بررسی تنوع ژنتیکی پروتئین‌های محلول درآب ونمک با استفاده از تکنیکSDS-PAGE *Glycine Max* Merril

پوران بندریان*[1]، امید سفالیان[2]، علی اصغری[3]،محمد صدقی[3]امیر غریب عشقی[4]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی

۲-استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی

۳-دانشیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی

۴-مربی پژوهشی ،موسسه تحقیقات کشاورزی زنجان

poranbandariyan@yahoo.com

چکیده

پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به عنوان نشانگر های ژنتیکی که کمتر تحت تاثیر محیط بوده و یکنواختی و تکرار پذیری بالایی دارند به عنوان ابزاری قدرتمند در مطالعات مربوط به بررسی ارتباط و خویشاوندی ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف گیاهی تبدیل شده است.در این تحقیق ۱۷ رقم از گونه*Glycine Max* Merrilبا استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. نتایج نشان داد میانگین تنوع ژنتیکی برای تمام مکان‌های ژنتیکی برابر ۰/۴۸ و تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها را به ۴ گروه تقسیم کرد.

کلمات کلیدی: پروتئین،تنوع ژنتیکی، محلول درآب ونمک، SDS-PAGE

مقدمه

تنوع ژنتیکی در بسیاری از گیاهان زراعی مهم، از جمله گندم در اثر فرسایش ژنتیکی که یکی از پیامد های کشاورزی نوین است محدود گردیده است. کاهش تنوع علاوه بر اینکه بازدهی برنامه‌های اصلاحی را می‌کاهد، باعث ایجاد یکنواختی ژنتیکی در مزارع و آسیب‌پذیری شدید محصولات کشاورزی در برابر آفات، بیماری‌ها و تنش‌های محیطی نیز می‌گردد. از این رو محققین به دنبال یافتن منابع جدید ژنتیکی هستند تا بر این مشکلات غلبه نمایند (کیافی و همکاران. ، ۱۹۹۳).لوبیای روغنی یا سویا با نام علمی گلایسین ماکس (***Glycine Max* Merril**)گیاهی دیپلوئید(2n=40) یکساله واز تیره بقولات (Leguminosae)است.

امروزه با گسترش روش های دیگر تجزیه و تحلیل ژنتیکی،که در آنها مستقیماً از ماده ژنتیکی استفاده می شود،پژوهش های بسیار ارزشمندی در زمینه های گوناگون ،از جمله ارتباطات فیلو ژنتیکی و تکامل ،چگونگی روند زراعی شدن گیاهان و

بررسی تنوع ژنتیکی به انجام رسیده است با این وجود استفاده از الکتروفورز پروتئین های دانه به منظور تعیین و گروه بندی پلی پتید های تشکیل دهنده پروتئینی،شناسایی چند شکلی آنها در میان ژرم پلاسم موجود از جایگاه ویژه ای برخوردار است

پروتئین‌ها در دانه‌های سویا بوسیله ژل SDS –PAGEاندازه‌گیری شده است. خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین‌های دانه در حضور پروتئین‌هایی با وزن مولکولی در محدوده‌ای از ۱۱۸ و ۵۰-۷۵۸۶دالتون آشکار می‌شود و با استفاده از مارکرها می‌توان حتی تا حدود ۲۰ دالتون مشخص نمود.(آکنی مید و همکاران، ۲۰۱۰)گلوبولین های شبیه وسیلین،موسوم به بتا-کان گلایسین را در سویا جدا سازی نمودند، ونشان دادند که ظاهراً در شش فرم ایزومری با وزن مولکولی ۱۵۰تا۱۷۵ کیلو دالتون یافت می شوند. درهر ایزومر کان گلایسین،یکی از سه زیر واحد آلفا،بتاو گاما تشخیص داده شده است (براندا و اسن،۱۹۸۱). گلایسین (11s) وبتا-کان گلایسین (7s) را پروتئین های اصلی سویا می باشند. گلایسین دارای وزن مولکولی ۳۵۰۰۰۰ می باشد،و دست کم از شش زیر واحد گوناگون تشکیل شده است. هر یک از این زیر واحد ها شامل یک پلی پپتید اسیدی است که توسط یک پیوند منفرد دی سولفیدی به یک پلی پپتید بازی متصل است

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه بذور ۱۷ **رقم**مختلف از گونه*Glycine Max* Merrilمورد مطالعه قرار گرفتند. توده‌های ۱تا ۱۷ از مرکز تحقیقات اصلاح و نهال بذر کرج تهیه گردید

استخراج پروتئین‌های بذر

برای استخراج پروتئین‌های محلول در آب و نمک ابتدا بذرهای هفده رقم سویا کاملاً پودر شدند. سپس ۳۰ میلی‌گرم آرد ازهر نمونه به یک تیوپ منتقل شد و به هر کدام ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول استخراج (تریس ۵۰ میلی‌مولار باPH=۷/۵ ، کلرید سدیم ۲۰ میلی‌مولار و ۲-مرکاپتواتانول) اضافه گردید. پس از ورتکس، مخلوط و به مدت ۲ ساعت در فریزر ۲۰- و سپس در دمای اتاق قرار داده شد تا یخ آن ذوب شود. پس از آب شدن کامل، مخلوط ورتکس شده و مجدداً در فریزر قرار داده شد. عمل فریز کردن و آب کردن ۳ مرتبه تکرار شد. در نهایت نمونه‌ها توسط دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار rpm ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ فاز بالایی حاصل به تیوب اپندورف دیگری انتقال داده شد. پس از اتمام عملیات استخراج، تیوب‌های حاوی عصاره‌های پروتئینی تا شروع نمونه‌گذاری در ژل در فریزر با دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند.

