مطالعه ژنومی ارقام زراعی پنبه های دیپلوئید و آلوتتراپلوئید کشور با روش SDS-PAGE

سیدیعقوب معصومی۱ یوسف آقایف۲

۱- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اردبیل (مغان)

۲- عضو هیات علمی آکادمی ملی علوم جمهوری آذربایجان

Email: yamasoumi@yahoo.com

چکیده

این تحقیق به منظور شناسائی ارقام مختلف دیپلوئید و الو تتراپلوئید پنبه در مدت یک سال انجام گردید.پس از انجام الکتروفورز عمودی پروتئین‌های دانه ارقام مورد مطالعه، مجموعاً ۳۱ موقعیت برای تشکیل نوارهای پروتئین تشخیص داده شد. میانگین تعداد نوارهای تشکیل شده برای هر گونه متفاوت بود و در داخل هر گونه، ارقام دارای نوارهای متفاوتی بودند. بین ارقام گونه‌های دیپلوئید دنیای قدیم تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر تعداد نوارها و میانگین نوارها مشاهده گردید. بطوری که میانگین تعداد نوارها در ارقام گونهٔ *G.herbaceum* ، ۲۵ نوار و در گونه *G.arboreum* ، ۲۰ نوار بود. چنین تفاوتی بین ارقام گونه‌های الوتتراپلوئید نیز به وضوح دیده شد. بطوری که میانگین تعداد نوارها در ارقام گونه *G.barbadense* ، ۲۱ نوار و در گونه *G.hirsutum* ، ۱۷ نوار بود در میان ارقام دیپلوئید دنیای قدیم، رقم بنفش کرمان بیشترین نوار(۲۷ نوار) و رقم ایران-۱ کمترین نوار (۱۵ نوار) را به خود اختصاص دادند. در گونه‌های الوتتراپلوئید نیز رقم T-14 بیشترین نوار (۲۳ نوار) و رقم تاشکند-۱ کمترین نوار(۱۵ نوار) را نشان دادند.

حرکت نسبی(Relative Mobity) برای اولین موقعیت نوار برابر با ۰/۱۲ و آخرین موقعیت نوار برابر با ۰/۸۴ بود. بر این اساس، سه قسمت برروی ژل قابل تفکیک بود. نوارهای ۱(RM=۰/۱۲) تا ۱۲ (RM=۰/۳۳) در سمت مبداء ژل تحت عنوان پروتئین‌های سنگین وزن مشخص شدند. نوارهای ۱۳(RM=۰/۴) تا ۲۱ (RM=۰/۵۶) دارای وزن مولکولی سبک بود و نوارهای ۲۲ (RM=۰/۶) تا ۳۱(RM=۰/۸۴) پروتئین‌های سبک وزن بودند. قسمت اعظم تنوع ارقام مورد مطالعه از لحاظ تعداد نوارهای پروتئین مربوطه پروتئین‌های سبک بود و از لحاظ پروتئین‌های با وزن مولکولی متوسط و سنگین تنوع کمتری مشاهده شد.

مقدمه

پنبه گیاهی است دو لپه‌ای که متعلق به جنس گوسیپیوم و تیرهٔ مالواسه می‌باشد. قدمت کشت پنبه در هند و پرو به ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح بر می‌گردد. در کشور ما نیز از دوران‌های بسیار گذشته کشت انواع پنبه‌های بومی دیپلوئید رایج بوده است. گونه‌های جنس *Gossypium* شامل گونه های دیپلوئید (۲n=۲x=۲٦) و گونه های الوتتراپلوئید(۲n=٤x=٥۲) می‌باشد. انواع زراعی آن یکساله بوده و دو گونهٔ دیپلوئید *G.herbaceum* و *G.arboreum* و دو گونه الوتتراپلوئید *G.barbadense* و *G.hirsutum* را شامل می‌شوند. قسمت اعظم ارقام پنبه کشت شده در جهان (حدود ۸۰٪) مربوط به ارقام گونهٔ *G.hirsutum* می‌باشد. از نظر منشاء گونه‌های

دیپلوئید متعلق به دنیای قدیم و دنیای جدید بوده و دارای فرمول ژنومی A تا G هستند در حالیکه گونه‌های الوتتراپلوئید متعلق به دنیای جدید هستند و فرمول ژنومی آنها به صورت AD نامگذاری شده‌است. منظور از دنیای قدیم یعنی آفریقا، آسیا(بخصوص هندوستان و استرالیا) است و دنیای جدید شامل آمریکای مرکزی و مکزیک می‌باشد. از لحاظ کروموزومی ارقام گونه‌های دیپلوئید دنیای قدیم دارای ۲۶ کروموزوم بزرگ و ارقام گونه‌های دیپلوئید دنیای جدید ۲۶ کروموزوم کوچکتر دارند.

پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر پنبه:

پروتئین‌های موجود در کنجالهٔ پنبه دانه به صورت آلبومین و گلوبولین هستند. دو گلوبولین ذخیره‌ای عمده از پنبه دانه جدا شده است که با نام‌های آلکالین A و آلکالین B نامگذاری شده‌اند. این گلوبولین‌ها به ترتیب به گلوبولین‌های ۷۶ و ۱۲۶ موسوم می‌باشند. آلکالین A شامل سه زیر واحد پلی‌پپتیدی بوده و در آرایش پلی پپتیدهای آن پیوند دی‌سولولفیدی وجود ندارد و در حالیکه آلکالین B شامل سه زیر واحد پلی پپتیدی با آرایش واحد پیوند دی سولفیدی می‌باشد. در آرد بدون چربی مغز بذر پنبه بطور متوسط میزان اسیدآمینه‌های اسیدگلوتامیک، آرژنین، اسید آسپارتیک و لوسین بیشتر از سایر اسیدهای آمینه می‌باشد.

الکترفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای پنبه‌دانه و کاربرد آن:

تجزیه پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه از طریق الکتروفورز عمودی روش قدرتمندی در تشخیص تنوع ژنتیکی می‌باشد. در روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید (SDS-PAGE)، قسمت اعظم پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مورد مطالعه قرار می‌گیرند.

الگوهای حاصل از این روش، بیشتر تحت تأثیر ژنوتیپ قرار می‌گیرند. به همین دلیل، ثابت بودن الگوهای نواربندی پروتئین‌ها امکان استفاده از آنها را به عنوان نشانگر برای بررسی‌های مختلف از قبیل تشخیص ارقام زراعی، بررسی خلوص آنها، گواهی بذر و حفظ ذخایر ژرم‌پلاسم فراهم می‌نماید. در یک مطالعه، کیپس و نرکار در هیبریدها و واریته‌های پنبه‌های آسیایی و آمریکایی از الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید پروتئین‌های محلول بذر برای شناسایی کولتیوارها و تعیین خلوص ژنتیکی آنها استفاده کرده‌اند. آنها با استفاده از مشابهت باندهای پروتئین در مدت زمان کوتاهی و بدون انجام عملیات زراعی و صرفه‌جویی در وقت و هزینه، خلوص ژنتیکی بذور هیبرید را تعیین کردند.

اگراوال و همکاران در مطالعه برروی الگوهای پروتئین بذر دو نوع پنبه هیبرید و والدین آنها، رابطهٔ نوارهای موجود در هیبریدها و والدین آنها را بررسی کردند.

ویگیل و همکاران واکوئلهای ذخیرهٔ پروتئین در لپه‌ها و ریشه‌های بذر واریتهٔ CV.M-8 از گونهٔ *G.hirsutum* را از لحاظ بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار دادند. در بررسی آنها مشخص گردید که واکوئل‌های ذخیرهٔ پروتئین در ریشه‌ها و لپه‌ها از لحاظ پلی‌پپتیدهای پروتئین ذخیره‌ای کاملاً مشابه هستند ولی از نظر غلظت تفاوت‌هایی با هم

دارند. بطوریکه، برخی از نوارها در الگوی پروتئین مربوط به لپه‌ها(با وزن مولکولی کمتر) موجود بوده در حالیکه در الگوی پروتئینی مربوط به ریشه‌چه نوارهای متناظر دیده نشد.

