تحت کشت این گیاهان در هر دو منطقه، باغات تخریب شده سبب بوده که تقریباً از نظر ساختمان خاک یکسان بودند و در کود دهی، از یک نوع کود حیوانی استفاده می‌گردید. دانه‌های جدا شده از میوه این گیاهان، بطور جداگانه پودر شده و پس از چربی زدایی در (استون سرد ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۴۸ ساعت)، رطوبت‌گیری گردیدند (۱۰).

تعیین درصد پروتئین: برای تعیین درصد پروتئین دانه از روش کجلدال^۴ استفاده گردید: به یک گرم بذر له شده از هر نمونه ۱۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و یک عدد قرص هضم کننده (بعنوان کاتالیزور) افزوده شد و لوله‌های هضم در دمای ۴۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۱/۵ ساعت به هر لوله ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر نیز افزوده شد. در این مرحله نمونه‌ها برای تعیین درصد پروتئین کل به دستگاه کجلدال اتوماتیک مدل ۱۰۳۰ ساخت شرکت تکاتور منتقل گردیدند. لازم به ذکر است آزمایش فوق در سه تکرار صورت گرفت.

استخراج پروتئینهای بذر و الکتروفورز: ۰/۱۳ گرم بذر خشک شده با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (۱/۰۹ درصد تریس، ۰/۴۹۴ درصد اسید بوریک با اسیدیت ۸/۴ و ۰/۰۹۳ درصد اتیلن دی‌آمین تتراسات سدیم °) مخلوط گردید. جهت جلوگیری از دیفوزیون نمونه‌ها، ۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول ۴۵ درصد ساکارز به هر نمونه افزوده شد و برای حفظ پروتئینها از تشکیل محصولات ناشی از اکسیداسیون، ۳ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول،

گیاهان انجام می‌گیرد (۴) همچنین امروزه استفاده از پروتئین‌ها و آنزیمها در رده بندی گیاهان بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۰، ۱۳، ۱۴ و ۱۸). در گذشته غالباً از خصوصیات ریخت شناسی در رده بندی گیاهان استفاده می‌شد اما با توجه به اینکه این خصوصیات تحت تأثیر شرایط محیط قرار می‌گیرند، استفاده از روشهای بیوشیمیایی (الکتروفورز، انواع کروماتوگرافی و...) متداول گردید (۲ و ۳). استفاده از الکتروفورز از آنجا اهمیت می‌یابد که بدانیم پروتئینها محصول مستقیم ژنها هستند. بنابراین از نظر ژنتیکی، اختلاف در پروتئینها باید در تغییر رفتار کروموزومی بیان گردد. طرح الکتروفورزی پروتئینهای بذر نیز به علت آنکه پایداری صفت اصلی پروتئین دانه است، در مطالعات شیمیوتاکسونومی کاربرد وسیعی یافته است (۱، ۳، ۱۰ و ۱۳). در این کار تحقیقاتی بر آن شدیم با توجه به کشت کدو بطور نسبتاً وسیع در منطقه آذربایجان غربی خصوصاً شمال این استان، راحتی کشت آن در خاکهای فقیر، خاصیت غذایی آن و احتیاج به یک منبع جدید غذایی، ابتدا دانه‌های چهار گیاه از گیاهان جنس کدو را از نظر میزان پروتئین که یکی از شاخص‌های بسیار مهم در ارزیابی ارزش غذایی دانه‌ها است مورد بررسی قرار دهیم و سپس با استفاده از طرح الکتروفورزی پروتئینهای این دانه‌ها، فاصله ژنتیکی گیاهان مزبور را تعیین نماییم.

مواد و روشها

مطالعه بر روی دانه چهار رقم از گیاهان مربوط به خانواده کدویان^۱ (سه رقم متعلق به گونه کدو مسمایی^۲ و یک رقم متعلق به گونه کدو



3- Cucurbita maxima
4- Kjejdahl
5- Na EDTA

1- Cucurbitaceae
2- Cucurbita pepo

دیسکریمینانت^۳ انجام شده توسط برنامه کامپیوتری SPSS این فاکتور را در تفکیک گیاهان مورد مطالعه فقط ۳۳/۳۳ درصد مؤثر می‌داند.

اما از نظر کمی می‌توان ملاحظه نمود که دانه‌های این چهار رقم از جنس کدو دارای درصد بالایی از پروتئین هستند و می‌توانند به عنوان یک منبع جدید پروتئین لحاظ شوند.

