بررسی الگوهای الکتروفورزی پروتئین و ایزوزیم ارقام سویا

علی‌اکبر شاه نجات بوشهری، سیروس عبدمیشانی، بهمن یزدی صمدی و بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی

به ترتیب دانشجوی سابق دوره دکتری ، اساتید و استادیارگروه 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 اهمیّت ویژه‌ای پیداکرده 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 گلوتامات 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

از آنجا که پروتئین‌ها فرآورده‌های ژنتیکی فعال و با ثبات هستند،با توجه به زیست شناسی و طرز تولیدمثل 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 جدیدی نیست. لارسن و کالدول (۱۵)،ایده تنوع پروتئینی مخصوص هر واریته 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 الوزیم اوره‌آز می‌باشند که در میزان مهاجرت تفاوت دارند. کلارک و همکاران(۳)، توزیع تنوع مواد بازدارنده تریپسین 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

الکتروفورز پروتئین بذر مورد مطالعه قرار دادند. ونگ و همکاران (۲۰)، دو نوع بازدارنده تریپسینی جدید را از طریق الکتروفورز گزارش کردند. کوک و همکاران (۴)،از طریق تجزیه و تحلیل تظاهر ایزوزیم‌های ردوکتاز آهن[1] 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 لتال (۸)،به مفید بودن چندین سیستم آنزیمی در شناسایی ارقام سویا اشاره کردند. کیتامورا(۱۲)،تغییر ترکیب پروتئین را با استفاده از ژن‌های جهش‌یافته مسئول زیر واحدهای پروتئین ذخیره و حذف خصوصیات نامطلوب را با بکارگیری جهش‌یافته‌های لیپوکسیژناز[2] 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 بذر بود.

مواد و روشها

ایزوزیم: در این تحقیق از الکتروفورز ژل نشاسته برای مطالعه دو سیستم آنزیمی استراز[3] و گلوتامات اکسالات ترانس آمیناز[4] استفاده شد. بذور ۲۱ رقم زراعی (استیل[5]، هارکور[6]، کلارک[7]، هابیت[8]، هیل[9]، سنچری ۸۴[10]، سمس[11]، بلاک هاک[12]، بونوس[13]، گرگان۳، هک[14]، سحر، زان[15]، کلمبوس[16]، فار[17]، SRF450، SRF450 جهش‌یافته، ویلیامز[18]، ویلیامز جهش‌یافته و یونیون[19]) 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 ساقه‌چه (پلومول) به عنوان نمونه استفاده گردید که پس از افزودن بافر عصاره‌گیری به نسبت ۱ نمونه: ۳ بافر در درون چاهکهای چینی مخصوص برروی ظرف یخ به منظور تهیه عصاره آنزیمی کوبیده شد.

بافر استخراج شامل ۲/۴۲ گرم تریس، ۶/۸ گرم ساکارز، ۱/۲ گرم PEG[20] و ۰/۰۷ گرم EDTA[21] در ۲۰۰ میلی لیتر بوده و pH آن توسط کلریدریک اسید برروی ۷/۵ تنظیم شد. هنگام استفاده ۱۰ میلی‌لیتر از این بافر به همراه ۶۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول[22] استفاده شد(۱۹).

