

بررسی الگوهای الکتروفورزی پروتئین و ایزوزیم ارقام سویا

علی اکبر شاه نجات بوشهری، سیروس عبدالمیشانی، بهمن یزدی صمدی و
بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی

به ترتیب دانشجوی سابق دوره دکتری، اساتید و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات
دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۹/۱۷

خلاصه

همگام با تهیه صدها رقم سویا، نیاز به تعیین ویژگیهای دقیق هر رقم اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. به همین منظور، ۲۱ رقم سویا *Glycine max* L. با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره و ایزوزیم بذر مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این بررسی الگوهای نواری پروتئین کل بذر با وزن مولکولی بالا مطالعه شد. همچنین از الکتروفورز ژل نشاسته برای مطالعه دو سیستم آنزیمی استراز و گلو تامات اکسالات ترانس آمیناز استفاده گردید. ضمن اینکه زیموگرام‌ها منومورف بود، الگوی نواری پروتئین ذخیره بذر ارقام را به چهار گروه مشخص تقسیم‌بندی کرد. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که بکارگیری مکانیسم‌های متعدد در بررسی‌ها، درک بهتری را از ارتباط ژنومی ژنوتیپ‌ها در اختیار قرار می‌دهد و الکتروفورز پروتئین ذخیره بذر ابزار مناسب‌تری برای طبقه‌بندی نسبت به مطالعه دو آنزیم فوق می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین‌های بذر، ارقام سویا، ایزوزیم

مقدمه

جدیدی نیست. لارسن و کالدول (۱۵)، ایده تنوع پروتئینی مخصوص هر وارسته را پیشنهاد کردند. باتری و بازل (۱)، ارقام سویا را بر حسب فعالیت آنزیمی پراکسیداز در پوسته بذر به دو گروه تقسیم کردند. باتری و بازل (۲)، همچنین گزارش کردند که ارقام سویا حاوی یکی از دو الیزوم آوره آز می‌باشند که در میزان مهاجرت تفاوت دارند. کلارک و همکاران (۳)، توزیع تنوع مواد بازدارنده تریسین را در ارقام تجاری سویا مطالعه کردند. مک کی (۱۶)، موضوع شناسایی ارقام را با استفاده از فنون الکتروفورزی بررسی نمود. کیانگ و گورمن (۱۱)، وضعیت موجود تحقیقات در زمینه ایزوزیم‌های سویا را مطالعه کرده و کاربرد تجزیه و تحلیل ایزوزیمی را در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی ارزیابی کردند. سینگ و همکاران (۱۸)، رابطه ژنومی در بین گونه‌های دیپلوئید سویا را بر اساس

از آنجا که پروتئین‌ها فرآورده‌های ژنتیکی فعال و با ثبات هستند، با توجه به زیست‌شناسی و طرز تولید مثل در گیاهان انتظار می‌رود که هر رقم با ژنوتیپ منحصر به فرد خود از نظر یک و یا تعداد بیشتری پروتئین با بقیه فرق داشته باشد. ژنوتیپ‌هایی که پروتئین‌های آنها از نظر بار خالص، وزن مولکولی و یا فعالیت آنزیمی با یکدیگر تفاوت دارند، از طریق الکتروفورز از هم قابل تمایز هستند. در بذر سویا (۱۵) برخی از تنوعات الکتروفورزی آنزیمی یا پروتئینی به سادگی به ارث می‌رسند و تحت تاثیر شرایط رشدی و مقدار بذر واقع نمی‌شوند. بنابراین الگوی الکتروفورزی بدست آمده از یک رقم تصویر با ثباتی از آن رقم ارائه می‌دهد. بکارگیری فنون الکتروفورزی برای شناسایی ارقام سویا، ایده

نمونه: ۳ بافر در درون چاهکهای چینی مخصوص بر روی ظرف بیخ به منظور تهیه عصاره آنزیمی کوبیده شد.

بافر استخراج شامل ۲/۴۲ گرم تریس، ۶/۸ گرم ساکارز، ۱/۲ گرم PEG^{۲۰} و ۰/۰۷ گرم EDTA^{۲۱} در ۲۰۰ میلی لیتر بوده و pH آن توسط کلریدریک اسید بر روی ۷/۵ تنظیم شد. هنگام استفاده ۱۰ میلی لیتر از این بافر به همراه ۶۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول^{۲۲} استفاده شد (۱۹).

