دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱٦٤-۱٥٤ (۱۳۸۹)

تنوع در پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در دو گونه از گز روغنی (*Moringa peregrina* و *M. oleifera*)

فرشته اسدی کرم[۱]*، حسین میرزایی ندوشن[۲]، میترا امام[۳] و غلامرضا بخشی خانیکی[٤]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، صندوق پستی ۱۱٦ - ۱۳۱۸۵
پست الکترونیک: asadi@rifr-ac.ir
۲- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۳- مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
٤- استاد، دانشگاه پیام نور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۷/۲۷ تاریخ پذیرش:۱۳۸۸/۹/۱

چکیده

گونه‌هایی از جنس *Moringa* قادر به رویش در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری ایران هستند که با ارزش‌های زیاد دارویی، غذایی، صنعتی و زیست‌محیطی روز به روز بر اهمیت آنها افزوده می‌شود. با استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر از دو گونه از این جنس به نام‌های *Moringa peregrina* و *M. oleifera* و استفاده از تکنیک SDS-PAGE، پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر جمعیت‌هایی از این دو گونه مشخص گردید. باندهای تفکیک شده شماره‌گذاری شدند به‌طوری که براساس حضور یا عدم حضورشان در هریک از نمونه‌های مورد مطالعه به‌ترتیب، شماره صفر و یک به آنها داده شد. مجموع فاصله باندهای موجود در هر نمونه از مبدأ حرکت باندها از روی ژل نیز به‌عنوان یکی از مشخصات مورد مطالعه در نظر گرفته شد. با استفاده از نرم‌افزار JMP ماتریس داده‌های حاصل مورد تجزیه و تحلیل خوشه‌ای قرار گرفتند. از دندروگرام حاصل نیز جهت مطالعه و دسته‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه استفاده شد. پروفیل حاصل، تفاوت‌های اساسی بین دو گونه مورد مطالعه را آشکار ساخت که نشان داد از این روش به خوبی می‌توان جمعیت‌های دو گونه مورد مطالعه را از هم تفکیک نمود. همین طور تنوع مناسبی از این نظر بین نمونه‌های مختلف گونه *M. peregrina* که بومی کشور ماست مشاهده گردید. به عبارت دیگر، نتایج حاصل نشان داد که با استفاده از این روش به خوبی می‌توان جهت مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گونه‌های جنس مورینگا بویژه گونه بومی کشورمان که دارای ارزش ویژه دارویی است استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: گز روغنی، الکتروفورز، تنوع ژنتیکی، مورینگا، پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر.

مقدمه

گز روغنی (*Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori) به‌عنوان دومین گونه مهم از جنس مورینگا بعد از گونه *M. oleifera*، و یکی از گونه‌های قابل رویش در مناطق گرمسیری و بیابانی است (Morton, 1991) که در عرصه وسیعی از مناطق جنوب شرقی کشور ما و در استان‌های

هرمزگان و سیستان و بلوچستان پراکنش دارد. البته به دلایل متعددی پراکنش این گونه در عرصه‌های مذکور به ارتفاعات محدود شده است (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۸). به دلیل بذر مملو از روغن این گونه و نیز شباهت‌های ظاهری آن به درخت گز، به گز روغنی اشتهار یافته است. این گونه دارای اهمیت دارویی، خوراکی، صنعتی و اقتصادی زیادی است (Hegazy *et al.*, 2008) به‌طوری که در سایر مناطق رویشگاهی، بهره‌برداری‌های مناسبی از آن می‌شود، که به طور عمده به دلیل روغنی است که از بذر آن استخراج می‌شود. به طور کلی می‌توان گفت گونه‌هایی از مورینگا که در منطقه غرب آسیا پراکنش دارند از چندین جهت دارای اهمیت هستند که به واسطه آنها مورد توجه محققان رشته‌های مختلف علوم زیستی قرار گرفته‌اند. از جمله این ویژگی‌ها، خواص دارویی این گونه‌هاست و به طرق مختلف ثابت شده است که از اجزاء مختلف گونه‌هایی نظیر *M. oleifera* و *M. peregrina* می‌توان در درمان بیماری‌های متعددی استفاده نمود. یکی از خواص دارویی مورینگا، خاصیت ضد میکروبی عصاره برگ آن است که با آزمایش‌های متعددی به اثبات رسیده و مشخص شده است که این عصاره واکنش‌های ضد میکروبی شدیدی علیه قارچ‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد (Dahot, 1996).

مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گونه‌های مختلف مورینگا زمانی مورد توجه قرار گرفت که ویژگی‌های مختلف این پروتئین‌ها توسط محققان سایر علوم زیستی معرفی گردید. از زمانی که خاصیت تصفیه آب در اثر استفاده از سوسپانسیون محتوی پروتئین‌های بذر این گونه تأیید گردید گروهی از محققان در پی توصیف پروفیل پروتئین‌های آن برآمدند (Ghebremichael *et al.*, 2006). پس از اظهار این نکته که مولکول‌های خالص پروتئینی (با وزن مولکولی کم) موجود در این گونه، قدرت بالایی در جذب مواد، مجتمع کردن و رسوب آنها را دارند، (Broin *et al.*, 2002; Gassenschmidt *et al.*, 1995; Kilduff *et al.*, 1996) توصیف قابلیت‌های اجزاء مختلف پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مورینگا مورد توجه قرار گرفت (Ghebremichael *et al.*, 2006). اجزاء پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مورینگا دارای خواص ضد میکروبی و ضد قارچی نیز هستند که بر اهمیت آنها افزوده است. روغن موجود در بذر گونه‌های مورینگا ضمن داشتن خواص دارویی، از استقامت بالایی در برابر دمای بالا برخوردار است که کاربرد آنها را در صنایع مختلف بویژه صنایع ظریف نظیر ساعت‌سازی و صنایع دارویی افزایش داده است (Kleiman *et al.*, 2008). همین‌طور، داشتن ویژگی آنتی‌اکسیدانی در سطح بسیار مناسب (Marwah *et al.*, 2007)، موجب شده است که ارزش این گونه‌ها در صنایع غذایی نیز افزایش یابد. تاکنون محققان زیادی به استخراج و تفکیک پروتئین‌ها و بررسی خواص آنها در برخی از گونه‌های گیاهی پرداخته‌اند. گونه‌های مختلف جنس مورینگا از جمله این گونه‌ها هستند که از این نظر مورد توجه قرار گرفته‌اند تا ضمن تفکیک پروتئین‌های با وزن مولکولی کم و پپتیدهای استخراج شده از برگ و سایر اجزاء گیاه، خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد میکروبی آنها هم مطالعه شود (Dahot, 1996). همچنین، گونه‌های مختلف مورینگا از نظر داشتن مقادیر زیاد پروتئین هم، اهمیت خاصی پیدا کرده‌اند به‌طوری‌که به‌عنوان یکی از تأمین کننده‌های پروتئین گیاهی برای رفع نیاز نشخوارکنندگان نیز مطرح شده‌اند (Sanchez *et al.*, 2006). در سطح بین‌المللی اگرچه مطالعات گسترده‌ای روی جزئیات تنوع ژنتیکی و پراکنش این تنوع، دیده

نمی‌شود ولی مطالعات پراکنده‌ای در زمینه ویژگی‌های

مورفولوژیک (Anwar *et al.*, 2005) و گاهی ویژگی‌های مولکولی این گونه‌ها (Muluvi *et al.*, 1999) در جمعیت-های طبیعی گزارش شده است که حکایت از توانمندی بالقوه آنها جهت استفاده در احیاء و گسترش آنها دارد. با این حال، به‌رغم اهمیت روزافزون این گونه‌ها تاکنون بویژه در کشور ما به بررسی تنوع ژنتیکی موجود در درون و بین گونه‌ای گونه‌های مختلف مورینگا پرداخته نشده است.

سال‌های زیادی است که با ابداع و گسترش روش‌های مختلف الکتروفورزی به خصوص الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به روش SDS-PAGE، در مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی، تکامل و خویشاوندی‌های ژنتیکی گونه‌های مختلف گیاهی استفاده‌های گسترده‌ای می‌شود (Panigrahi *et al.*, 2007، شریعت و همکاران، ۱۳۸۰ و میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۸). گسترش سریع کاربرد این روش‌ها در رسیدن به اهداف مذکور از این جهت صورت گرفته است که با توجه به تأثیرپذیری کمتر این پروتئین‌ها از فاکتورهای محیطی، نتایج بدست آمده از این روش‌ها در مطالعه تنوع ژنتیکی یا تفکیک ارقام و گونه‌ها از یکدیگر اعتباری بیش از مشاهدات مورفولوژیک دارد. از این رو پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به‌عنوان نشانگرهای مولکولی پایدار با یکنواختی و تکرارپذیری مناسب در مطالعه و مدیریت ذخائر توارثی و منابع گیاهی ارزش ویژه‌ای یافته‌اند. با این حال، در خصوص تنها گونه مورینگای موجود در کشور با همه اهمیتی که دارد تاکنون در زمینه تنوع ژنتیکی آن بویژه با استفاده از روش‌هایی نظیر SDS-PAGE مطالعه‌ای صورت نگرفته است. البته با توجه به گستره‌ای که این گونه در کشور دارد به‌رغم فرسایش شدیدی که از حیث رویشگاهی در آن دیده می‌شود، انتظار می‌رود که هنوز تنوع ژنتیکی کافی که بتوان در احیاء و اصلاح آن مورد استفاده قرار گیرد، وجود داشته باشد. این تحقیق با هدف استفاده از پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر دو گونه از مورینگا که یکی بومی کشور بوده (*M. peregrina*) و دیگری وارداتی است (*M. oleifera*) در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی و تفاوت ساختاری پروتئین‌های این دو گونه در شرایط مختلف رویشگاهی، به اجرا در آمد. به طور کلی اهداف این تحقیق را می‌توان به شرح زیر خلاصه کرد.

– ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در درون جمعیت‌هایی از گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر آنها

– ارزیابی تنوع و اختلاف موجود بین جمعیت‌های مختلف موجود از گونه گز روغنی که بومی کشور می‌باشد با استفاده از پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر.

– شناسایی تفاوت‌های موجود بین دو گونه مختلف از جنس *Moringa* براساس پروفیل مذکور.

مواد و روشها

مواد گیاهی

سه جمعیت از گونه *M. peregrina* و یک جمعیت از گونه *M. oleifera* در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول ۱). در هر جمعیت از سه ژنوتیپ مختلف جهت استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر استفاده شد. به نحوی که بتوان ضمن مقایسه پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر دو گونه مورد نظر و نیز جمعیت‌های مختلف گونه بومی

کشور تنوع احتمالی درون گونه‌ای را از این نظر مطالعه نمود.

جدول ۱- گونه‌ها، جمعیت‌ها، کدهای اختصاری و منابع تأمین‌کننده بذر مورد استفاده در جمعیت‌هایی از دو گونه *M. peregrina* و *M. oleifera*

ردیف	گونه	محل تأمین	کد اختصاری
۱	*M. oleifera*	بوشهر	Mo
۲	*M. peregrina*	چانف	M p1
۳	*M. peregrina*	فنوج	M p2
٤	*M. peregrina*	شهرستان سرباز	M p3

استخراج پروتئین

در این مطالعه، مقایسه بین نتاج گونه‌ها و پایه‌های موجود در کشور صورت گرفت، به همین دلیل، پروتئین-های هر بذر به طور جداگانه استخراج گردید و مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای، هر بذر به طور جداگانه در هاون چینی سابیده شد. پس از پودر شدن کامل بذرها، به تدریج متناسب با وزن هر بذر (۳ ml بافر به ازاء هر ۰/۲ گرم بذر)، مقادیر لازم از بافر استخراج (گلیسین ۰/٤ M، تریس ٤٦۰ mM و اسیدیته ۸/۳) به نمونه‌ها اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۷ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. از آنجا که بذر این گونه مملو از روغن است لایه‌ای از روغن در بالا قرار گرفت که برداشته شد و محلول زیر این لایه جدا شده و برای بار دوم سانتریفیوژ گردید. در نهایت، محلول حاصل از دومین بار سانتریوفیوژ، تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شد (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۰).

تعیین غلظت پروتئین‌های مجهول

از آنجا که تفاوت بین ژنوتیپ‌ها از نظر درصد پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر محرز بود، ابتدا از روش بردفورد جهت سنجش کمی پروتئین‌ها استفاده شد. برای این منظور، از کیت‌های آماده محصول شرکت BioRAD با شماره کاتالوگ ۰۲۰۵-۵۰۰ استفاده گردید. از سرم آلبومین گاوی در هفت غلظت ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان پروتئین-های استاندارد به نحو زیر استفاده شد. ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر روی طول موج ۵۹۵ nm تنظیم شد. در ادامه توسط نمونه صفر (شاهد) که تنها حاوی محلول بردفورد بود، دستگاه روی صفر تنظیم شده و کالیبره گردید. سپس محلول‌های پروتئین استاندارد فوق‌الذکر به‌ترتیب در دستگاه قرار داده شدند و میزان جذب نور برای هر نمونه استاندارد ثبت گردید. به همین ترتیب جذب نوری نمونه‌های مجهول، یا پروتئین‌های استخراج شده از نمونه‌های بذری در دستگاه خوانده شد. با استفاده از غلظت پروتئین‌های معلوم، خط رگرسیون ترسیم گردید و منحنی استاندارد با پلات کردن مقادیر جذب نوری قرائت شده توسط دستگاه، در مقابل غلظت‌های معلوم آنها رسم گردید. سپس معنی‌دار بودن ضریب رگرسیون و عرض از مبدأ این خط آزمون شد. بعد از مشخص شدن معادله نهایی خط رگرسیون، با استفاده از مدل رگرسیون حاصل، غلظت پروتئین در نمونه‌های مورد بررسی تعیین

گردید که براساس این غلظت‌ها میزان پروتئین لازم جهت بارگیری بر روی ژل آکریل آمید تعیین گردید.