تجزیه و تحلیل اطلاعات الکتروفورزی: پس از محاسبه تعداد و مکان باندهای پروتئینی هر نمونه، Rm هر باند بر اساس نسبت حرکت باند پروتئینی به حرکت رنگ از ابتدای ژل تعیین گردید. با استفاده از منحنی استاندارد، می‌توان وزن مولکولی تقریبی هر باند را شناسایی نمود (جدول ۲).

سپس بر اساس حضور یا عدم حضور، هر باند کد گذاری گردید و با استفاده از قانون جوربندی ساده و ضریب تشابه^۴، تشابه هر نمونه با سایر نمونه‌ها محاسبه شد و بر اساس آن ماتریس تشابه برای پروتئینها ترسیم گردید (جدول ۳) (۱۱). این ماتریس توسط برنامه کامپیوتری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل بصورت نمودار دندانه‌ای نشان داده شده است.

۲ میلی‌گرم اسید اسکوربیک و ۲ میلی‌گرم پلی‌وینیل پیرولیدین^۱ به هر نمونه اضافه گردید.

نمونه‌ها در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفوژ گردیدند. محلول رویی حاوی پروتئینهاست که جهت تزریق به ژل استفاده می‌شود.

الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای بذرها با تکنیک SDS-PAGE^۲، بر اساس روش لامیلی و با استفاده از ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریل آمید صورت گرفت. به این صورت که پروتئینهای استخراج شده به نسبت ۱:۱ با محلول لامیلی (حاوی ۲- مرکاپتواتانول، آبی بروموفنل ۵ درصد و تریس ۱ مولار با اسیدیته ۷/۸ که به آن گلیسرول و سدیم دو سولفیل افزوده شده است) مخلوط شده و جهت تزریق آماده گردیدند. لازم به ذکر است رنگ آمیزی باندهای پروتئینی با ۲۵/۰ درصد کوماسی بلو، ۲۵ درصد ایزوپروپانول و ۱۰ درصد اسید استیک پس از مرحله فیکسسیون صورت گرفت (۱، ۱۰، ۱۳).

نتایج

نتایج اندازه گیری درصد پروتئین کل: نتایج آماری حاصل از تعیین درصد پروتئین دانه‌های چهار گیاه مورد آزمایش با سه تکرار در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین آنها با استفاده از آزمون دانکن نشان می‌دهد که میانگین‌های مربوط به درصد پروتئین در نمونه‌های مورد آزمایش در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند و بنابراین درصد پروتئین قادر به جداسازی این گیاهان از هم نمی‌باشد. آنالیز

- 1 - PVP
- 2 - Sodium Dodesyl Sulphate- olyacrylamid Gel Electrophoresis.

- 3 - Discriminant
- 4 - Simple matching



نام گیاه	دامنه تغییرات	انحراف معیار شتیانگین
کدو مسمایی رقم قلمی	۳۶/۰۱ - ۳۸/۶۸	۳۷/۴۴ ± ۰/۷۷
کدو تنبل	۳۷/۰۹ - ۳۸/۱۵	۳۷/۶۰ ± ۰/۳
کدو مسمایی رقم کاغذی	۳۷/۳۰ - ۳۷/۵۱	۳۷/۴۹ ± ۰/۱
کدو مسمایی رقم مشهدی	۳۵/۱۹ - ۳۷/۱۱	۳۷/۴۷ ± ۰/۶۴

اختلاف میانگین هایی که دارای حروف مشترک هستند از لحاظ آماری معنی دار نیست.

جدول ۲ - وزن مولکولی و Rm مربوط به باندهای پروتئینی نمونه ها برترتیب:
الف (کدو مسمایی رقم قلمی (ب) کدو تنبل (ج) کدو مسمایی رقم کاغذی (د) کدو مسمایی رقم مشهدی