عصاره حاصل از نمونه‌های کوبیده شده به کاغذهای واتمن شماره ۳ به ابعاد ۵×۱۵ میلی متر آغشته و در یک ژل نشاسته در فاصله ۳ سانتی متری انتهای کاندی چیده شد. الکتروفورز با تغییر جزئی و به روش کاهلر و همکاران (۱۰)، صورت گرفت و برای هر آنزیم از سیستم ژلی تریس - سیتریک اسید^{۲۳} استفاده شد. ژل ۱۱/۵ درصد با نشاسته هیدرولیز شده سیبزمینی از شرکت زیگما تهیه گردید. ابعاد ژل ۲۲/۵×۱۴/۵ سانتی متر بود. بافر ژل و الکتروود نیز به روش کاهلر و همکاران (۱۰)، آماده شد با این تفاوت که pH بافر ژل بر روی ۷/۸ و بافر الکتروود بر روی ۸/۳ تنظیم شد. الکتروفورز ژل به همراه کاغذهای آغشته به عصاره با ولتاژ ۲۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سپس کاغذهای مذکور حذف و مجدداً الکتروفورز با ولتاژ ۲۰۰ ولت و تارسیدن خط نشانه به ۳ سانتی متری انتهای ژل ادامه یافت.

رنگ آمیزی ژل برای سیستم آنزیمی استراز بر مبنای روش کاهلر و آلارد (۹)، بصورت زیر انجام شد. به ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (۵۰ میلی لیتر محلول ۰/۲ مولار Na₂HPO₄، ۱۰ میلی لیتر محلول ۰/۲ مولار Na₂HPO₄ و ۴۰ میلی لیتر آب مقطر)، ۵۰ میلی گرم نمک فست بلو RR^{۲۴} اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میلی گرم آلفا نفتیل استات^{۲۵} و ۵۰ میلی گرم بتا نفتیل استات^{۲۶} به ترتیب در ۱ میلی لیتر و نیم میلی لیتر استون خالص حل و به محلول قبلی اضافه شد. محلول نهایی ذکر شده به ژل اضافه و به مدت ۳-۲/۵ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس با اتانول ۵۰٪ تثبیت گردید.

الکتروفورز پروتئین بندر مورد مطالعه قرار دادند. ونگ و همکاران (۲۰)، دو نوع بازدارنده تریسینی جدید را از طریق الکتروفورز گزارش کردند. کوک و همکاران (۴)، از طریق تجزیه و تحلیل تظاهر ایزوزیم‌های ردوکتاز آهن^۱ در الکتروفورز ژل پلی اکریلامید، وجود رابطه در چندین پروتئین قابل تشخیص الکتروفورزی را با فعالیت ردوکتاز تایید کردند. گورمن و کیانک (۷)، با بررسی امکان استفاده از الکتروفورز در شناسایی ارقام به این نتیجه رسیدند که می‌توان از تنوعات الکتروفورزی به منظور کمک به رفع مشکل شناسایی ارقام استفاده کرد. کادلک و لئال (۸)، به مفید بودن چندین سیستم آنزیمی در شناسایی ارقام سویا اشاره کردند. کیتامورا (۱۲)، تغییر ترکیب پروتئین را با استفاده از ژن‌های جهش یافته مسئول زیر واحدهای پروتئین ذخیره و حذف خصوصیات نامطلوب را با بکارگیری جهش یافته‌های لیپوکسیژناز^۲ مورد بررسی قرار داد. هدف از مطالعه حاضر، دستیابی به اطلاعات بیشتر در خصوص نزدیکی برخی ارقام موجود در کشور به یکدیگر و گروه‌بندی آنها بر اساس الگوهای خاص نواری هر رقم از طریق ایزوزیم و الکتروفورز پروتئینی کل بندر بود.