اجرای الکتروفورز

جهت بارگیری پروتئین‌ها بر روی ژل آکریل آمید ابتدا ۲۰ میکرولیتر از پروتئین استخراج شده را با ۲۰ میکرولیتر بافر نمونه (تریس- اسید ۷۷ mM، pH = ٦/٨، سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ٤٪، مرکاپتواتانول ۱۰٪، گلیسرول ۲۰٪ و بروموفنل بلو ۰/۰۱٪) مخلوط نموده و به مدت ۳ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده و آماده بارگیری گردیدند. این نمونه‌ها پس از خروج از حمام آب جوش بلافاصله روی یخ قرار گرفتند و تا زمان بارگیری در یخچال نگهداری شدند (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۰).

از سیستم بافری ناپیوسته با ژل آکریل آمید استفاده گردید. به این ترتیب که ابتدا ژل زیرین (آکریل‌آمید ۱۲٪، بیس ۰/۲٪، تریس ۰/۳۷۵ M با pH = ۸/۸) و بعد ژل بالایی (آکریل‌آمید ٤٪، تریس ۰/۱۲۵ M با pH = ٦/٨) در دستگاه پلیمریزه گردید. بافر الکترود نیز براساس تریس گلایسین ۲۵ mM به همراه SDS ۰/۱٪ با pH = ۸/۳ تهیه گردید.

در زمان بارگیری، از هر نمونه به تناسب تراکم پروتئین‌ها در عصاره‌های استخراج شده، بین ۱۰تا ۲۰ میکرولیتر از پروتئین حرارت دیده در درون هر چاهک ژل بارگیری گردید. نمونه‌ها با شدت جریان متوسط mA ٤٠ الکتروفورز شدند و تا زمانی که خط پیشتاز رنگی به انتهای ژل زیرین رسید الکتروفورز ادامه یافت. در ادامه کار، ژل از دستگاه خارج شده و پس از تثبیت با، TCA ۲۰٪ (Trichloro Acetic Acid) و شستشو با آب مقطر، به مدت یک شب در دمای محیط در محلول رنگ کماسی‌بلو رنگ‌آمیزی گردید. در ادامه جهت حذف رنگ فضای بین باندها، ژل در محلول رنگ‌بر (۳۵٪ اتانول، ۷/۵٪ اسید استیک، و ۵۷/۵ ٪ آب مقطر) قرار داده شد تا فضای بین باندها بی‌رنگ شود (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۰).

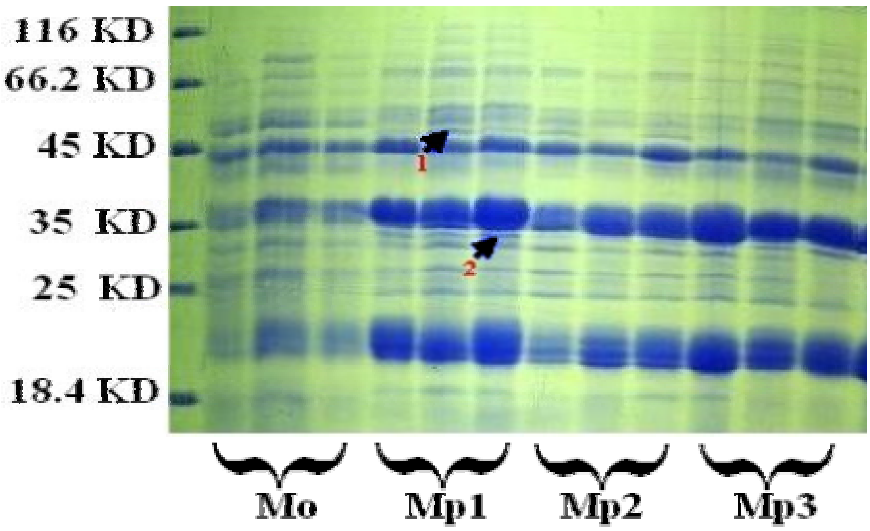
ثبت باندها و تجزیه داده‌های حاصل

نظر به اینکه باندهای پروتئینی و تنوع آنها مبنای مقایسه ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مورد مطالعه قرار بود، هر باند یا مقر باندی به‌عنوان یک صفت قلمداد شده و حضور یا عدم حضور هر باند بر روی ژل به‌ترتیب با اعداد یک و صفر مشخص گردید. به این ترتیب ماتریس عددی حاصل گردید که مشتمل بر ۱۵ سطر (تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه) و ۲۳ ستون (تعداد باندها) بود. همین‌طور فاصله هر یک از مقرهای باندی از مبدأ ژل به سانتی‌متر تعیین شده و مجموع فواصل باندهای موجود در پروفیل هر ژنوتیپ نیز تعیین گردید که به نوبه خود به‌عنوان صفت مکمل به ماتریس عددی مذکور اضافه گردید. ماتریس عددی حاصل از حضور یا عدم حضور باندهای پروتئینی با استفاده از نرم افزار JMP مورد تجزیه خوشه‌ای به روش Ward قرار گرفته و از دندروگرام حاصل جهت دسته‌بندی و مطالعه قرابت و شباهت ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌های مورد مطالعه استفاده گردید. علاوه‌براین، باندهای مشاهده شده از نظر کیفی نیز مورد مقایسه قرار گرفتند.