شماره باند	فاصله طی شده توسط باند از ابتدای ژل (Cm)	الف	ب	ج	د	وزن مولکولی تقریبی پروتئین	Rm
۱	۰/۶	۱	۱	۱	۱	۱۵۶	۰/۰۸
۲	۰/۹	۱	۱	۱	۱	۱۴۶/۹۳	۰/۱۲
۳	۱	۰	۱	۰	۰	۱۴۳/۹۵	۰/۱۳۳
۴	۱/۱	۱	۱	۰	۱	۱۴۰/۹۸	۰/۱۴۶
۵	۱/۳	۰	۱	۰	۱	۱۳۴/۸۰	۰/۱۷۳
۶	۱/۴	۱	۱	۰	۱	۱۳۱/۸۳	۰/۱۸۶
۷	۱/۵	۱	۱	۱	۱	۱۲۸/۶۳	۰/۲
۸	۲	۱	۱	۰	۱	۱۱۳/۵۳	۰/۲۶۶
۹	۲/۱	۰	۱	۰	۱	۱۱۰/۳۳	۰/۲۸
۱۰	۲/۳	۱	۱	۱	۱	۱۰۴/۳۸	۰/۳۰۶
۱۱	۲/۵	۱	۱	۱	۱	۹۸/۲۰	۰/۳۳۳
۱۲	۲/۷	۱	۱	۱	۱	۹۲/۰۳	۰/۳۶
۱۳	۳/۳	۱	۱	۱	۱	۷۳/۷۳	۰/۴۴
۱۴	۳/۵	۱	۱	۰	۱	۶۷/۷۸	۰/۴۶۶
۱۵	۳/۶	۰	۱	۰	۱	۶۴/۵۸	۰/۴۸
۱۶	۳/۷	۱	۱	۱	۱	۶۱/۶۰	۰/۴۹۳
۱۷	۴	۱	۱	۱	۱	۵۲/۴۵	۰/۵۳۳
۱۸	۴/۳	۱	۱	۰	۱	۴۳/۳۰	۰/۵۷۳
۱۹	۴/۸	۱	۱	۱	۱	۲۷/۹۸	۰/۶۴
۲۰	۵	۱	۱	۱	۰	۲۲/۰۳	۰/۶۶۶
۲۱	۵/۶	۱	۱	۱	۱	۲/۷۳	۰/۷۴۶
۲۲	۶/۵	۱	۱	۱	۱	-	۰/۸۶۶
تعداد کل باندها		۱۸	۱۵	۲۰	۱۸		

عدد یک نشانه حضور باند پروتئینی و عدد صفر نشانه عدم حضور باند است.

جدول ۳ - نیمه ماتریس ضریب تشابه ارقام

ردیف	۱	۲	۳	۴
۱	-			
۲	۰/۶۸۲	-		
۳	۰/۹۰۹	۰/۵۹۱	-	
۴	۰/۸۱۸	۰/۵۹۱	۰/۹۰۹	-



گالاکتوزیداز، یک باند پروتئینی شناسایی می‌شود که این باند در ارقام مربوط به گونه کدو مسمایی (قلمی، کاغذی و مشهدی) دیده شد. در حالیکه این باند پروتئینی در بذر کدو تنبل مشاهده نگردید. جدول ۳ نیمه ماتریس ضریب تشابه را برای بذر ارقام مورد مطالعه نشان می‌دهد.

تجزیه کلاستر (خوشه بندی) ۲۲ باند پروتئینی بذر چهار رقم کدو که بر حسب ضریب تشابه (ضریب جفت و جور شدن ساده) و نیمه ماتریس ضریب ارقام انجام گردید نشان داد که نمودار دندانه ای حاصل، ارقام را در دو کلاس طبقه بندی می‌کند:

کلاس ۱: ارقام ۱ و ۳ و ۴ (ارقام متعلق به گونه کدو مسمایی)

کلاس ۲: رقم ۲ (متعلق به گونه کدو تنبل)

با توجه به این دو کلاس می‌توان استنباط نمود که ارقام ۱، ۳ و ۴ (متعلق به یک گونه) دارای کمترین فاصله ژنتیکی و به عبارت دیگر بیشترین قرابت ژنتیکی با یکدیگر هستند که این قرابت بین دو رقم ۳ و ۴ (کاغذی و مشهدی) بیشتر است و کلاس دوم بیشترین فاصله ژنتیکی را با سه رقم کلاس اول دارد که با توجه به حضور باندهای پروتئینی اختصاصی مشاهده شده در کدو تنبل (که متعلق به گونه‌ای دیگر است)، وجود این فاصله ژنتیکی دور از انتظار نمی‌باشد (شکل ۲).

بنابراین بر اساس این آزمایش و با توجه به نتایج سایر محققین، استفاده از الگوی الکتروفورزی پروتئینهای ذخیره دانه به منظور جداسازی، تعیین قرابت و فاصله ژنتیکی گونه‌ها و همچنین ارقام مربوط به گونه‌ها توصیه می‌گردد.

این جنس (رقم کاغذی) جهت این مهم استفاده می‌گردد (۱۶و۱۵، ۱۲، ۶).