الکتروفورز پروتئین‌ها

در این پژوهش برای الکتروفورز پروتئین از روش SDS-PAGE (الکتروفورز در ژل پلی‌اکریلامید در حضور سدیم دو دسیل سولفات) استفاده شد. SDS-PAGE در ژل جدا کننده ۱۰ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد به روش لاملی (۱۹۷۰) انجام گرفت. الکتروفورز به مدت ۴ ساعت انجام شد

نتایج وبحث

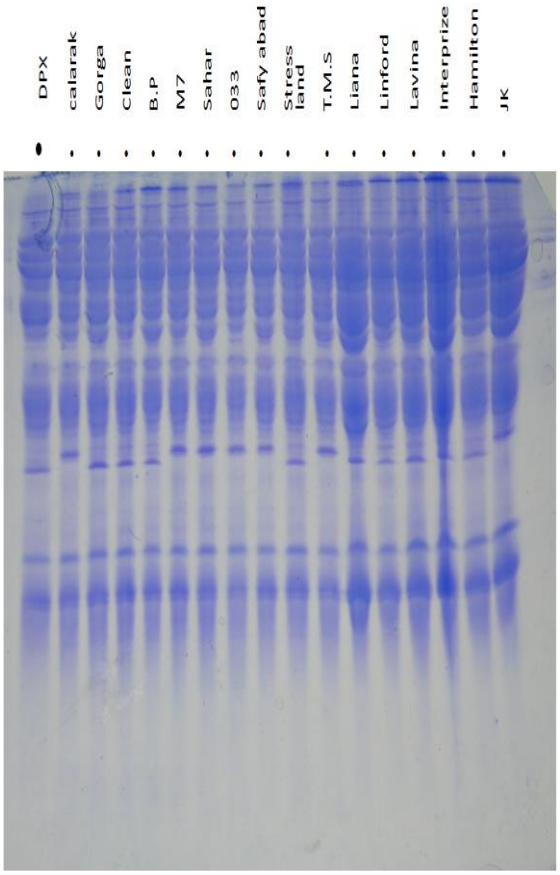
داده‌های حاصل از تجزیه پروتئین‌هایمحلول درآب ونمک در نرم‌افزار PopGen 32،NTSYS PC 2.2برای ۱۷ **رقم** از گونه*GlycineMax*Merril در انجام شد. نتایج نشان داد میانگین تنوع ژنتیکی برای تمام مکان‌های ژنتیکی برابر ۰/۴۸ و میانگین شاخص شانن ۰/۴۰۹۶ باشد.در مجموع برای ۱۷ **رقم** مورد مطالعه۳۲ باند پروتئینی مشاهد گردید که جمعیت های۳، ۶،۸، ۹،بیشترین تعداد باند و جمعیت ۱۲،۱۴،۱۵ کمترین تعداد باند را دارا بود. اگرچه باندهای پروتئینی مشترک زیادی درداخل ارقام مذکور وجود داشت، اما باندهای اختصاصی هر جمعیت نیز مشاهده شد .باندهای پروتئینی نه تنها از نظر محل قرار گرفتن روی ژل و وزن مولکولی، بلکه از لحاظ تراکم و شدت نیز با یکدیگر اختلاف نشان دادند.طبق اطلاعات بدست آمده از جدول تنوع ژنی نی، ۱۷ مکان ژنی دارای چند شکلی بودند (در مکان های ژنی ۲۲، ۲۳، ۴،۵،۱۸،۲۱هیچگونه تنوع ژنتیکی مشاهده نشد و این نشان‌دهنده این است که این مکان‌ها مونومورف می‌باشند).بیشترین تنوع ژنی مربوط به نشانگرهای شماره ۶،۲۰،۱۹،۱۱،۱۰،۷ و به میزان ۴۸ درصد و کمترین تنوع متعلق به نشانگرهای شماره ۴، ۵، ۱۸،۲۱،۲۲،۲۳ به میزان صفر درصد بوده و در کل حدود ۷۳/۹۱ درصد مکان‌های ژنی چندشکلی نشان داد