مواد و روشها

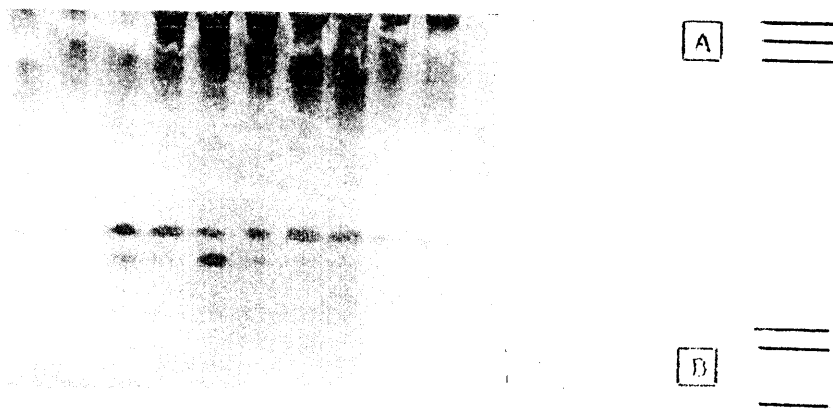
ایزوزیم: در این تحقیق از الکتروفورز ژل نشاسته برای مطالعه دو سیستم آنزیمی استراز^۳ و گلو تامات اکسالات ترانس آمیناز^۴ استفاده شد. بذور ۲۱ رقم زراعی (استیل^۵، هارکور^۶، کلارک^۷، هاییت^۸، هیل^۹، سنچری^{۱۰}، ۸۴^۱، سمس^{۱۱}، بلاک هاک^{۱۲}، بونوس^{۱۳}، گرگان^۳، هک^{۱۴}، سحر، زان^{۱۵}، کلمبوس^{۱۶}، فار^{۱۷}، SRF450، SRF450 جهش یافته، ویلیامز^{۱۸}، ویلیامز جهش یافته و یونیون^{۱۹}) برای این تحقیق استفاده شد. بذرها به مدت ۴۸ ساعت در درون ظروف پتری حاوی کاغذ صافی در تاریکی و در دمای اتاق جوانه زدند. از قطعه کوچکی لپه در طرف مقابل ساقه چه (پلومول) به عنوان نمونه استفاده گردید که پس از افزودن بافر عصاره گیری به نسبت ۱

1 - Iron reductase isozymes	2 - Lipoxygenase	3 - Esterase	4 - Glutamate oxalate transaminase
5 - Steel	6 - Harcor	7 - Clark	8 - Habbit
9 - Hill	10- Century 84	11- Semes	
12- Black Hawck	13- Bonus	14- Hack	15- Zane
16 - Colombus	17- Faur		
18- Williams	19- Union	20- Polyethyleneglycole	21- Ethylendiamine tetra acetic acid
22- Merchптоethanole			
23- Tris-citric acid	24- Fast blue RR salt	25- Alpha-naphthyl acetate	26 - Beta-naphthyl acetate

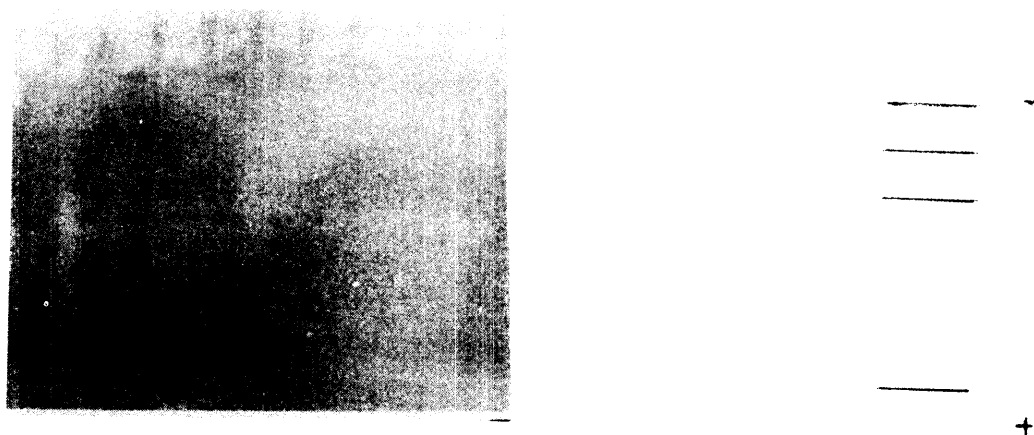
(۱۴)، صورت گرفت. بذرها پس از حذف پوسته، آرد و در بافر استخراج کننده (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. ترکیبات مورد استفاده عبارت بودند از: بافر استخراج [حاوی بافر با $pH=6/8$: ۳۷/۵ میلی‌لیتر (۵/۶۰ گرم تریس/اسید کلریدریک ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، سدیم دودسیل سولفات^۵: ۱۲ گرم، کوماسی بلو آر^۶ ۲۵۰: ۵۰ میلی‌گرم و گلیسرول^۷: ۶۰ میلی‌لیتر و آب مقطر: ۷۲/۳ میلی‌لیتر]، بافر الکتروود [شامل گلیسین^۸ ۱/۴۴ درصد، تریس ۰/۳ درصد و سدیم دودسیل سولفات ۰/۱ درصد]، محلول رنگی [شامل تری کلریک استیک اسید^۹ ۶ درصد، استیک اسید خالص ۸/۷۵ درصد، کوماسی بلو آر ۲۵۰، ۰/۰۴ درصد و متانول ۲۵ درصد] و محلول رنگ بر