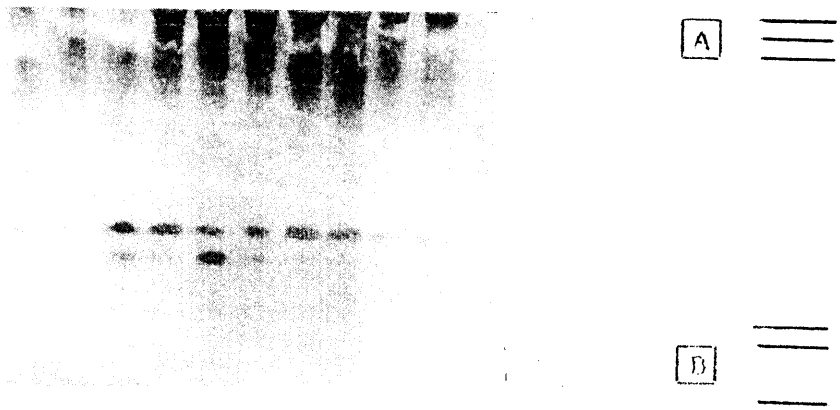
عصاره حاصل از نمونه‌های کوبیده شده به کاغذهای واتمن شماره ۳ به ابعاد ۱۵×۵ میلی‌متر آغشته و در یک ژل نشاسته در فاصله ۳ سانتی‌متری انتهای کاتدی چیده شد. الکتروفورز با تغییر جزئی و به روش کاهلر و همکاران (۱۰)،صورت گرفت و برای هر آنزیم از سیستم ژلی تریس - سیتریک اسید[23] استفاده شد. ژل ۱۱/۵ درصد با نشاسته هیدرولیز شده سیب‌زمینی از شرکت زیگما تهیه گردید.ابعاد ژل ۱۴/۵×۲۲/۵ سانتی متر بود. بافر ژل و الکترود نیز به روش کاهلر و همکاران (۱۰)،آماده شد با این تفاوت که pH بافر ژل برروی ۷/۸ و بافر الکترود برروی 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 تا رسیدن خط نشانه به ۳ سانتی‌متری انتهای ژل ادامه یافت.

رنگ‌آمیزی‌ژل برای سیستم آنزیمی استراز بر مبنای روش کاهلر وآلارد(۹)،بصورت زیرانجام شد.به ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (۵۰ میلی‌لیترمحلول ۰/۲مولار Na_2HPO_2، ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ مولار Na_2HPO_2 و ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، ۵۰ میلی‌گرم نمک فست بلو RR[24] اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میلی‌گرم آلفا نفتیل استات[25] و ۵۰ میلی‌گرم بتا نفتیل استات[26] به ترتیب در ۱ میلی‌لیتر و نیم میلی‌لیتر 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.

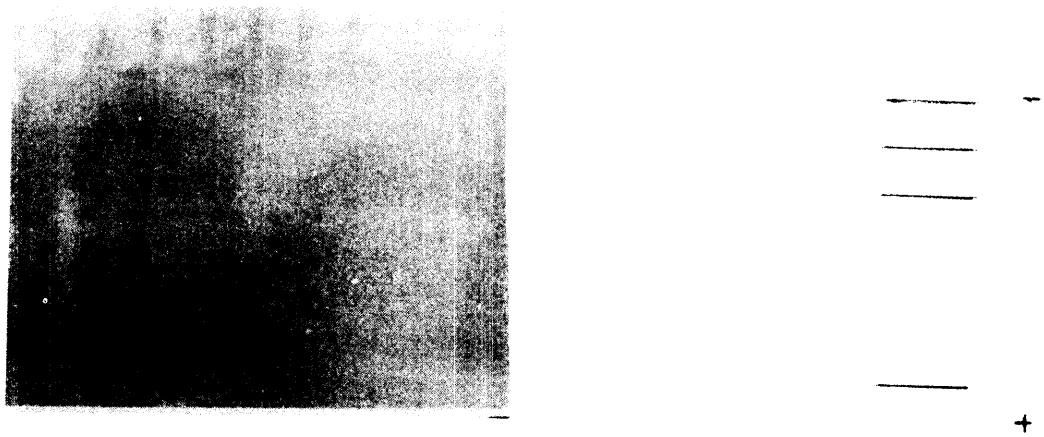
1 - Iron reductase isozymes 2 - Lypoxygenase 3 - Esterase 4 - Glutamate oxalate transaminase
5 - Steel 6 - Harcor 7 - Clark 8 - Habbit 9 - Hill 10- Century 84 11- Semes
12- Black Hawck 13- Bonus 14- Hack 15- Zane 16 - Colombus 17- Faur
18- Williams 19- Union 20- Polyethyleneglycole 21- Ethylendiamine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

