Archive of SID

Studying of oil and protein in native Salicornioideae sub-family in Iran according to produce Industrial and food products.

(**Mohammadi, ali**[١]**; heidarian, zohre**[٢] , habibzade alireza[٣], polkhani roya [٤] , raeisi shiva [٥], baratshooshtari ali[٦] , mohammad baratshooshtari[٧]*

١- Msc-plant Biotechnology. Biotechnology Research Center-Institute for Science and New Technologies.

٢- Agronomy department, Plant Biotiechnology, Faculty of Agriculture, University of Shiraz. PhD., Assistant Prof of Dept. Of Crop Production and Plant Breeding.

٣- Msc-plant Biotechnology. Biotechnology Research Center-Institute for Science and New Technologies.

٤- Msc-weed science . University of Shiraz

٥- Msc genetics. University of shahrekord.

٦- Microbiology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord

٧-Msc - plant breeding. Biotechnology Research Center-Institute for Science and New Technologies

e-mail: behzadshoshtary@gmail.com

Abstract

Plants in Amaranthaceae family are significant in different aspects such as industrial, food, medicinal and fodder. Some countries try to establishment of experimental farms in order to grow this plant and remarkable success have gained in the field of industrial and edible oil seeds and other products. This family is salinity resistance. In this study, according to diversity and the high distribution of this family in Iran plant flora try to evaluate amount of oil and protein in different genus at the national level. In this study, the amount of oil was obtaind by Suklse method and amount of protein by Kjldal and Bradford method. Collected samples contain Salicornioideae sub-family and different genus from this family. Totally, there are ٢٠ samples. Results come from protein dendrogram showed that Azerbaijan samples in terms of protein have the high similarity with European samples but, finally genus H. Strobiaceum had the highest amount of proten, and collected genus S. Iranica from Sharafkhany region of Azerbaijan and Persian Maharlou had the highest amount of oil and protein.

Key words: *Amaranthaceaefamily, amount of oil and amount of protein, Salicornioideae sub-family.*

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی میزان چربی و پروتئین برخی از مهمترین زیرخانواده های Salicornioideae بومی ایران به منظور تولید فرآورده های صنعتی و خوراکی

علی محمدی[۱]، زهره حیدریان[۲]، علیرضا حبیب زاده[۳]، رویا پلخانی[٤]، شیوا رئیسی[٥]، علی برات شوشتری[٦]، محمد برات شوشتري[۷*]،

۱- کارشناسي ارشد بيوتكنولوژي گياهي دانشگاه شيراز، مركز تحقيقات بيوتكنولوژي-پژوهشكده علوم و فناوري نوين.
۲- استاديار پژوهشكده بيوتكنولوژی، شيراز دانشكده كشاورزی
۳- كارشناسی ارشد بيوتكنولوژی گياهی دانشگاه تهران، مركز تحقيقات بيوتكنولوژي-پژوهشكده علوم و فناوري نوين.
٤- كارشناسي ارشد علف های هرز دانشگاه شيراز
٥- كارشناسي ارشد ژنتيک دانشگاه شهركرد.
٦- كارشناسي ارشد بيوتكنولوژي گياهي شهركرد، مركز تحقيقات بيوتكنولوژي-پژوهشكده علوم و فناوري نوين.
۷- كارشناس ميكروبيولوژی دانشگاه شهركرد.

پست الكترونيك: behzadshoshtary@Gmail.com تلفن تماس: ۰۹۱۲۳۱٤٦۹۷۰

چکیده

گیاهان موجود در خانواده Amaranthaceae از جنبه های مختلف خوراکی، دارویی، علوفه ای و صنعتی حائز اهمیت می باشند. در برخی از کشور ها اقدام به احداث مزارع آزمایشی برای کاشت این گیاه نموده اند و موفقیت های شایان ذکری در زمینه های دانه های روغنی برای مصارف صنعتی و خوراکی و سایر فرآورده ها به دست آورده اند. این خانواده مقاوم به شوری هستند و آبیاری با آب شور برای آن ها مشکلاتی را در بر نخواهد داشت. در این مطالعه با توجه به تنوع و پراکنش بالای این خانواده در فلور گیاهی ایران اقدام به بررسی میزان روغن و پروتئین جنس های مختلف جمع آوری شده در سطح کشور شده است. در این تحقیق میزان چربی نمونه ها با استفاده از روش موکلسله، میزان پروتئین با روش کجلدال و برادفورد به دست آمد. نمونه های جمع آوری شده شامل زیرخانواده Salicornioideae و جنس های متفاوت از این زیرخانواده بودند که در مجموع شامل ۲۰ نمونه می باشند. نتایج حاصله از دندوگرام پروتئینی نشان می دهد که نمونه های آذربایجان از نظر میزان پروتئین شباهت زیادی با نمونه های اروپایی دارد ولی در نهایت از نظر میزان پروتئین جنس H. Strobiaceum نسبت به بقیه نمونه ها دارای بالاترین میزان پروتئین و جنس S. Iranica جمع آوری شده از منطقه شرفخانی آذربایجان و مهارلوی فارس بیشترین میزان چربی و پروتئین را داشتند.