رنگ آمیزی ژل برای سیستم آنزیمی گلوتامات اکسالات ترانس آمیناز به روش کاهلر و همکاران (۱۰)، صورت گرفت. مواد مورد لزوم در سه بشر تهیه شد. بشر اول شامل ۵ میلی‌گرم پیریدوکسال^۱ و ۵ فسفات^۱ و ۰/۱۵ گرم نمک فست بلو BB^۲، بشر دوم حاوی ۰/۱۵ گرم آسپارتیک اسید^۳ و ۰/۱ گرم آلفا کتوگلو تاریک اسید^۴ و بشر سوم حاوی ۱۰ میلی‌لیتر تریس ۱ مولار و ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. محتویات سه بشر با هم مخلوط و برای رنگ آمیزی ژل به کار رفت. پس از مدت ۲ ساعت، ثابت کردن با اتانول ۵۰٪ انجام شد.

پروتئین: برای بررسی الگوی نواری پروتئینی از همان ۲۱ رقم زراعی ذکر شده استفاده شد و استخراج به روش تغییر یافته لاملی

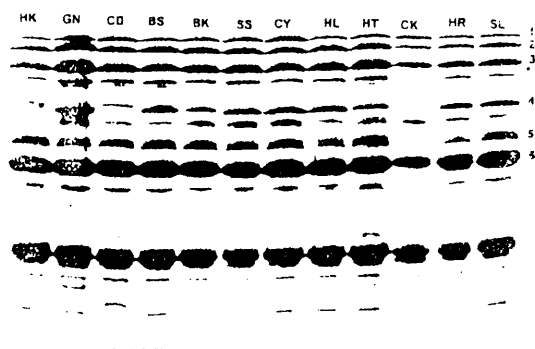


شکل ۱ - الگوی نواری عمومی حاصل از الکتروفورز افقی نشاسته در سیستم آنزیمی استراز

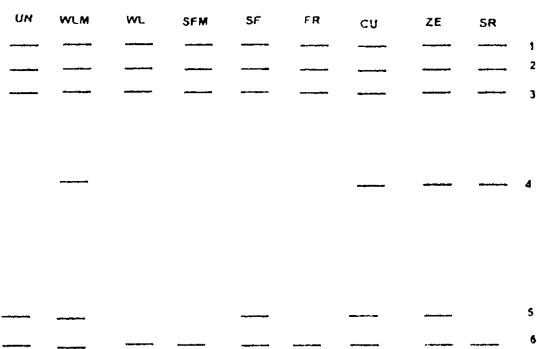


شکل ۲ - الگوی نواری عمومی حاصل از الکتروفورز افقی نشاسته در سیستم آنزیمی گلوتامات اکسالات ترانس آمیناز

- | | | | |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------------|
| 1 - Pyridoxal 5' phosphate | 2 - Fast blue BB salt | 3 - Aspartic acid | 4 - Alpha-ketoglutaric acid |
| 5 - Sodium dodecyl sulfate | 6 - Commassie blue | 7- Glycerol | 8 - Glycine |
| | | | 9- Trichloric acetic acid |