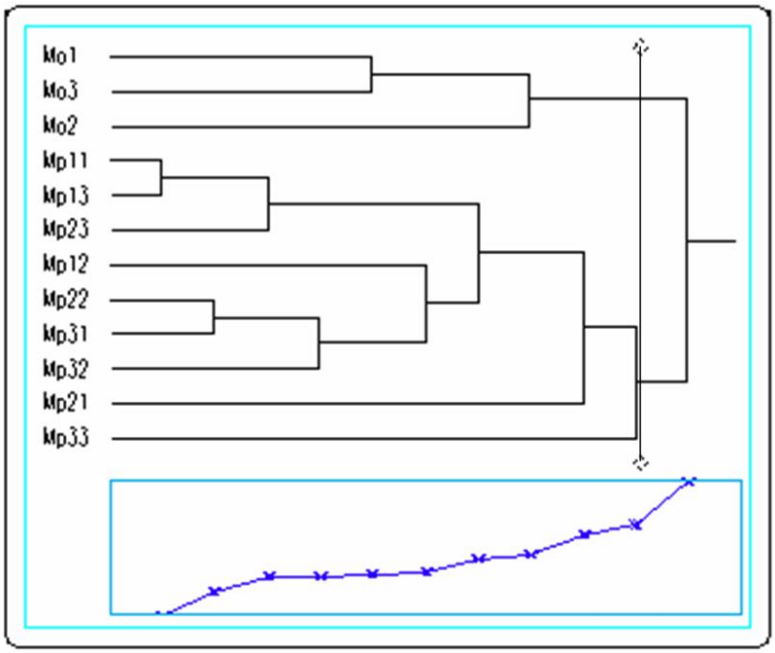
نتایج

در پروفیل چهارجمعیت از دو گونه مورد مطالعه که مشتمل بر دوازده ژنوتیپ بود در مجموع ۲۳ باند مشاهده

شد که اندازه یا وزن مولکولی باندهای پلی‌پپتیدی تفکیک شده آنها در دامنه‌ای بین ۱۸ تا ۱۱٦ کیلودالتون (KD) متغیر بود و از بالای ژل به پایین شماره‌گذاری شدند. پروفیل حاصل از باندهای پروتئینی به سه قسمت تقسیم شدند، بخش اول از پروتئین‌های با وزن مولکولی زیاد (بین ٤٥ تا ۱۱٦ KD)، بخش دوم با وزن مولکولی متوسط (بین ۲۵ تا ٤٥ KD) و بخش سوم با وزن مولکولی کم (بین ۱۸ تا ۲۵ KD) تشکیل شد (شکل ۱). بیشترین تعداد باندها در محدوده پروتئین‌های با وزن مولکولی زیاد و کمترین تعداد در محدوده پروتئین‌های با وزن مولکولی متوسط قرار گرفتند. تفاوت‌های موجود بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر پروفیل باندهای پروتئینی را می‌توان به تفاوتهای کمی و کیفی دسته‌بندی نمود. از نظر کمی، با وجود اینکه میزان پروتئین‌های بار شده به درون کلیه چاهک‌ها برابر بود، ولی تراکم برخی باندها در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با یکدیگر تفاوت‌های آشکاری را نشان دادند و مشخص شد که تراکم پروتئین‌ها، در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، متفاوت است. به‌عنوان نمونه دو گونه مورد بررسی از نظر تراکم باندهای پروتئینی تفاوت‌های اساسی از خود نشان دادند، به نحوی که در سه نقطه ۲۰، ۳۵ و ٤٥ KD تراکم باندها در گونه *M. peregrina* بسیار بیشتر از گونه *M. oleifera* بود. از این نظر در همین ناحیه بین جمعیت‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف گونه *M. peregrina* نیز تفاوت‌های آشکاری دیده شد. به نحوی که در محدوده ۲۰ KD تراکم زیاد باندها موجب همپوشانی سه باند در پروفیل پروتئین‌های هر سه ژنوتیپ Mp1 و Mp3 در این ناحیه شد ولی در همین محدوده در پروفیل ژنوتیپ‌های Mp2 سه باند قابل تفکیک بودند. از نظر کیفی بیشترین تنوع در باندهای موجود در محدوده پروتئین‌های با وزن مولکولی زیاد و کمترین تنوع در محدوده پروتئین‌های با وزن مولکولی کم دیده شد. باند شماره ۱۰ در هیچ‌یک از ژنوتیپ‌های Mp3 دیده نشد، در حالی‌که همین باند به وضوح در ژنوتیپ‌های Mp1 قابل رویت بود (پیکان شماره ۱ در شکل ۱). باند شماره ۱٦ که در ژنوتیپ‌های مربوط به Mp1 دیده شد (پیکان شماره ۲ در شکل ۱) در برخی از ژنوتیپ‌های مربوط به Mp2 مشاهده نشد و در برخی دیگر بسیار ضعیف ظاهر گردید. یکی از سبک‌ترین باندها (شماره ۲۳) انحصاراً در گونه *M. oleifera* دیده شد و دو باند اول مربوط به سنگین‌ترین پروتئین‌های مشاهده شده در گونه مذکور بسیار ضعیف ظاهر شدند. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورز در شکل ۲ ارائه شده است. اگر خط برش در نقطه‌ای قرار گیرد که نرم‌افزار تعیین کرده است در آن صورت هم ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از گونه*M. oleifera* در یک دسته مجزا قرار می‌گیرند، در حالی که در گونه *M. peregrina* در هیچ کدام از جمعیت‌ها، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در یک زیرخوشه قرار نمی‌گیرند. به‌طوری‌که ژنوتیپ‌های Mp33 و Mp21 در یک دسته جداگانه و سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در یک دسته بزرگ قرار می‌گیرند. در این صورت نیز قرار گرفتن ژنوتیپ‌هایMp11، Mp13 و Mp23 در یک زیرخوشه و نیز قرار گرفتن ژنوتیپ‌های Mp22، Mp31و Mp32 در یک زیرخوشه دیگر حکایت از تشابه زیاد پروفیل باندهای پروتئینی این ژنوتیپ‌ها که از جمعیت‌های مشترکی سرچشمه گرفته‌اند دارد.