کلمات کلیدی: خانواده *Amaranthaceae*، زیرخانواده *Salicornioideae*، میزان چربی، میزان پروتئین.

مقدمه:

www.SID.ir

Archive of SID

مساحت زيادي از زمينهاي كشور ايران شور و نيمه شور است كه از نظر كشاورزي يا كاملاً غير قابل استفاده بوده و يا بهره وري نسبتاً كمي دارند. با توجه به رشد بالاي جمعيت كشور، افزايش ۲/۵ ميليون نفري در هر سال، نياز به افزايش بهره وري از زمين هاي موجود كه حاصلخيز بوده ولي به علت شوري كم ثمر هستند، كاملاً احساس ميشود (ابطحي ۱۳۷۱). بهترين راه براي رسيدن به اين هدف استفاده از گياهاني مقاوم به شوري است كه از لحاظ اقتصادي نيز توجيه پذير بوده و قابليت جايگزيني ساير محصولات كشاورزي را از لحاظ ميزان توليد محصول و كاربري داشته باشند(ابطحي ۱۳۷۱و Glenn et al,. ۱۹۹۱, ۱۹۹۸). به عنوان مثال استان فارس در مجموع ۳ ميليون و ۲۰۰ هزار هكتار زمين كشاورزی داشته كه درپی خشكسالی و كاهش بارندگی ها ، اكنون بسياری از دشت های حاصلخيز آن ، خشک و بی محصول شده و فقط يک ميليون هكتار آن قابل كشت است . خشكسالی و درپی آن برداشت های بی رويه از آب سفره های زيرزمينی و حفر چاه های غيرمجاز در فارس منجر به افت ۸۵ درصدی ذخائر آب های زيرزمينی و در نتيجه پيشروی آب های شور شده كه براثر آن هر روز بخشی از اراضی مستعد كشاورزی اين استان از زيركشت خارج شده و يا توليد محصول در اين اراضی به كمتر از نصف در واحد سطح كاهش می يابد (حيدريان و همكاران، ۱۳۸۰). گياهان نمك دوستي كه هم قادر به استفاده از منابع آب غير شيرين بوده وهم ازلحاظ اقصادي بتوانند جايگزين محصولات كشاورزي كه تنها با آب شيرين قابل آبياري هستند گردند می تواند راهكاری بر اين مشكل روز افزون كشور باشد. گياهان شور پسند علاوه بر مصارف خوراكي قابليت ا ستفاده در زمينه تعليف دام را نيز با توجه به كمبود زمينهاي مرتعي مناسب دارند. طراحي و فضا سازي چشم اندازي سبز در قسمتهاي ساحلي درياچه هاي شور ودرياها به كمك اين گروه از گياهان، علاوه بر جلوگيري از فرسايش خاك و تاثير بر طراوت هواي آن مناطق، مي تواند گسترش صنعت توريزم را به همراه داشته باشد