شکل ۳ - الگوی نواری پروتئین کل بذر ارقام سویا: SL: استیل، HR: هارکور، CK: کلارک، HT: هاییت، HL: هیل، CY: سنچری، SS: سمس، BK: بلاک‌هاک، BS: بیونوس، CD: کالاند، GN: گرگان ۳ و HK: هک



شکل ۴ - الگوی نواری پروتئین کل بذر ارقام سویا، SR: سحر، ZE: زان، CU: کلمبوس، FR: فار، SF: SRF450، SEM: SRF450 جهش یافته، WL: ولبامز، WLM: ولبامز جهش یافته و UN: یونیون

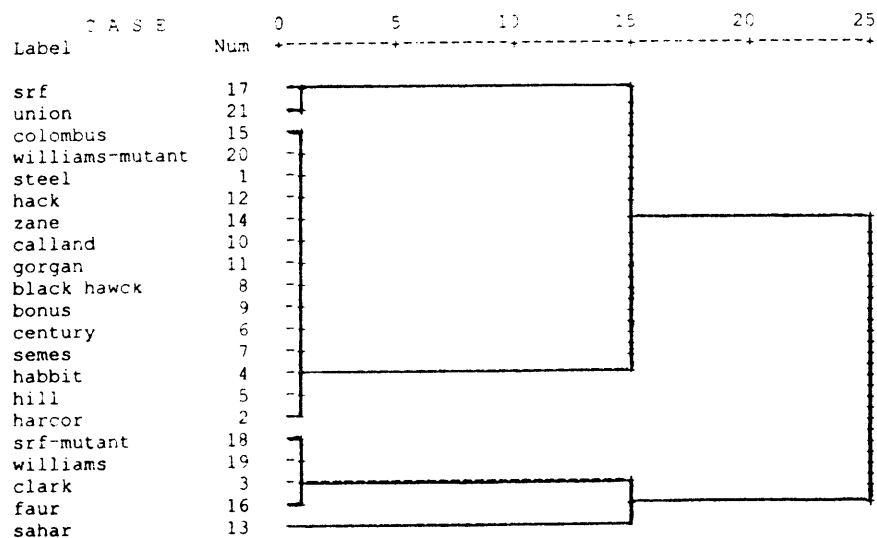
مبنای ژنتیکی تنوع ایزوزیم‌ها و پروتئین‌های ذخیره یکی از دلایل گسترده‌گی کاربرد این روشها برای توصیف جوامع است. اگرچه توصیف و شناسایی جوامع بر مبنای تفاوت‌های فنوتیپی الگوهای نواری الکتروفورز انجام می‌شود ولی این الگوها را می‌توان بر حسب مکانهای ژنی و آلل‌ها تشریح کرد. چون استفاده از فنوتیپ برای تشخیص و مقایسه، کارایی بالایی در تعیین تفاوت‌های ژنتیکی ندارد بنابراین موقعیکه برآورد تنوع ژنتیکی جوامع مدنظر است ایزوزیم‌ها نشانگرهای ژنتیکی مناسبی می‌باشند. از آنجائی که همه تنوع موجود در DNA در سطح پروتئین‌ها قابل تشخیص نیستند، از طرفی نیز

[شامل تری کلریک استیک اسید ۱۰ درصد]. الکتروفورز با جریان ثابت ۴۵ میلی‌آمپر (ابعاد ژل ۱۶×۲۰ سانتی متر) و تارسیدن نشان‌رنگی با پائین ژل ادامه یافت. پس از حذف ژل بالایی، رنگ آمیزی در طول شب انجام و سپس ژل در محلول رنگ بر قرار گرفت.

نتایج و بحث

مطابق با گزارشهای فرر - مانگ (۵)، و فوترل (۶)، دو گروه استراز E_۱ و E_۲ در لپه‌های ارقام سویا مشاهده گشت (شکل ۱). E_۱ تولید ۳ نوار آندی با آلفا و بتا نفتیل استات کرد و E_۲ که فقط روی بتا نفتیل استات عمل می‌کند نیز ۳ نوار کاتدی بروز داد. نوارهای ناحیه A از وضوح خوبی برخوردار نبودند. در صورتی که نوارهای ناحیه B در تکرارهای مختلف واضح بودند. در مورد Got (شکل ۲) نیز دو گروه Got_۱ و Got_۲ مشاهده گردید. ایزوزیم Got_۲ از Got_۱ واضح تر بود. تعداد نوارهای Got_۱ سه و در Got_۲ فقط یک عدد بود. با بررسی الگوهای نواری ارقام مورد آزمایش هیچیک از دو سیستم آنزیمی به کار گرفته شده نتوانست پلی مورفیسم قابل رویتی آشکار کند و در هر دو سیستم ارقام الگوهای نواری مشابهی بروز دادند.

در بررسی الگوهای نواری پروتئین کل بذر فقط نوارهای حاوی وزن مولکولی بالا و کاملاً بارز مورد استفاده قرار گرفت (شکل‌های ۳ و ۴). از مجموع ۶ نوار مورد مطالعه قرار گرفته نوارهای اول، دوم، سوم و ششم پلی مورفیسم چندانی نداشتند. از نظر نوارهای چهارم و پنجم، ارقام کلارک، فار، SRF جهش یافته ولبامز فاقد هر دو نوار چهارم و پنجم بودند. ارقام SRF و یونیون فقط نوار پنجم را دارا بوده و فاقد نوار چهارم بودند. رقم سحر فقط نوار پنجم را نداشت. بنابراین الگوهای نواری پروتئین، ارقام را در چهار گروه متمایز قرار داد (شکل ۵). با اینکه در این آزمایش، فقط حضور و یا عدم نوارها مورد بررسی قرار گرفت با این حال بخاطر وجود تفاوت قابل ملاحظه در شدت رنگ نوارها استفاده از دانسیتومتری هنوز تنوع بیشتری را در معرض نمایش می‌گذارد. همچنین در ادامه مطالعات و با استفاده از ژل‌های شیدار و یا استخراج پروتئین‌های خاص انتظار می‌رود که بتوان به تنوع بیشتری دست یافت.



شکل ۵ - دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه ای بر مبنای ضرایب تطابق ساده (Simple matching coefficient) و روش خوشه بندی UPGMA برای ارقام سویا.

که معمولاً بیشتر از آن چیزی است که از طریق یک الگوی ایزوزیم به دست می آید. لذا الکتروفورز ژل پلی اکریلامید پروتئین های ذخیره را می توان به عنوان قویترین سیستم شناسایی ارقام مشابه به شمار آورد (۱۷).

در مجموع می توان چنین نتیجه گیری کرد که بکارگیری مکانیسم های متعدد در بررسی پلی مورفیسم درک بهتری را از ارتباط ژنومی ژنوتیپ ها در اختیار قرار می دهد. همچنین الکتروفورز پروتئین بذر طبق بررسیها روش بسیار مطمئنی است (۱۳) و تصویر دقیق تری را از وضعیت ژنومها در اختیار قرار می دهد.

تغییرات انجام شده در آمینواسیدهایی که در بار خالص الکتریکی پروتئین تغییری ایجاد نمی کنند نمود ایزوزیمی ندارند، به علاوه فقط یک دسته از ژن های ساختمانی دستور ساخت پروتئین ها را می دهند و این دسته ممکن است بیانگر وضعیت کلی ژنوم نباشد، بنابراین لازم است تعداد ژنوتیپ های مورد بررسی قابل ملاحظه و حتی الامکان از سیستم های آنزیمی بیشتری استفاده گردد تا بدینوسیله امکان دسترسی به پلی مورفیسم محتمل تر باشد.

مطالعات الکتروفورزی جوامع مختلف بر اساس پروتئین های غیر آنزیمی و عمدتاً پروتئین های ذخیره بذر است. اکثر روشهای الکتروفورزی تولید تعداد زیادی نوار مشخص بر روی ژلها می کند

REFERENCES

1. Buttery, B.R., and R.I. Buzzel. 1968. Peroxidase and activity in seeds of soybean varieties. *Crop Sci.* 8: 722-725.
2. Buttery B.R., and R.I. Buzzle. 1971. Properties and inheritance of urease isoenzymes in soybean seeds. *Can. J. Bot.* 49: 1101-1105.
3. Clark, R.W., D.W.Mies, and T.Hymowitz. 1970. Distribution of a trypsin inhibitor variant in seed proteins of soybean varieties. *Crop Sci.* 10:486-487.
4. Cook, K.A., V.D. Jolley, D.J.Fairbanks, and L.R. Robinson. 1996. Identification of iron reductase isozymes in soybeans. *Journal of Plant Nutrition.* 19(2): 457-467.

5. Ferrer - Monge, J.A. 1974. Esterase isozyme pattern in *Glycine max* L. exposed to gamma radiation. *Can. J. Bot.* 52:273.
6. Fottrell, P.F. 1968. Esterase isozymes from legume root nodules. *Phytochem.* 7: 23-29.
7. Gorman, M.B. and Y.T. Kiang. 1977. Variety - specific electrophoresis variants of four soybean enzymes. *Crop Sci.*17:963-965.
8. Kadlec, M., and J. Letal. 1996. Identification of soybean cultivars through isozymes. *Soybean Genetic Newsletter* 23: 89-91.
9. Kahler, A.L., and R.W. Allard. 1970. Genetics of isozyme variants in barley.I.Esterases. *Crop Sci.* 10:444-448.
10. Kahler, A.L., S. Heath, and R.W. Allard. 1981. Genetics of isozyme variants in barley II. 6-Phosphogluconate dehydrogenase, glutamate oxalate transaminase and acid phosphatase. *Crop Sci.* 21:536-540.
11. Kiang, Y.T., and M.B. Gorman. 1983. Soybeans in: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds). *Isozymes in plant genetic and breeding, Part B.* Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam. pp.295 - 328.
12. Kitamura, K. 1997. Genetic improvement of nutritional and food processing quality in soybean. In: Napmpeth, B.(eds.) *Proceeding. World soybean research conference V.* Kasetsart University Press. PP. 441-446.
13. Ladizinsky G., and T. Hymowitz. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theor Appl. Genet.* 54: 145-157.
14. Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
15. Larsen, A.L., and B.E. Caldwell. 1968. Inheritance of certain proteins in soybean seed. *Crop Sci.* 8: 474-476.
16. Mc Kee, G.W. 1973. Chemical and biochemical techniques for varietal identification. *Seed Sci. Technol.* 1:151-199.
17. Nielsen, G., and H.B. Johansen. 1986. Proposal for the identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordein and 39 isozyme loci of 47 reference varieties. *Euphytica* 35: 717-728.
18. Sing, R.J., K.P. Kollipara, and T.Hymowitz. 1992. Genomic relationships among diploid wild prennial species of the genus *Glycine* Wild subgenus *Glycine* revealed by crossability, meiotic chromosome pairing and seed protein electrophoresis. *Theor appl. Genet.* 58:276-282.
19. Soltis,D.E.,P.S.1989. *Isozymes in plant biology.* Dioscorides Press. Oregon.USA.
20. Wang, K., N. Kaizuma, Y. Takahata, and S. Hatakeyama. 1996. Detection of two new variants of soybean Kunitz trypsin inhibitor through electrophoresis. *Breeding Science.* 46(1):39-44.

Variety - Specific Electrophoretic Profiles of Soybean Cultivars

**A. A. SHAHNEJAT-BUSHEHRI, C. ABD-MISHANI,
B. YAZDI-SAMADI AND B. E. SAYED-TABATABAEI**

**Former Ph.D Student, Professor and Assistant Professor Faculty of
Agriculture, University of Tehran**

Accepted June, 7 2000

SUMMARY

With the development of hundreds of commercial soybean varieties, a need for additional variety - specific identifying characteristics has been arisen. For this purpose, twenty - one soybean (*Glycine max* L.) varieties were electrophoretically evaluated using polyacrylamide gel and starch gel electrophoresis. Soybean seeds were analyzed for the banding pattern of seed storage proteins and two enzymatic systems (Esterase and Glutamate Oxalate Transaminase). In this study zymograms were monomorphic but banding patterns of seed storage proteins, classified cultivars into 4 distinct groups. Therefore, seed storage protein electrophoresis is a more powerful tool to characterize soybean cultivars, compared to isozyme patterns.

Key words: Seed storage protein, Soybean varietal identification and Isozyme