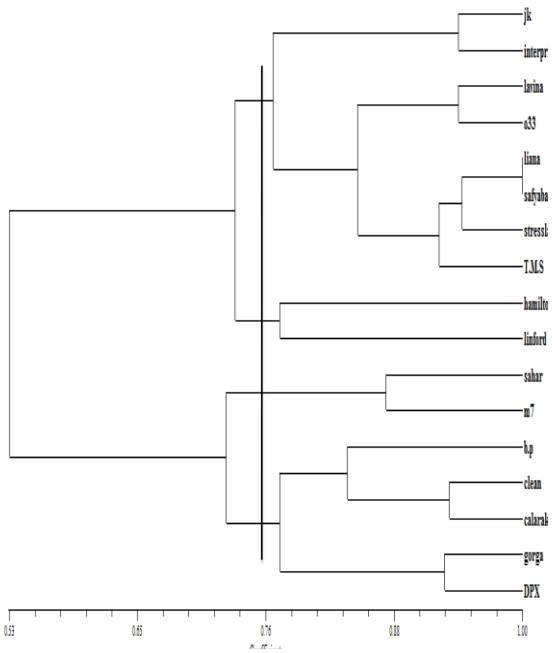
شماره لوکوس	تعداد رقم	هتروزیگوتی	شماره لوکوس	تعداد رقم	هتروزیگوتی
۱	۱۷	۰/۲۹	۱۲	۱۷	۰/۳۵
۲	۱۷	۰/۲۹	۱۳	۱۷	۰/۴۱
۳	۱۷	۰/۲۹	۱۴	۱۷	۰/۴۱
۴	۱۷	۰/۰	۱۵	۱۷	۰/۴۵
۵	۱۷	۰/۰	۱۶	۱۷	۰/۲۹
۶	۱۷	۰/۴۸	۱۷	۱۷	۰/۲۰
۷	۱۷	۰/۴۸	۱۸	۱۷	۰
۸	۱۷	۰/۲۰	۱۹	۱۷	۰/۴۸
۹	۱۷	۰/۲۰	۲۰	۱۷	۰/۴۸
۱۰	۱۷	۰/۴۸	۲۱	۱۷	۰
۱۱	۱۷	۰/۴۸	۲۲	۱۷	۰
			۲۳	۱۷	۰

جدول۱- تنوع ژنتیکی Nei

تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت و در نهایت نمودار درختی بر اساس روش UPGMA ترسیم شد. و نمودار دندروگرام طبق شکل (۱) بدست آمد.

با برش نمودار درختی در فاصله ۰/۷۶ واحد، چهار گروه حاصل گردید. بطوریکه، گروه اول شامل ارقام T.m.s,Streesland,Safyabad,Liana,033,Lavina,Interprize,jk گروه دوم شامل ارقامLinford,Hamiltonگروه سوم شامل ارقام Sahar,M.v و گروه چهارم شاملB.p,Clean,Calark,Gorga,Dpx می‌باشد.ماتریس شباهت بر مبنای ضریب تطابق ساده محاسبه شد .بیشترین شباهت یا کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به ارقام (T.m.s,وSafyabad)، با ضریب تشابه ۱ و کمترین تشابه یا بیشترین فاصله ژنتیکی بین ارقامHamilton(و)Calarakبا ضریب تشابه ۰/۳۰۴۳ بود





شکل۱)دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش همبستگی کامل **شکل۲)الگوی الکتروفورزی**

نتیجه‌گیری کلی:الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای،روشی مطمئن است که بوسیله آن میتوان اختلافات ژنتیکی وروابط بین ارقام رابررسی کرد

منابع

1-Akinamed,S.A.Oben,T.T.Soetan,K.O., 2010.Biochemical characterization of soybean(*Glycine Max*) TGX1485-1D seed proteins. PP. 851-856.

2-Branda,H.U.Esen A.1981.Hetrogenity of soybean seed proteins.J.Agric.foodchem.29:497-501.

3-Ciaffi M., Lanfiandra D., Porceddu E. Benedettelli S. 1993, Storage protein variation in wild emmer (*triticum turgidum* ssp. dicoccoides) from Jordan and Turkey. 2. Patterns of allele distribution. *TheorApple Genet*, 86, 518-5250.

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

Study of total storage protein using SDSPAGE technique in some *Glycine max* M. varieties

P. Bandarian[1]*, O.Sofalian[2], A.Asghari[3], M.Sedghi[3] and A. Gh. Eshgi[4]

1. M.Sc. student of plant breeding. University of MohagheghArdabili
2.Assistant Prof. Dep. Agronomy and Plant Breeding, University of MohagheghArdabili
3. Associated Prof. Dep. Agronomy and Plant Breeding, University of MohagheghArdabili
4. Agric. Research institute of Zanjan

poranbandariyan@yahoo.com

Abstract: Seed storage protein serve as genetic markers that not affected by environment. Also its repeatability and uniformity made it as powerful markers in variety identification and ancestral studies. In this study 17 soybean varieties were assessed by SDS-PAGE. The mean of genetic diversity in nearly all loci equal to 0.48 and cluster analysis resulted in four groups.

Key words:protein, Genetic diversity,solved in water and salt,SDS –PAGE