شکل ۱- پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر حاصل از دوازده ژنوتیپ مختلف از دو گونه *M. peregrina* و *M. oleifera* .



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورزی حاصل از ژنوتیپ‌هایی از دو گونه *M. peregrina* و *M. oleifera*

بحث

استفاده از روش الکتروفورز در ارزیابی تنوع ژنتیکی در بخشی از ژرم‌پلاسم گونه‌های مختلف گیاهی گامی بسیار مهم و مؤثر در رسیدن به اهدافی نظیر ارزیابی، مدیریت ذخائر توارثی و نیز اتخاذ راهکارهای مناسب در حفاظت از این گونه‌هاست. پروتئین‌ها به‌عنوان محصولات مستقیم ژن‌ها، نشانگرهای مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی محسوب می‌شوند. چرا که این نشانگرها کمتر تحت تأثیر شرایط مختلف محیطی قرار گرفته و از نشانگرهای مورفولوژیک به مراتب قابلیت و اعتبار بیشتری دارند و می‌توانند به‌عنوان ابزاری مناسب در انگشت‌نگاری برخی از گونه‌ها و جمعیت‌های گیاهی با خصوصیات مورفولوژیک مشابه مورد استفاده قرار گیرند (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۰). در تحقیق حاضر ۲۳ باند در دو گونه مورد مطالعه از یکدیگر تفکیک گردیدند که در محدوده ۱۱۶–۱۸ کیلودالتون قرار داشتند در حالی در مطالعه انجام شده توسط Al-Kahtani و Abou-Arab(۱۹۹۳) ۵ باند در محدوده وزن مولکولی ۶۰–۱۱ کیلودالتون مشاهده شدند. در دو گونه مورد بررسی از جنس مورینگا در این تحقیق مشخص شد که می‌توان باندهای انحصاری برای تفکیک گونه‌ها و حتی جمعیت‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف از این دو گونه تعیین نمود. کما اینکه باندهای قرار گرفته در سه محدوده با وزن مولکولی ۲۰، ۳۵ و ۴۵ کیلودالتون با تراکم بالا خاص گونه *M. peregrina* بوده و از تراکم بسیار بیشتری نسبت به تراکم همین باندها در گونه *M. oleifera* برخوردار بودند. از این رو می‌توان از این سه باند در انگشت نگاری جهت تشخیص این دو گونه از یکدیگر استفاده نمود. البته نتایج دسته‌بندی با استفاده از روش خوشه‌ای نیز نشان داد که از ترتیب و ترکیب باندهای حاصل از پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر این دو گونه می‌توان به خوبی در جدا کردن و تشخیص دو گونه متفاوت این جنس از یکدیگر استفاده نمود ولی تفکیک جمعیت‌های مختلف از یک گونه از یکدیگر نسبی است، به‌طوری‌که برخی از ژنوتیپ‌های دو جمعیت مختلف از گونه *M. peregrina* در مجاور یکدیگر در یک زیردسته قرار گرفتند، به همین دلیل استفاده از سایر روش‌های مولکولی جهت کسب اطلاعات بیشتر در این زمینه لازم به نظر می‌آید. براساس این نتایج فواصل جغرافیایی توده‌ها و جمعیت‌های مورد مطالعه از گونه بومی کشور تا اندازه‌ای موجب تمایز بین جمعیت‌ها شد ولی این تمایز کامل نبود و هنوز وجوه مشترک زیادی در سطح مولکولی بین این جمعیت‌ها وجود دارد که حکایت از یک پیشینه ژنتیکی مشترک دارد. به عبارت دیگر، درخصوص گونه بومی کشور (*M. peregrina*) باید اضافه کرد که براساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان استنباط نمود که به‌رغم پراکندگی جمعیت‌های مورد مطالعه از این گونه، ارتباط و شباهت نسبتاً مناسبی بین این جمعیت‌ها وجود دارد. به نظر می‌رسد که بعد مسافت بین جمعیت‌های مختلف این گونه تا اندازه‌ای مانع جریان ژنی بین جمعیت‌های مختلف این گونه شده است ولی این ممانعت کامل نیست. میرزایی ندوشن و همکاران (۱۳۸۸) نیز در مطالعه جمعیت‌هایی از این گونه در توانمندی القاء کالوس به نتیجه مشابهی رسیدند. تطابق دسته‌بندی براساس پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و پراکنش جغرافیایی آنها در گونه‌های متعدد دیگری نیز