مقایسه درصد پروتئین در نمونه‌های مورد آزمایش حاکی از این است که اختلاف معنی‌داری بین ارقام مورد مطالعه از نظر این فاکتور وجود ندارد و بنابراین درصد پروتئین نمی‌تواند بعنوان یک عامل در شناسایی این ارقام بکار رود.

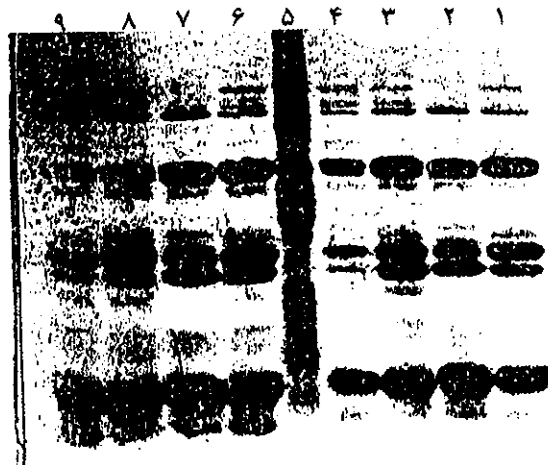
طرح الکتروفورزی پروتئینهای ذخیره بذر در مطالعات رده بندی بسیار مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴). الکتروفورزی پروتئینهای ذخیره بذر در این تحقیق، تفاوتی را از لحاظ کیفیت و کمیت پروتئینهای موجود در دانه‌ها نشان می‌دهد. بیشترین تعداد باندهای پروتئینی متعلق به کدو مسمایی رقم کاغذی و کمترین باندها مربوط به کدو تنبل است.

۱۲ باند نیز در تمامی ژنوتیپها مشترکند. برخی باندها مختص یک رقم بوده و در بقیه ارقام مشاهده نمی‌شوند. از آن جمله می‌توان به دو باند منفرد با Rm های ۰/۱۳۳ و ۰/۴۸ به ترتیب با وزن مولکولی ۱۴۳/۹۵ و ۶۴/۵۸ در کدو تنبل اشاره کرد. همچنین برخی باندها بطور متفاوت به دو یا سه گیاه اختصاص یافته‌اند (جدول ۲).

در بین گیاهان مورد مطالعه، کدو مسمایی رقم مشهدی نسبت به سایر ارقام باریکترین باندها را دارا می‌باشد. در حالیکه کدو تنبل دارای باندهای قطورتری است. ظهور هر باند معرف یک نوع پروتئین خاص (جزء) بوده و قطور بودن یک باند مربوط به بالا بودن درصد آن جزء پروتئین می‌باشد (شکل ۱).

لازم به ذکر است با استفاده از مخلوط پروتئینهای استاندارد (مارکر)، در محدوده باند بتل-



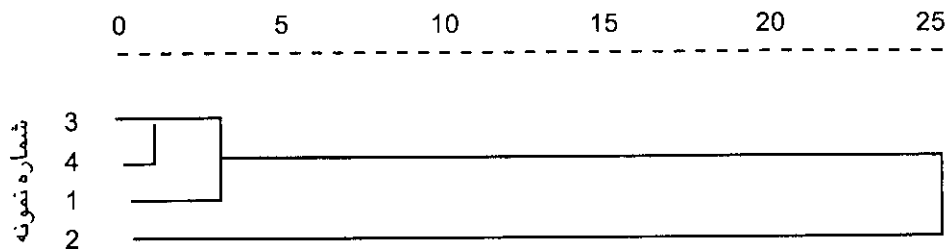


شکل ۱- باندهای پروتئینی نمونه‌های مورد آزمایش و پروتئین استاندارد. نمونه‌ها از سمت راست به چپ
 ۱ و ۶- کدو مسمایی رقم قلمی
 ۲ و ۷- کدو تنبل
 ۳ و ۸- کدو مسمایی رقم کاغذی
 ۴ و ۹- کدو مسمایی رقم مشهدی
 ۵- پروتئین استاندارد

۷۰



فاصله ژنتیکی



شکل ۲- نمودار دندانه‌ای ژنوتیپهای مورد بررسی بر مبنای مطالعه پروتئینهای بذر.
 ۱- کدو مسمایی رقم قلمی
 ۲- کدو تنبل
 ۳- کدو مسمایی رقم کاغذی
 ۴- کدو مسمایی رقم مشهدی