بطور کلی در پنبه از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه برای شناسایی واریته‌های مختلف، تفکیک پروتئین‌های بذر به اجزای تشکیل دهنده، بررسی خویشاوندی گونه‌ها و تکامل آنها و مطالعهٔ تنوع ژنتیکی استفاده شده‌است. با توجه به اهمیت ویژه گیاه پنبه از نظر تولید الیاف و همچنین تأمین بخشی از نیازهای روغنی مصرف انسان، انجام مطالعات پایه در این گیاه ضروری است. در این بررسی، منظور شناسایی ژنوتیپ‌های دیپلوئید و الوتتراپلوئید و تفکیک ژنومی ژنوم‌های دیپلوئید از الوتتراپلوئید، پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در ۱۶ رقم زراعی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۱۶ رقم زراعی موجود در آزمایشگاه تکنولوژی بذر دانشکدهٔ کشاورزی تبریز بود. در تحقیق حاضر از روش الکتروفورز یک بعدی لایملی(۱و٤) استفاده گردید.

استخراج پروتئین‌ها: اسخراج پروتئین‌های بذری توسط محلول تریس-کلرورسدیم که پروتئین‌های کلی را استخراج می‌کند، صورت گرفت. با خرد کردن مغز پنبه‌دانه در هاون چینی، از آرد حاصل ٤٠ میلی‌گرم به همراه یک میلی‌لیتر استخراج درون لوله اپندورف ریخته شد. بعد از بهم زدن محتویات لوله توسط هم‌زن طی ۳ تا ٤ نوبت، محلول حاصل در فریزر منجمد و نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها ۳ لایه در لوله‌های اپندورف ظاهر گردید. یک لایه چربی در بالا، یک لایه حاوی مواد غیر محلول در زیر و بین این دو لایه، محلول شفاف که حاوی عصاره‌های پروتئین است.

همزمان با تهیه محلول‌های ژل، محلول رنگی لازم برای نمونه‌گذاری شامل ساکارز، SDS و آبی بروموفنل(نشانه رنگی)تهیه گردید. در قالب ژل تهیه شده به صورت عمودی ابتدا ژل ٤/٥٪، سپس ژل ۱۰٪ به ارتفاع ۱۰ سانتیمتر ریخته شد. با توجه به اینکه ۱٦ رقم در این مطالعه، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد از یک شانه ۱٦ تایی جهت ایجاد چاهکها در ژل بالایی استفاده شد. پس از خارج کردن شانه از ژل، به مقدار ۱۵ میکرو لیتر از نمونه‌های پروتئینی آماده در چاهکها ریخته و عملیات راه‌اندازی الکتروفورز شروع گردید. شدت جریان در این تحقیق ۲۵میلی آمپر و مدت زمان الکتروفورز ٤ ساعت تعیین گردید.

نتایج و بحث:

پس از انجام الکتروفورز عمودی پروتئین‌های دانه ارقام مورد مطالعه، مجموعاً ۳۱ موقعیت برای تشکیل نوارهای پروتئین تشخیص داده شد. میانگین تعداد نوارهای تشکیل شده برای هر گونه متفاوت بود و در داخل هر گونه، ارقام دارای نوارهای متفاوتی بودند. بین ارقام گونه‌های دیپلوئید دنیای قدیم تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر تعداد نوارها و میانگین نوارها مشاهده گردید. بطوری که میانگین تعداد نوارها در ارقام گونهٔ *G.herbaceum* ، ۲۵ نوار و در گونه *G.arboreum* ، ۲۰ نوار بود. چنین تفاوتی بین ارقام گونه‌های الوتتراپلوئید نیز به وضوح دیده شد.

بطوری که میانگین تعداد نوارها در ارقام گونه *G.barbadense* ، ۲۱ نوار و در گونه *G.hirsutum* ، ۱۷ نوار بود در میان ارقام دیپلوئید دنیای قدیم، رقم بنفش کرمان بیشترین نوار(۲۷ نوار) و رقم ایران-۱ کمترین نوار (۱۵ نوار) را به خود اختصاص دادند. در گونه‌های الوتتراپلوئید نیز رقم T-14 بیشترین نوار (۲۳ نوار) و رقم تاشکند-۱ کمترین نوار(۱۵ نوار) را نشان دادند.