يكي از گياهان شور پسند (هالوفيت) كه محققين را در جهت تامين اهداف بالا قادر مي‌سازد گياه ساليكورنيا مي باشد. گونه بيگلوي اين گياه با توليد دانه هايي حاوي ۴۰ درصد روغن و ۴۵ درصد پروتيين (Chinnusamy *et al*,. ۲۰۰۵ ؛ Freas and Murphy, ۱۹۹۱) و قابليت تحمل شوري بالا M/M۳۶۰۰ (Glenn *et al*,. ۱۹۹۱, Ayala ۱۹۹۶) ، مي‌تواند به عنوان گياهي صنعتي در مناطق شور و سواحل دريا ودرياچه ها مورد استفاده قرار گيرد. ازآنجا كه ميزان روغني و پروتييني گياه بر اساس گونه ومناطق متفاوت رويشي تغير مي كند، بررسي دقيق خصوصيات هر گونه وميزان روغن و پروتيين در گونه هاي مختلف از اقليم هاي متفاوت به منظور يافتن گونه مناسب لازم به نظر مي رسد (Jeffries et al,. ۱۹۸۱, Devinnan۱۹۹۹). رويشگاههاي اين گياه در ايران شامل استانهاي فارس، سمنان، گرگان، خوزستان، بوشهر، هرمزگان، يزد، آذربايجان غربي، آذربايجان شرقي، اصفهان، قم و تهران مي باشد (حيدريان و همكاران ۱۳۸۰, Akani et al,. ۲۰۰۸). در اين تحقيق هدف بر تعيين ميزان پروتيين و چربی گونه های جمع آوری شده و بررسی تنوع پروتيينی داخل گونه ای با استفاده از روش SDS Page می باشد.

مواد و روش ها:

تهيه نمونه گياهی: نمونه های گياهی از سر تا سر ايران طبق پراكنش نشان داده شده در شكل ۱ جمع آوری شد.

الكتروفرز پروتئين:

پروتئين ها از نظر حساسيت به قدرت يونی، يونهای خاص و كوفاكتورهای مورد نياز، رفتار بسيار متفاوتی نشان می دهند. بنابراين انتخاب بافر

www.SID.ir

Archive of SID

برای الکتروفورز پروتئین ها و جداسازی آنها از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. جداسازی پروتئین های محلول و غیر محلول با استفاده از SDS-PAGE صورت گرفت. در روش الکتروفورز روی ژلهای صفحه ای پلی آکریل آمید به روش لایملی (Laemmili, ۱۹۷۰) که توسط گاربارینو و همکاران (Garbarino *et al*,. ۱۹۸۸) اصلاح شده است استفاده شد.

استخراج پروتئین

از بافر استخراج با ترکیبات زیر استفاده گردید Tris-HCL ۲۵ mM با PH=۷/۵، KCL ۱۵۰ mM، ۲۰٪ گلیسرول (V/V)، DTT ۱ mM پروتیین بافت برگ با محلول بافر استخراج (Hjelmeland, ۱۹۹۰) (۱:۲)، استخراج شد. پس از آن عصاره ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردیده و سپس محلول بالایی[۱] به عنوان پروتئین محلول جدا شد. پروتئین غیرمحلول از رسوب زیرین به روش ناتو و همکاران (Nato et al,. ۱۹۹۵) جدا گردید. پس از آن رسوب ایجاد شده با بافر استخراج و تریتون یک درصد مخلوط و هم زده شد و یک شب به همان شکل در یخچال نگهداری گردید. پس از آن سانتریفیوژ شده، و محلول شفاف بالایی به عنوان پروتئین غیر محلول جدا گردید. پروتئین های محلول و غیر محلول در فریزر با دمای ۲۰-درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بخشی از این محلول ها جهت سنجش غلظت پروتئین مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش غلظت پروتئین:

برای سنجش غلظت پروتئین از دو روش برادفورد[۲] و کجدال استفاده شد (Bradford, ۱۹۷٦). جهت رسم منحنی استاندارد از سرم البومین گاوی استفاده گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون، سایر محلول های استاندارد را به طور مشابهی رنگی کرده و جذب آنها در ۵۹۵ nM خوانده شد.

تهیه ژل پلی آکریل آمید:

دو نوع ژل زیرین[۳] و بالایی[٤] مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه این دو ژل لازم است محلول پایه آکریل آمید، بافر ژل زیرین و رویی تهیه گردد (عبدیشاهی و همکاران ۱۳۷۷). مقدار ۳۰ میکروگرم پروتئین از هر نمونه محاسبه و در داخل چاهک ها قرار گرفت.

انجام الکتروفورز:

بافر الکترود با ترکیب گلیسین ۱٤٤گرم، تریس ۳/ ۳۰و سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۱۰ گرم تهیه شد.

ولتاژ ثابت برابر با ۱۵۰ ولت برای ژل بالایی و ۲۰۰ ولت برای ژل زیرین یا جریان ثابت برابر ۳۰ میلی آمپر به ازاء هر ژل اعمال شد.