۱. افلاطونی، م. ۱۳۴۶. تکنیک و تفسیر انواع الکتروفورز. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۲۵ صفحه.
۲. حیدری، ر. ۱۳۶۸. سیری در زیست شیمی. (ترجمه). انتشارات مرکز نشر دانشگاهی. ۳۲۰ صفحه.
۳. خسروی، ا. ۱۳۷۵. تاکسونومی گیاهی و سیستماتیک زیستی. (ترجمه). انتشارات دانشگاه شیراز. ۳۹۰ صفحه.
۴. قربانلی، م.، ر. حیدری و م. نوجوان. ۱۹۹۷. اثر تنش خشکی بر تغییرات پروتئینهای محلول و اسیدهای آمینه در دو رقم نخود ایرانی. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۸. شماره (۱): ۶۸-۶۵.
۵. مسعودی نژاد، ع. و همکاران. ۱۳۷۶. شناسایی و طبقه بندی گندمهای ایران با استفاده از الکتروفورز گلیادین. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۸. شماره (۴): ۲۸-۲۳.
6. Bombardelli, E., and P. Morazzoni. 1997. Cucurbita pepo L. Fitoterapia, Vol. LXVIII (4): 291-302.
7. Branlard, G., and M. Dardevet. 1985. Diversity of grain proteins and bread wheat quality-1-correlation between gliadin bands and flour quality characteristics. J. Cereal. Sci. 3: 329-343.
8. Brassani, R., and L. Gareia. 1990. Protein fraction in Amaranthus grain and their chemical characterisation. J. Agric. Food Chem. 38: 1205-1209
9. Constantios, G. 1993. Assesment of the protein quality of a new high-protein soybean cultivar by Amino acid analysis. J. Agric. Food Chem. 41: 616-623.
10. Gorinstein, S., and R. Moshe. 1991. Evaluation of four Amaranthus species through protein electrophoretic pattern and their amino acid composition. J. Agric. Food Chem. 36: 851-854.
11. Jain, S.K., and R.S. Sing. 1979. Population of biology of Avena. VIII colonization experiment as a test of the role of natural selection in population divergence. Amer. J. Bot. 67: 1342-1346.
12. Jacks, T.J., and T.P. Henseling. 1972. Cucurbit seed. characteristics and uses of oils and proteins. Econ. Bot. 26: 135-141.
13. Krishnan, H.B., and D.A. Sleper. 1997. Identification of tall fescue cultivar by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamid Gel Electrophoresis of seed proteins. Crop Sci. 37: 215-219.
14. Ladizinsky, G., and S. Hymowite. 1979. Seed proteins electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. Theor. Appl. Genet. 54: 145-151.
15. Loy, J.B. 1990. Hull-less seed pumpkins: a new edible snackseed. Crop Timber press, Portland: 490pp.
16. Martin, F.W. 1984. Cucurbita seed as a possible oil and protein sources. Tropical seed 5: 27-35.
17. Ramesh, B., and M.P.S. Hudda. 1994. Study on variability and Associations involving protein content, amino acids and grain yield in sorghum. Indian J. Genetic. Vol. 54(1): 37-44.
18. Sommour, R.H. 1994. Species relationships genus lens as indicte by electrophoresis a reaorasal. Lens Newsletter. Vol. 21(2): 1-14.
19. Zarkadas, C., and D. Harrey. 1993. Assessment of protein quality of a new high-protein soybean cultivar by amino acid analysis. J. Agric. Food Chem. 41: 616-623.



Classification several pumpkin varieties based on seed total protein

A. Siami , R. Heidari and A. Dastpak

Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, IRAN.

Abstract

The amount of total protein in seed from four varieties of *Cucurbita* was identified. Three varieties of these plants (*ghalami*, *mashhadi*, *kaghazi*) were from *Cucurbita pepo* and one variety (*tanbal*) was from *Cucurbita maxima*. Result showed the total protein range between 36.47-37.60%. Isolation and analysis of seed storage protein was carried out by Lamelli method and electrophoresis with polyacrylamid gel on SDS. Electrophorgram from seed storage protein showed 22 protein bands which their molecular masses were between 3.73-156 Kd and 12 protein bands are the same. Dendrogram of these 22 protein bands and similarity matrix showed similarity percent and genetically distance among them. First cluster included three varieties of *C.pepo* and second cluster included *C.maxima*, which had very low similarity in regard to first cluster and had genetically distance with three varieties of *C.pepo*.

These result indicate that seed storage protein can be used to identify the genetically distance among varieties.

Keywords: Storage protein; Electrophoresis; *Cucurbita*.