مشاهده شده است (Ana *et al.*, 2004; Bertozo *et al.*, 2001).

تنوع در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از گونه *M. oleifera* چندان قابل توجه نبود و به تفاوت‌هایی در یکی از باندهای مربوط به پروتئین‌های سنگین منحصر شد. لازم به ذکر است که گونه *M. oleifera* یک گونه وارداتی به کشور ما می‌باشد و هنوز در سطح گسترده‌ای پراکنده نشده است. این گونه در سطح چند پایه در استان بوشهر دیده شده و انتظار اینکه تنوع وسیعی از نظر ویژگی‌های مورفولوژیک و غیر مورفولوژیک در آن دیده شود نیز وجود نداشت. با این حال با توجه به اهمیت دارویی، غذایی، صنعتی و زیست‌محیطی این گونه و با توجه به اینکه این گونه قابلیت رویش و گسترش در عرصه وسیعی در مناطق جنوبی کشور ما را دارد، احتمال می‌رود که در صورت کاشت در مناطق مستعد رویش و براساس بذر حاصل از چند پایه مذکور، به دلیل نبود تنوع ژنتیکی کافی و عدم سازگاری، ممکن است به سرنوشت بسیاری از گونه‌های وارداتی دیگر دچار شود و در مقابل تغییرات اقلیمی، حساس و آسیب‌پذیر گردد. از این رو، توصیه می‌شود در صورتی که توسعه و گسترش این گونه در دستور کار مسئولین اجرایی در منابع طبیعی کشور قرار گرفت ابتدا نسبت به وارد کردن بذر بیشتری از جمعیت‌های مختلف این گونه بویژه از کشور منشاء آن هندوستان اقدام شود تا در صورت گسترش آن در عرصه‌های قابل گسترش در کشور، پایه و اساس ژنتیکی مناسبی داشته باشد.

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانیم که از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور و نیز گروه زیست‌فناوری منابع طبیعی این مؤسسه که امکانات مورد نیاز در اجرای این تحقیق را در اختیار ما گذاشتند صمیمانه قدردانی کنیم. همینطور از کلیه همکاران عزیز گروه زیست‌فناوری که به نحوی ما را در انجام این تحقیق کمک کردند تشکر می‌نماییم. از مسئول محترم بانک ژن منابع طبیعی که سخاوتمندانه بخشی از بذر مورد نیاز را در اختیار ما گذاشتند نیز صمیمانه قدردانی می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

– شریعت، آ.، میرزایی ندوشن، ح.، قمری زارع، ع.، و سنگتراش، م.ح.، ۱۳۸۰. مطالعه الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای در گونه‌هایی از یونجه یکساله. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ۸: ۶۷ - ۸۰.

– میرزایی ندوشن، ح.، اسدی کرم، ف.، امام، م.، بخشی خانیکی، غ. ر.، کنشلو ه. و آچاک، ی. ۱۳۸۸. توانمندی ژنتیکی در القاء کالوس و رشد جنین نارس در جمعیت‌هایی از گز روغنی (*Moringa peregrina* (Forssk). Fiori). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۷: ۲۹-۳۷.

– میرزایی ندوشن، ح.، شریعت، آ و اسدی‌کرم، ف، ۱۳۸۰. ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های مختلف تاغ (*Haloxylon* sp.) با استفاده از الکتروفورز. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان جنگلی و مرتعی، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ۷: ۹۹-۱۱۷.

– Al-Kahtani, H.A., and Abou-Arab, A.A., 1993. Comparison of physical, chemical and functional properties of *Moringa peregrina* (Al-Yassar or Al-Ban) and Soybean proteins. Creal Chem., 70: 619-626

– Ana, C.V., Pinherio, C., Martins, J.M.N., and Ricardo, C.P.P., 2004. Cultivar discrimination of Portogues *Lupinus albus* by seed protein electrophoresis: the importance of considering “glutelins” and glycoproteins. Field Crops Research, 87: 23-34.

– Anwar, F., Ashraf, M. and Bahanger, M.I., 2005. Inter-provenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. JAOCS, 82: 45-51.
– Bertozo, M.R. and Valls, J.F.M., 2001. Seed storage protein electrophoresis in *Arachis pintoi* and *A. repens* (Leguminosae) for evaluating genetic diversity. Genetic Resources and Crop Evolution, 48: 121–130.
– Broin, M., Santaella, C., Cuine, S., Kokkou, K., Peltier, G. and Joet, T., 2002. Flocculent activity of a recombinant protein from *Moringa oleifera* Lam. Seeds. Applied Microbiology and Biotechnology, 60:114-119.
– Dahot, M.U., 1996. Antimicrobial activity of small protein of *Moringa oleifera* leaves. Journal of Islamic Academy of Sciences, 11: 27-32.
– Gassenschmidt, U., Jany, K.K., Tauscher, B. and Niebergall, H., 1995. Isolation and characterization of a flocculation protein from *Moringa oleifera* Lam. BBA Biochim. Biophys. Acta, 124: 477-481.
– Ghebremichael, K.A., Gunaratna, K.R. and Dalhammar, G., 2006. Single-step ion exchange purification of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. Applied Microbiology and Biotechnology, 70: 526-532.
– Hegazy A.K., Hammouda, O., Lovett-Doust, J. and Gomaa, N.H., 2008. Population dynamics of *Moringa peregrina* along altitudinal gradient in the northwestern sector of the Red Sea. Journal of Arid Environments, 72: 1537-1551.
– Kilduff, J.E., Karanfil, T., Chin, Y.P., and Weber, W.J.. Jr, 1996. Adsorption of natural organic polyelectrolytes by activated carbon: a size-exclusion chromatography study. Environmental Science and Technology, 30:1336– 1343.
– Kleiman, R., Ashley, D.A. and Brown, J.H., 2008. Comparison of two seed oils used in cosmetics, *Moringa* and *Marula.* Industrial Crops and Products, 28: 361-364.
– Marwah, R.G., Fatope, M.O., Al Mahrooqi, R., Varma, G.B., Al Abadi, H. and Al-Burtamani, S.K.S., 2007. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. Food Chemistry, 101: 465-470.
– Morton, J.F., 1991. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae) – A boon to arid lands. Economic Botany, 45: 318-333.
– Muluvi, G.M., Sprent, J.I., Soranzo, J., Odee, D., Folkards, G., McNicol, J.W. and Powell, W., 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. Molecular Ecology, 8: 463-470.
– Panigrahi, J., Kumar, D.R., Mishra, M., Mishra, R.P. and Jena, P., 2007. Genomic relationships among 11 species in the genus *Cajanus* as revealed by seed protein (albumin and globulin) polymorphisms. Plant Biotechnology, 1: 109–116.
– Sanchez, N.R., Ledin, S. and Ledin, I., 2006. Biomass production and chemical composition of *Moringa oleifera* under different management regimes in Nicaragua. Agroforestry Systems, 66: 231-242.

Variation in seed storage proteins of two *Moringa* species (*Moringa peregrina* and *M. oleifera*)

F. Asadicorom[1*], H. Mirzaie-Nodoushan[2], M. Emam[3] and G.R. Bakhshi-Khaniki[4]

1*- Corresponding author, M.Sc. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran I.R.Iran, Email: asadi@rifr-ac.ir
2- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.
3– M.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
4- Prof., Payam Noor University, Tehran, I.R.Iran

Received: 19.10.2009 Accepted: 22.12.2009

Abstract

Several species of *Moringa*, growing in tropic and sub-tropic regions of Iran, are gaining commercial value for their application in medicine, food industry, and , environmental aspects. Seed storage proteins were extracted from two species of the genus named, *M. oleifera* and *M. peregrina*. Protein profile of several plant populations of the species was obtained using SDS-PAGE, in which the protein bands were clearly separated. The bands were scored 0 or 1 for absence or presence of the single bands, respectively. The total distances of the present bands of the profile of each genotype from the beginning point on the gel were summed to get the cumulative distances as a characteristic of each profile. Cluster analysis was performed on the data matrix using JMP software. The dendrogram produced by the software was used to classify the studied genotypes. Remarkable differences were observed between the two species based on the protein profiles, suggesting that the technique can be used to classify the populations of the species. Remarkable variation was observed between the studied samples of the indigenous species, *M. peregrina.* In other words, the results indicated that the technique is feasible to be used to study genetic variation between the populations of the *Moringa* species, particularly the indigenous species.

Key words: *Moringa peregrina,* Electrophoresis, Genetic variation, Seed storage proteins.