رنگ‌آمیزی 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 ′۵ فسفات[1] و ۰/۱۵ گرم نمک فست بلو BB[2]، بشر دوم حاوی ۰/۱۵ گرم آسپارتیک اسید[3] و ۰/۱ گرم آلفا کتوگلوتاریک اسید[4] 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 (۱۴)،صورت گرفت. بذرها پس از حذف پوسته، آرد و در بافر استخراج کننده (۲۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) قرار گرفتند. ترکیبات مورد استفاده عبارت بودند از: بافر استخراج [حاوی بافر با pH=۶/۸ : ۳۷/۵ میلی‌لیتر (۶۰/۵ گرم تریس/اسید کلریدریک ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر)، سدیم دودسیل سولفات[5] : ۱۲ گرم، کوماسی بلوآر[6] ۲۵۰ : ۵۰ میلی گرم و گلیسرول[7]: ۶۰میلی‌لیتر و آب مقطر: ۷۲/۳ میلی‌لیتر]، بافر الکترود [شامل گلیسین[8] ۱/۴۴درصد، تریس ۰/۳ درصد و سدیم دودسیل سولفات ۰/۱ درصد]، محلول رنگی [شامل تری کلریک استیک اسید[9] ۶ درصد، استیک اسید خالص ۸/۷۵ درصد، کوماسی بلوآر ۲۵۰، ۰/۰۴ درصد و متانول ۲۵ درصد] و محلول رنگ بر



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

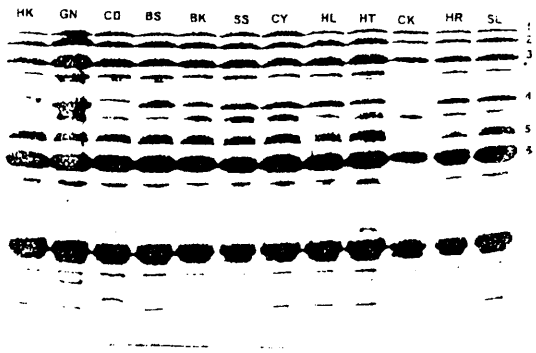
1 - Pyridoxal 5' phosphate 2 - Fast blue BB salt 3 - Aspartic acid 4 - Alpha-ketoglutaric acid
5 - Sodium dodecyl sulfate 6 - Commassie blue 7- Glycerol 8 - Glycine 9- Trichloric acetic acid

[شامل تری کلریک استیک اسید ۱۰ درصد]. الکتروفورز با جریان ثابت ۴۵ میلی‌آمپر(ابعاد ژل ۲۰×۱۶ سانتی متر)وتارسیدن نشانه‌رنگی باپائین ژل ادامه یافت.پس‌ازحذف ژل بالایی، رنگ آمیزی درطول شب‌انجام و سپس ژل در محلول رنگ بر قرار گرفت.

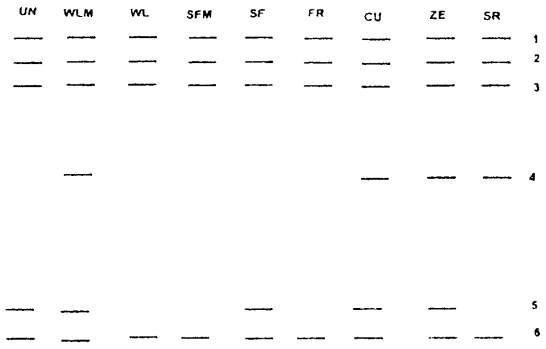
نتایج و بحث

مطابق باگزارشهای فرر- مانگ (۵)، و فوترل (٦)،دو گروه استراز E_1 و E_2 در لپه‌های ارقام سویا مشاهده گشت (شکل ۱). E_1 تولید ۳ نوار آندی با آلفاو بتا نفتیل استات کرد و E_2 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_1 و Got_2 مشاهده گردید. ایزوزیم Got_2 از Got_1 واضح تر بود. تعداد نوارهای Got_1 سه و در Got_2 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 ٦ 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 جهش‌یافته ویلیامز فاقد هر دو نوار چهار و پنجم بودند. ارقام SRF ویونیون 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 بااین حال بخاطر وجود تفاوت قابل ملاحظه در شدت رنگ نوارها استفاده از دانسیتومتری هنوز تنوع‌بیشتری را در معرض نمایش می‌گذارد. همچنین در ادامه مطالعات و با استفاده از ژل‌های شیبدار و یااستخراج پروتئین های خاص انتظار می رود که بتوان به تنوع بیشتری دست یافت.