حرکت نسبی(Relative Mobity) برای اولین موقعیت نوار برابر با ۰/۱۲ و آخرین موقعیت نوار برابر با ۰/۸٤ بود. بر این اساس، سه قسمت برروی ژل قابل تفکیک بود. نوارهای ۱(RM=۰/۱۲) تا ۱۲ (RM=۰/۳۳) در سمت مبداء ژل تحت عنوان پروتئین‌های سنگین وزن مشخص شدند. نوارهای ۱۳(RM=۰/٤) تا ۲۱ (RM=۰/٥٦) دارای وزن مولکولی سبک بود و نوارهای ۲۲ (RM=۰/٦) تا ۳۱(RM=۰/۸٤) پروتئین‌های سبک وزن بودند. قسمت اعظم تنوع ارقام مورد مطالعه از لحاظ تعداد نوارهای پروتئین مربوطه پروتئین‌های سبک بود و از لحاظ پروتئین‌های با وزن مولکولی متوسط و سنگین تنوع کمتری مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های حاصل از تحقیقات آکراوال و همکاران(۱)مطابقت دارد.

با توجه به اینکه نوارهای پروتئین فراوردهٔ نهایی ژن‌ها می‌باشند بنابر این الگویی از ژنوتیپ‌ها را نمایش می‌دهند و این می‌تواند برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به کار می‌رود. در این تحقیق نیز با استفاده از نوارهای پروتئین‌ها تجزیهٔ کلاستر بر اساس ضرایب تطابق ساده با روش UPGMA انجام گردید. با برش دادن دندروگرام در فاصلهٔ ۰/۷۷ واحد، سه کلاستر حاصل گردید.

با توجه به شکل مشخص شد که دیپلوئیدهای دنیای قدیم در یک کلاستر و هریک از الوتتراپلوئیدهای G.hirsutum و G.barbadense در کلاسترهای جداگانه‌ای قرار گرفتند. کلاستر مربوطه به دیپلوئیدهای دنیای قدیم شامل دو زیر مجموعه ارقام دیپلوئید گونه G.herbaceum و ارقام دیپلوئید گونه G. arboretum بود. قرار گرفتن دیپلوئیدهای دنیای قدیم در یک کلاستر حاکی از قرابت ژنتیکی این دو گونه بوده و مشابه بودن منشاء پیدایش ژنوم A، الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه را به عنوان یک روش قوی جهت تشخیص و گره‌بندی ژنوتیپ‌ها تأیید می‌کند.

گونه‌های الوتتراپلوئید هر کدام در کلاسترهای جداگانه‌ای قرار گرفتند. بطوریکه ارقام گیزا-۳۱، تالیا T-1 و پیما-۵۲ از گونه G.barbadense در یک کلاستر و ارقام امپایر-GL ، پاک، ورامین و تاشکند-۱ از گونه G.hirsutum در کلاستر دیگری جای گرفتند.

منابع

1- Agrawal, P.K., D.Sing and M.Dadlani. 1980. Identification of cotton hybrid seed using PAGE. Seed Sci.and Technol. 16:563-569.
2- Dadlani, M., A.Varier, and L.K. Agrawal. 1992. Identification of cotton and pearl millet cultivars using PAGE. In. P.K. Agrawal, and M. Dadlani(eds). Techniques in seed science and technology. South Asian Pub.
3- De Prins, H.C. and L.Van De Weghe. 1983. Ryegrass cultivar identification using electrofocusing on polyacrylamide gels. Seed Sci. and Technol., 11: 257-266.
4- Hawcroft, D.M. 1997. Electrophoresis. Oxford university press.

5- Kapse, S.S. and Y.S. Nerkar. 1985. Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble in relation to cultivar identification in cotton.Seed Sci. and Technol., 13: 847-852.
6- Kohel,R.J. and C.F. Lewis. 1984. Cotton. Monogr.24.ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI. U.S.A.
7- Koarev, V.G., I.P. Gavrilijuk, and N.k.Gubareva. 1987. Storage proteins in the identification of species, cultivars and lines seed Sci.and Technol., 15: 675-678.
8- Wendel, J.F., C.L. Brubaker, and A.E. Percival. 1992. Genetic diversity in Gossypium hirsutum and the origin of upland cotton. Amer. J.Bot. 79(11):1291-1310.