رنگ آمیزی پروتئین ها:

محلول رنگ آمیزی ژل: کوماسی بلو بریلیانت R۲۵۰ ۰/۲۵ گرم، متانول خالص۱۲۵ میلی لیتر، استیک اسید گلاسیال۲۵ میلی لیتر، آب مقطر۱۰۰ میلی لیتر برای ساخت بافر استفاده شد.

رنگ زدایی با ترکیب هم حجم متانول و اسید استیک خالص و آب مقطر انجام شد. رنگ زدایی مدت ٤۸ ساعت در دمای اتاق صورت گرفت. پس از آن ژل ها در داخل آب مقطر نگهداری و سپس از آنها عکسبرداری شد. پس از آن به طریقه دانسیتومتریک آنالیز انجام شد.

نتایج وبحث

---

[۱] Supernatant
[۲] Brad-Ford

[۳] Separating Gel
[٤] Stacking Gel

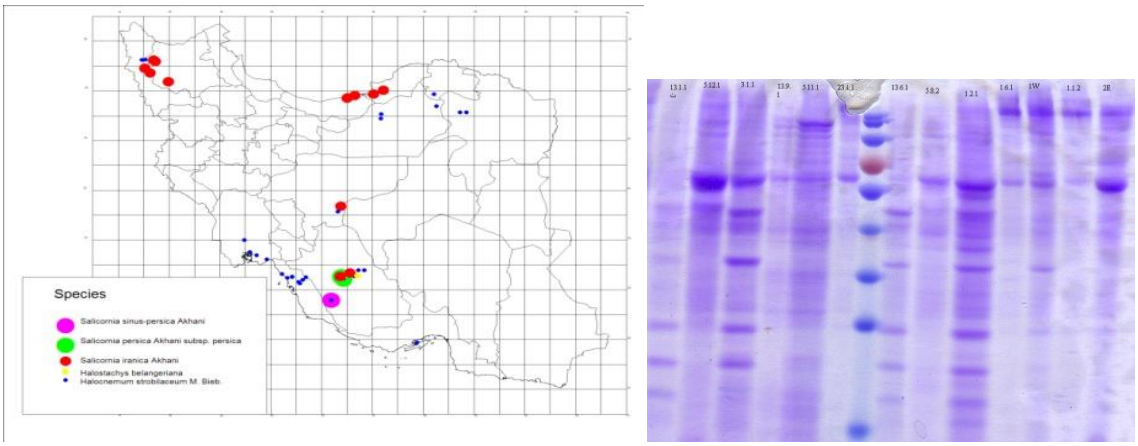
www.SID.ir

Archive of SID

در تشخیص گونه گیاه وجود بذر ضروری بود، نمونه ها در مرحله گلدهی، که بسته به طول و عرض جغرافیایی محل جمع آوری بین اواسط مهر تا اواسط آذر متفاوت بود، جمع آوری گردید. بر اساس طول و عرض جغرافیایی مناطق بازدید شده، شروع فصل جمع آوری در مناطق جنوبی کشور از اواخر مهرماه و ابتدای آبان ماه مناسب تشخیص داده شد.
علاوه بر نمونه های تر، نمونه هرباریومی و نمونه خاک محل رویش گیاه نیز به منظور مطالعات تکمیلی نمونه برداری شد.

۹-٤- الگوی الکتروفورز پروتئین دانه:

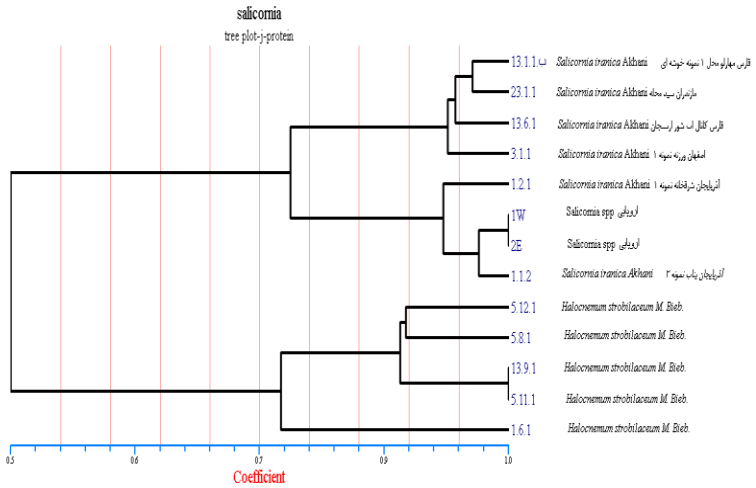
از بذر نمونه ها استخراج پروتئین انجام ، و سپس پروتئین های دینیچر شده بر روی ژل اس دی اس پیج بارگذاری شد و با ولتاژ ۳۰ میلی ولت در مدت ۸ ساعت ران گردید. بعد از رنگ آمیزی، ژل ها اسکن شدند شکل (۱). وجود باند با عدد یک و عدم وجود باندها به صورت صفر در نرم افزار اکسل وارد شد. سپس در برنامه NTSYSpc ۲,۰۲ مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفت. و دندروگرام (شکل ۲) رسم شد. در بررسی تنوع پروتئین های دانه، نمونه های فارس و اصفهان و نمونه های آذربایجان و اروپایی در میزان پروتیین تشابهات زیادینشان دادند. در این دندروگرام ۵,۱۲,۱، ۵,۸,۱، ۱۳,۹,۱، ۵,۱۱,۱ و ۱,٦,۱ از همدیگر جدا گشتند و به نظر می رسد از گونه ی ایرانیکا فاصله گرفته اند.در آنالیز DNA نیز نتایج مشابهی مشاهده گردید. در آزمایش مشابهی که توسط یاپراک و همکاران انجام شد و از نمونه های S.europaea, S. prostrata, S. fragilis, Halocnemum strobilaceum استخراج پروتئین صورت گرفت و بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز بارگذاری شد و سپس با نرم افزار NTSYSpc ۲,۰۲ مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفت (Yaprak et al,. ۲۰۰۷ . Papini et al,. ۲۰۰٤) . این نتایج استفاده از تفاوت پروتیینی را برای بررسی تشابهات قابل قبول می داند.



شکل۱: سمت چپ پراکنش نمونه های جمع آوری شده و سمت راست الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE پروتئین استخراج شده از نمونه ها.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: دندروگرام تجزیه خوشه‌اي پروتئین به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد.

استحصال و اندازه گیری میزان چربی

میزان چربی نمونه ها با استفاده از روش سوکسله و میزان پروتیین با دو روش کجدال و برادفرد اندازه گیری شد.

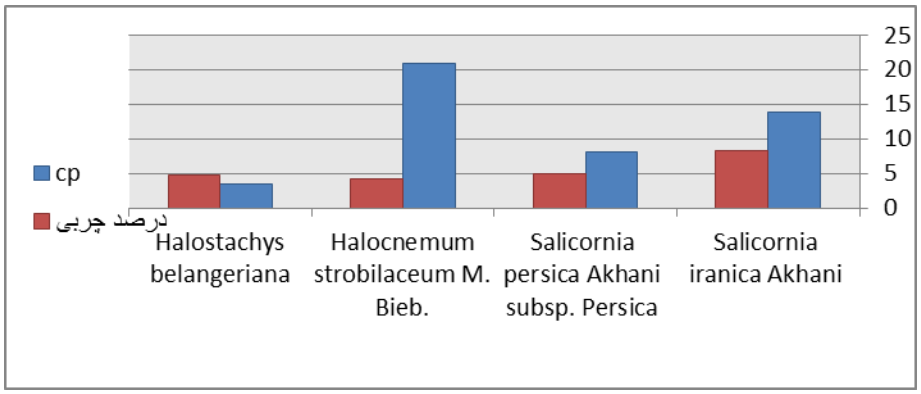
مقایسه بین روش کجدال و برادفرد مشخص کرد که روش کجدال روش مناسب تری برای اندازه گیری پروتیین در دانه های سالیکورنیا می باشد.

مقایسه ی میزان درصد چربی و پروتئین بین جنس های *S. iranica, S. persica* subsp persica, *Halocemum strobiaceum* M. Bieb, *Halostachys belangeriana* نشان داد که میزان پروتئین هالکنموم بیشتر از سایر جنس ها می باشد ولی مجموع چربی و پروتیین در گونه *S. iranica* از سایرین بیشتر است شکل (۳).