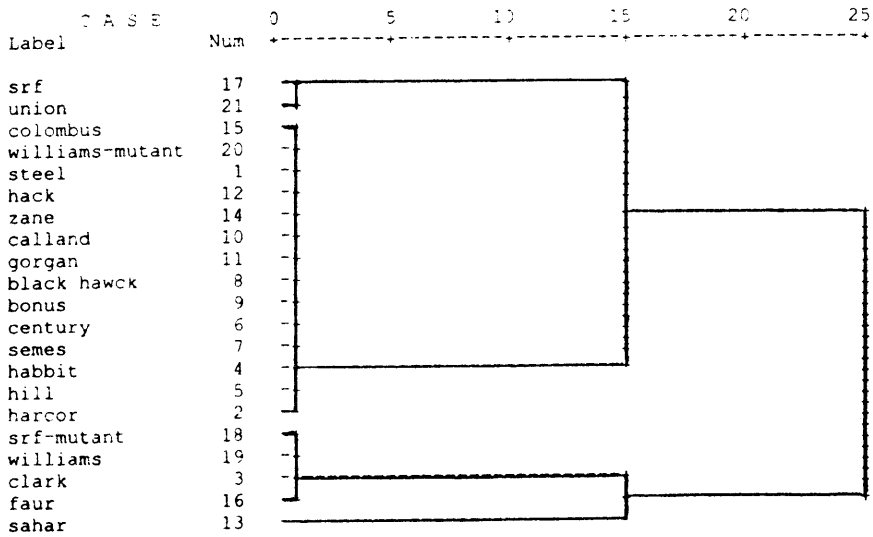


شکل ۳ - الگوی نواری پروتئین کل بذر ارقام سویا. SL: استیل، HR: هارکور CK:کلارک ،HT:هابیت ،HL: هیل ،CY: سنچری ، SS: سمس ، BK:بلاک‌هاک،BS:بونوس ،CD:کالاند،GN:گرگان ۳ وHK: هک



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

مبنای ژنتیکی تنوع ایزوزیم‌ها و پروتئین‌های ذخیره یکی از دلایل گستردگی کاربرد این روشها برای توصیف جوامع است. اگرچه توصیف و شناسایی جوامع برمبنای 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



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

تغییرات انجام شده در آمینواسیدهایی که در بار خالص الکتریکی پروتئین تغییری ایجاد نمی‌کنند نمود ایزوزیمی ندارند، به علاوه فقط یک دسته از ژن‌های ساختمانی دستور ساخت پروتئین‌ها را می‌دهند و این دسته ممکن است بیانگر وضعیت کلی ژنوم نباشد، بنابراین لازم است تعداد ژنوتیپ‌های مورد بررسی قابل ملاحظه و حتی الامکان از سیستم‌های آنزیمی بیشتری استفاده گردد تا بدینوسیله امکان دسترسی به پلی مورفیسم محتمل‌تر باشد.

مطالعات الکتروفورزی جوامع مختلف بر اساس پروتئین‌های غیرآنزیمی و عمدتاً پروتئین‌های ذخیره بذر است. اکثر روشهای الکتروفورزی تولید تعداد زیادی نوار مشخص برروی ژل‌ها می‌کند که معمولاً بیشتر از آن چیزی است که از طریق یک الگوی ایزوزیم به دست می‌آید. لذا الکتروفورز ژل پلی اکریلامید پروتئین‌های ذخیره را می‌توان به عنوان قویترین سیستم شناسایی ارقام مشابه به شمار آورد (۱۷).

در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که بکارگیری مکانیسم‌های متعدد در بررسی پلی مورفیسم درک بهتری را از ارتباط ژنومی ژنوتیپ‌ها در اختیار قرار می‌دهد. همچنین الکتروفورز پروتئین بذر طبق بررسیها روش بسیار مطمئنی است (۱۳) و تصویر دقیق‌تری را از وضعیت ژنوم‌ها در اختیار قرار می‌دهد.

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 Newsletler 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 structrural 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 elecrophoretically 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