نتایج حاصله از دندوگرام های پروتئینی نشان می دهد که نمونه های پروتئینی آذربایجان شباهت زیادی با نمونه های اروپایی دارد، وبین نمونه های اصفهان و شیراز نیز شباهت زیادی وجود دارد.

در بررسی مقادیر اندازه گیری شده ی چربی و پروتئین نمونه های سالیکورنیا، نتایج نشان داد که نمونه های جمع آوری شده از منطقه ی شرفخانی آذربایجان و نمونه ی تکی مهارلو، بیشترین میزان چربی و پروتئین را داشتند(داده ها نمایش داده نشده).

شکل۳: درصد میانگین چربی و پروتئین استخراج شده



www.SID.ir

Archive of SID

منابع:

ابطحی، ع. (۱۳۷۲). حداقل تحمل به شوری در گیاهان، نشریه فنی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز. شماره ۱۶.

حیدریان، ز. (۱۳۸۰). جمع آوری و تعیین تنوع ژنتیکی گیاه سالیکورنیا بر اساس مارکر مولکولی رپید. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه شیراز

Akhani, H. (۲۰۰۸). Taxonomic revision of the genus *salicornia* l. (chenopodiaceae) in central and southern iran. *Pakistanian. Journal of Botany.* ٤٠: ١٦٣٥-١٦٥٥.

Ayala C F.(١٩٩٥). Physiology of Salt Toleranse in Salicorniabiglovii Torr, doctoral Thesis

Bradford, M. M. (١٩٧٦). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizaing the principle of protein-dye binding. *Annual Biochemestry.* ٧٢: ٢٤٧-٢٥٤.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J. (٢٠٠٥). Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Science.* ٤٥: ٤٣٧-٤٤٨.

Devinnan.P(١٩٩٩). The futher of the ballona wetlands:Reponses of salicornia virginica to elevated atmospheric CO٢ concentrations. *Sccur confrence* ١١/٢٠/٩٩#١.

www.SID.ir

Archive of SID

Freas, K. E. and Murphy, D. D. (۱۹۹۱). The endangered Bakersfield saltbush. *Fermonita*. ۱۹:۱۵-۱۸.

Garbarino, j. and Dupont, F. M. (۱۹۸۸). NaCl induces a Na+/H+ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiology*. ۸٦: ۲۳۱-۲۳٦.

Glenn, E. P., Brown, J. J. and Oleary, J. (۱۹۹۸). Irrigating crops with sea water. *Scientific Aamerican*. ۲۷۹: ۷٦-۸۱.

Glenn E P , Oleary G W, Watson M C, Thompson T L, Kuchl R D. (۱۹۹۱). Salicornia biglovii Torr.:an oil seed halophyte for sea water irrigation. *Scienc Aamericane.* ۲٥۱:۱۰٦٥-۱۰٦۷.

Hjelmeland, L. M. (۱۹۹۰). Solubilization of native membrane proteins in: M. P. Deutscher (ed.). *Methods in Enzymology*. ۱۸۲: ۲٥۳-۲۸۲.

Jefferies R L, Davy A J, Rudmik T. ۱۹۸۱. Population biology of the salt marsh annual *Salicornia erupeae agg, Journal of ecology.* ٦۹:۱۷-۳۱.

Jeffries, R. L., Davy, A. J. and Rudmik, T. (۱۹۷۹). The growth strategies of coastal halophytes. *Ecological processes in coastsl environments*. ۳۸: ۲٤۳-۲٦۸.

Laemmili, U. K. (۱۹۷۰). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T٤. *Nature*. ۲۲۷: ٦۸۰-٦۸٥.

Nato, A., Mirshahi, A. And Cabalcante, J. M. (۱۹۹٥). Are Arestin-like protins involve in plant signal trasdaction pathway?. *Plant Molecular Cell Biology*. ٥۱۹-٥۲٤.

Papini, A., Trippanera, G. B., Maggiini, F., Filigheddn, R. and Biondi, E. (۲۰۰٤). New insights in *Salicornia* L. and genera (Chenopodiaceae) inferred form DNA sequence data. *Plant Biosystematics*. ۱۳۸: ۲۱٥-۲۲۳.

Yaprak, A. E. and Yardakulol, E. (۲۰۰۷). Seed Protein Variation of *Salicornia* L. Allied Taxa in Turkey. *Pakistanian Journal Biological Science*. ۱۰: ۱۹۳۰- ۱۹۳۳.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir