

بررسی میزان و تنوع پروتئین در بذر ده رقم کنجد (*Sesamum indicum L.*)

محمد رضا دینی ترکمانی و ژیرایر کاراپتیان^۱

چکیده

به منظور بررسی خصوصیات کمی و کیفی پروتئین در ارقام مختلف کنجد، ده رقم کنجد مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعه کمی با استفاده از روش کجلدال و کیفی با استفاده از الکتروفورز انجام شد. ارقام شامل اولتان، زودرس، یکتا، هندی، ورامین، چینی، کرج ۱، محلی مغان، نازک تک شاخه و نازک چند شاخه بود. نتایج تجزیه واریانس صفت مورد مطالعه نشان داد که میانگین پروتئین ارقام ۲۴/۰۲ درصد بوده و بین میزان پروتئین آنها اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۱ وجود دارد. پروتئیل پروتئین‌های ذخیره بذر کنجد با ده باند پلی پپتیدی و حرکت نسبی $0/941 < Rm < 0/2$ در سطح ژل مشخص گردید. باندها از شدت رنگ‌های متفاوت برخوردار بودند و از نظر پروتئین سه مکان ژنی در سطح ژل آشکار بود. این سه مکان در همه ارقام حالت مونومورف داشته و ارقام از نظر پروتئیل پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه هیچ تنوعی را نشان ندادند. لذا مطالعه کیفی پروتئین ارقام توسط الکتروفورز نشان می‌دهد این صفت از ارزش کاربردی لازم در به نژادی ارقام برخوردار نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کنجد، صفات کمی و کیفی، الکتروفورز، میزان پروتئین

مقدمه

۷۵٪ آن از چربی و پروتئین تشکیل یافته است (۳). روغن کنجد از روغن‌های نیمه خشک و دارای بیشترین مرغوبیت می‌باشد. به موجب کیفیت عالی روغن آن که دارای بوی مطبوع و مزه خوبی است، این بذر را ملکه دانه‌های روغنی نامیده‌اند (۷). در ایران نیز برای آن ارزش غذایی زیادی قائل بوده و از قدیم آن را «روغن پهلوانی» نام گذاری کرده‌اند (۵). علاوه بر آن، ریشه و برگ‌های کنجد نیز مصارف دارویی و آشپزی دارد. به عنوان مثال عصاره ریشه آن به روش‌های مختلف در بهبود آسم و

کنجد گیاه یکساله خود گشن از خانواده پدالیاسه (Pedaliaceae) با نام علمی *Sesamum indicum L.* است. این گیاه یکی از گیاهان دیرینه زراعی می‌باشد، که به علت دارا بودن درصد زیاد روغن از جمله دانه‌های روغنی و به عنوان یک منبع تغذیه‌ای محسوب می‌گردد. کیفیت روغن کنجد بالا بوده و از میزان پروتئین مناسبی برخوردار می‌باشد (۷). بیشترین بخش کاربردی کنجد، دانه آن است که نزدیک به

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

یکدیگر بوده تا با انتخاب پایه‌های مناسب در برنامه‌های به نژادی این گیاه با ارزش گام موثری برداشته شود.

مواد و روش‌ها

بذرهای ده رقم کنگد شامل اولتان، زودرس، یکتا، هندی، ورامین، چینی، کرج ۱، محلی مغان، نازک تک شاخه و نازک چند شاخه در سال ۱۳۸۳ از مؤسسه اصلاح بذر و تهیه نهال کرج دریافت شد. از ارقام به روش مشروح زیر عصاره گیری شده و سنجش پروتئین کل در تمام ارقام با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. مطالعه کیفی پروتئین با استفاده از الکتروفورز عمودی، روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز (PAGE) انجام شد (۱۰). در این بررسی ابتدا ۳۰ گرم از هر نمونه جداگانه خرد و با ۳ میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری ($\text{Na}_2\text{EDTA} = 0.46\text{g}$, $\text{Tris} = 0.54\text{g}$, $\text{Boric acid} = 0.27\text{g}$) در لوله آزمایش مخلوط گردید. برای جلوگیری از اکسیداسیون پروتئین، به هریک از لوله‌ها ۲۰ گرم اسید اسکوربیک و ۲۰ گرم پلی وینیل پیرولیدین اضافه شد. سر انجام جهت شکستن باندهای دی سولفید پروتئین به هر کدام ۳ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول اضافه گردید. سپس نمونه در دمای 4°C به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگه‌داری و بعد به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. از قسمت رویی و شفاف عصاره به میزان $25\ \mu\text{L}$ جهت انجام الکتروفورز در محل چاهک‌ها ریخته شد (۴). در ابتدای کار ولتاژ 50V و پس از چند دقیقه از ولتاژ 200V در سیرکولاسیون آب 4°C به مدت ۴ ساعت استفاده شد. جهت مشخص شدن وزن مولکولی تقریبی پلی پپتیدها، از پروتئین استاندارد استفاده گردید، که مشخصات آنها در جدول ۱ ذکر شده است. بعد از انجام الکتروفورز جهت ظاهر سازی پروتئین‌ها به ترتیب مراحل تثبیت، رنگ آمیزی و رنگ زدایی به عمل آمده و بعد عکس و گراف‌ها از باندهای تشکیل شده تهیه و مورد مطالعه قرار گرفت.

در سنجش پروتئین کل با روش کج‌دال، مدل *Gerhardt* با

سرفه به کار می‌رود و برگ‌های آن به صورت سبزی مصرف می‌گردد (۹). تولید کنندگان عمده این محصول در دنیا چهار کشور هند، چین، برمه و سودان می‌باشند. در برخی مطالعات روش دسته بندی خوشه‌ای (Clustering) به جهت سودمندی آنها در روشن نمودن دسته بندی ژنوتیپ‌ها استفاده شده است (۱۳). در گیاهان خودگشن با کمک این تکنیک والدین را برای دو رگ گیری به نحوی انتخاب می‌نمایند که باعث ازدیاد عملکرد در نتاج آنها بشود، زیرا هرچه والدین از هم دورتر باشند، تا حدی که همولوژی کروموزومی و ژنتیکی خود را حفظ کنند، هیبرید آنها دارای هتروزیس بیشتری خواهد بود (۶). از طرفی به نژادگر بدین طریق می‌تواند مقاومت‌ها و صفات مطلوب را از منابع مختلف یک جا جمع نماید و پایه ژنتیکی ارقام حاصل از نتاج آنها را قوی نموده و زمینه آسیب پذیری ژنتیکی را نیز کاهش دهد (۱). در آزمایشی، پروتئین α -گلوبولین موجود در بذر کنگد (که وزن مولکولی بالایی دارد) با دترجنت‌های کاتیونی متراکم، تجزیه و جدا گردید (۱۲). در مطالعات انجام گرفته توسط وزارت کشاورزی آمریکا میزان پروتئین بذر کنگد در آن کشور ۲۵-۱۹ درصد گزارش شده است (۷). هم‌چنین گروهی از محققان کره‌ای میزان پروتئین واریته جدیدی به نام *Hanseomgga* را که از تلاقی دو واریته مختلف تولید کرده بودند، $22/3$ درصد گزارش نمودند (۱۱). در آزمایشی با کشت بافت گیاه کنگد مبنی بر اثر خشکی بر میزان پروتئین کل و پرولین آزاد که توسط یحیی شریفی انجام گرفته نشان داده شد، مقدار پروتئین کل در کالوس‌های رشد یافته در تاریکی و روشنایی با افزایش خشکی محیط کشت، بالا رفته است. تأثیر خشکی بر تغییرات مقدار پروتئین کل کالوس‌ها از جنبه‌های تنشی نشان می‌دهد که تغییرات خشکی در متابولیسم این مواد موثر است. ولی در رابطه با تغییرات مقدار پرولین آزاد از نظر بیوسنتز پرولین و در رابطه با بیان ژن‌های آن قابل بررسی می‌باشد (۲). هدف از این مطالعه بررسی کمی و کیفی پروتئین بذر ارقام کنگد جهت تعیین قرابت آنها با

جدول ۱. لیست پروتئین‌های استاندارد و مشخصات الکتروفورزی آنها

نام پروتئین	وزن مولکولی (KD)	Rm
بتا گالاکتوزیداز	۱۱۶	۰/۲۱۷
فسفوریلاز B	۹۷	۰/۲۶۹
اووترانسفرین	۷۸	۰/۴۲۳
گلو تامات دهیدروژناز	۵۶	۰/۵۶۴
اووآلبومین	۴۲	۰/۶۶۶

بعداز تخمین مقدار ازت درصد پروتئین با فرمول تعریف شده برای کنجد (۵) به شرح زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد پروتئین} = ۵/۳ \times \text{میزان ازت}$$

در مطالعه حاضر بر اساس میانگین پروتئین کل دانه در ارقام و به روش تجزیه خوشه‌ای (UPGMA) به وسیله برنامه کامپیوتری SPSS دندروگرام ارقام مورد مطالعه رسم گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز واریانس (جدول ۲) نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین میزان پروتئین ارقام در سطح احتمال ۰/۰۱ وجود دارد، که نشان می‌دهد ارقام از نظر میزان پروتئین دانه با یکدیگر متفاوتند. مقدار ضریب تغییرات (CV) بیانگر دقت نسبتاً مناسب در اجرای آزمایش است. هم‌چنین میانگین کل پروتئین ارقام ۲۴/۰۲ درصد می‌باشد. مقایسه میانگین پروتئین‌ها با آزمون دانکن (جدول ۳) نشان می‌دهد که دامنه تغییرات پروتئین از ۱۷/۳۹ تا ۲۸/۲۱ درصد بوده که این اعداد به ترتیب به ارقام هندی و زودرس اختصاص دارد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ارقام را در سه کلاستر دسته بندی نمود (شکل ۱):

۸ لوله پخت (۷ لوله نمونه + ۱ لوله تست شاهد) صورت گرفت. هر لوله پخت شامل: ۱ گرم نمونه، ۵ گرم از مخلوط سولفات‌ها (سولفات مس ۳/۵ گرم + سولفات پتاسیم ۰/۹۶ گرم + اکسید سلنیوم ۰/۵ گرم) + ۲۰CC اسید سولفوریک غلیظ بود. برای عملیات پخت، دستگاه ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵۰ °C تنظیم و ثابت مانده و بعد در دمای ۴۵۰ °C که شروع پخت است قرار داده شد. مدت زمان لازم برای رسیدن به این دما ۹۰ دقیقه می‌باشد. بعد از طی ۱/۵ ساعت لوله محتوی نمونه به ترتیب شماره ۸-۱ برداشته شده، ۲۰CC آب مقطر به هر لوله اضافه گردیده و در قسمت تقطیر، در جایگاه مخصوص لوله‌ها قرار داده شد. هم‌زمان در جایگاه ارلن، ارلن‌های حاوی اسید بوریک ۲٪ و حاوی ۷-۵ قطره محلول تاشیرو (۰/۸۸ گرم متیل رد + ۰/۱۶ گرم بروموکروزول + ۱۰۰CC اتانول) قرار گرفت. بعد از تغییر رنگ محلول از بنفش کم رنگ به سبز کم رنگ، تیتراسیون با اسید سولفوریک ۰/۱N انجام شد.

با عمل تیتراسیون مصرفی، میزان ازت نمونه با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{وزن نمونه (گرم)} = \frac{\text{درصد ازت} \times ۱۰۰}{۰/۰۰۱۴ \times \text{عدد حاصل از تیتراسیون (CC)}}$$

جدول ۲. تجزیه واریانس مقایسه میزان پروتئین موجود در بذر ارقام کنجد

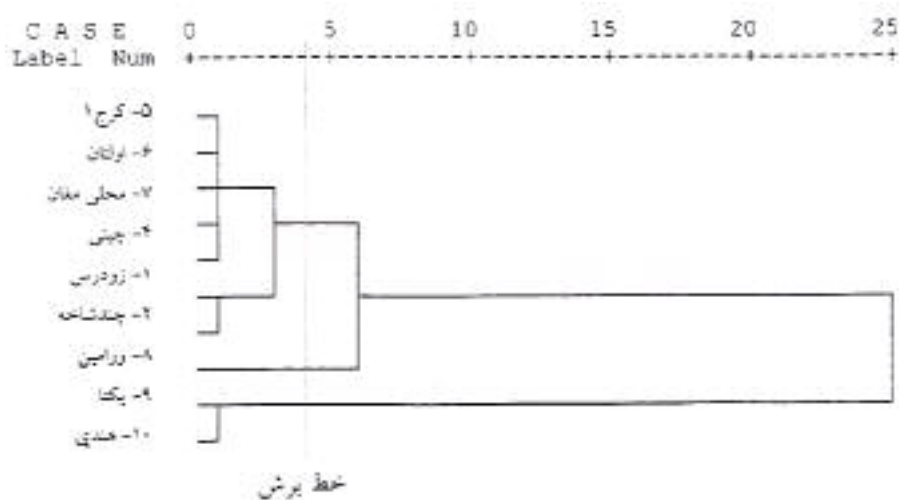
منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F محاسبه شده	p
تیمار	۹	۳۹۲/۴۳۵	۴۳/۶۰۴	۹۵/۵۶۳	۰/۰۰۰
خطا	۲۰	۹/۱۲۶	۰/۴۵۶		
کل	۲۹	۴۰۱/۵۶۱			

C.V. = 8.798

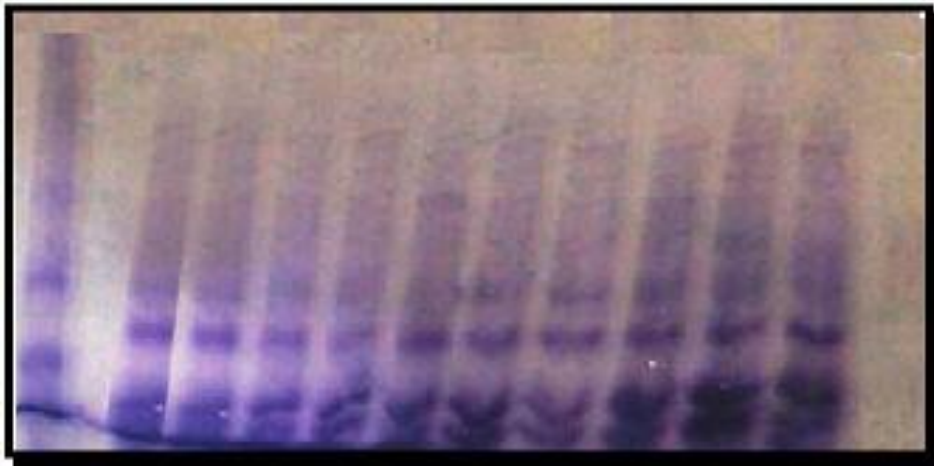
جدول ۳. ارزیابی و مقایسه مقدار درصد پروتئین کل در بذر ارقام کنجد

ردیف	ارقام	تکرار			SE ± میانگین	گروه
		۱	۲	۳		
۱	زودرس	۲۸/۱۸	۲۸/۰۹	۲۸/۳۵	۲۸/۲۱ ± ۰/۰۸	A
۲	نازک چند شاخه	۲۶/۷۸	۲۸/۷۹	۲۷/۳۹	۲۷/۶۵ ± ۰/۵۹	A
۳	محلی مغان	۲۵/۵۱	۲۵/۲۹	۲۶/۷۳	۲۵/۸۴ ± ۰/۴۵	AB
۴	چینی	۲۵/۹۹	۲۶/۰۸	۲۵/۲۹	۲۵/۷۹ ± ۰/۲۵	AB
۵	کرج ۱	۲۵/۳۸	۲۴/۹۹	۲۵/۵۵	۲۵/۳۱ ± ۰/۱۶	AB
۶	اولتان	۲۵/۸۱	۲۴/۵۹	۲۵/۴۶	۲۵/۲۹ ± ۰/۳۶	AB
۷	نازک تک شاخه	۲۴/۷۶	۲۴/۹۴	۲۵/۰۳	۲۴/۹۱ ± ۰/۰۸	AB
۸	ورامین	۲۲/۰۵	۲۰/۹۱	۲۳/۸۱	۲۲/۲۶ ± ۰/۸۴	B
۹	یکتا	۱۷/۶۸	۱۷/۳۳	۱۷/۵۰	۱۷/۵۰ ± ۰/۱۰	C
۱۰	هندی	۱۷/۵۹	۱۷/۳۳	۱۷/۲۴	۱۷/۳۹ ± ۰/۱۰	C

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن می باشد.



شکل ۱. دندروگرام بر اساس میانگین پروتئین کل



شماره ارقام کنجد بر حسب جدول ۳ می باشد. ۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ استاندارد

شکل ۲. مقایسه باندهای پلی پپتیدی ارقام کنجد. شماره ارقام بر حسب جدول ۳ می باشد.

اصلاحی دو رگ گیری دو گروهی که بیشترین فاصله را از هم دارند در برنامه تلاقی به عنوان والدین انتخاب می گردند. براساس همین موضوع در مطالعه حاضر مشخص شد که دو رقم هندی و یکتا از نظر میزان پروتئین با بقیه ارقام اختلاف معنی داری داشته و ارقام با رسم دندروگرام درسه کلاستر جداگانه قرار گرفتند. در حقیقت از نظر میزان پروتئین این سه گروه از هم فاصله بیشتری دارند، لذا در برنامه تلاقی می توان از میان این سه گروه متفاوت دو گروه را انتخاب کرده و یک رقم از هر کدام را به عنوان والدین باهم تلاقی داد تا احتمالاً بدین طریق نتیجه ای مطلوب به دست آورد.

همچنین از مطالعه انجام شده مشخص می شود که باندهای پلی پپتیدی تشکیل شده در سطح ژل از همدیگر قابل تفکیک نیستند. این ارقام از نظر تنوع ژنتیکی سه مکان ژنی در سطح ژل داشته و این مکان ها در همه ارقام حالت مونومورف داشت. بنابراین ارقام از نظر پروفیل پروتئین های ذخیره ای دانه هیچ تنوعی را نشان ندادند. علت آن احتمالاً به نوع گرده افشانی در این گیاه مرتبط می باشد، (خودگرده افشانی) که مانع ایجاد نوترکیبی و تولید گیاهانی با صفات ژنتیکی متنوع می گردد (۷). بنابراین مطالعه کیفی پروتئین ارقام توسط الکتروفورز نشان می دهد این صفت از ارزش کاربردی لازم در به نژادی ارقام کنجد

۱- گروه اول: زودرس، نازک چند شاخه، محلی مغان، چینی، کرج ۱، اولتان، نازک تک شاخه
۲- گروه دوم: ورامین
۳- گروه سوم: یکتا، هندی
طی عمل الکتروفورز (شکل ۲) پروتئین های ذخیره بذر، ۱۰ باند پلی پپتیدی با حرکت نسبی $0.94 < Rm < 0.2$ در محدوده وزن مولکولی ۱۱۶-۲۵ KD در سه منطقه مشخص و به صورت مونومورف به تصویر کشیده شد. باندها از شدت رنگ های مختلف برخوردار بودند. ضخیم تر بودن باندها نشانه بیشتر بودن مقدار کمی رشته های پپتیدی در محل آنها است.

بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای پروتئین کل دانه (شکل ۱) ارقام در سه کلاستر دسته بندی می شوند. همان طور که ذکر شد هدف عمده استفاده از روش تجزیه خوشه ای در به نژادی گیاهان زراعی، دسته بندی ژنوتیپ ها و نمونه هایی است که باهم بیشترین فاصله را دارند تا با استفاده از آنها در برنامه تلاقی بتوان حداکثر تنوع ژنتیکی را تولید کرد (۱۳). از لحاظ کمی، هر چه والدین از یکدیگر دورتر باشند تنوع بیشتری در نژاد حاصل از آنها ایجاد خواهد شد. لذا جهت یک برنامه

سیاسگزاری

از کلیه افراد محترم به خصوص آقای مبادر ثانی کارشناس محترم آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم و هم‌چنین از آقای وکیلی و مهندس جامعی به خاطر مساعدت‌ها و راهنمایی‌های ارزشمندشان قدردانی می‌کنم.

برخوردار نمی‌باشد. این نتیجه با بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام سویا که گیاهی خود گرده افشان است مشابه می باشد (۶). اما در کتان با وجود اتوگامی، ۳۰ درصد دگرگرده افشانی در این گیاه انجام می‌گیرد که این خود موجب تنوع ژنتیکی قابل توجهی از نظر نوع پروتئین در این گیاه شده است (۸).

منابع مورد استفاده

۱. خواجه احمد عطاری، ع. ۱۳۶۷. تنوع جغرافیایی صفات کمی خوشه در کلکسیون گندم ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران.
۲. شریفی، ی. ۱۳۸۰. بررسی اثر خشکی بر مقدار پروتئین کل و پرولین آزاد در کشت بافت گیاه کنجد. پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.
۳. شوت، پ. ۱۳۷۴. گیاهان اقتصادی جهان (ترجمه م. پور صالح). انتشارات مؤسسه اصلاح بذر و تهیه نهال کرج.
۴. کروری، س. ۱۳۷۸. پاسخ آنزیمی درختان به استرس‌های محیطی. مجله علمی- پژوهشی وزارت جهاد کشاورزی ۱۴(۴): ۲-۶.
۵. مهران، م. ۱۳۵۵. آزمایش روغن. انتشارات دانشگاه تهران.
۶. وایز، ای. ا. ۱۳۷۵. دانه‌های روغنی (ترجمه ف. ناصری). انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد.
۷. نصر، ز. ۱۳۸۲. ارزیابی و مقایسه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مهم دانه در برخی ارقام سویا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه.
8. Davidyan, G . G. and I. Sharov. 1994. Evaluation of a collection of Flax varieties for use in breeding. Trudy Poprikadnoi Botanike. Genetike Selektzii 55(1) : 3 – 20.
9. Health and Welfare Canada. 1990. Nutrition Recommendations. The Report of the Scientific Review Committee. Department of Supply and Services , Cat. No. H49-42/1990E, Ottawa, ON.
10. Hames, B.D. and D. Rickwood. 1990. Gel Electrophoresis of Protein, A Practical Approach. Oxford University Press, England.
11. Industrial Crops Research Korea. 1983. New early maturing sesame variety . Sesame and Safflower Newsletter. J. Fernandez Martinez 3: 22-24.
12. Lakshmi, T. and P. Nandi. 1977. Aggregation, dissociation and denaturation of sesame (*Sesamum indicum* L.) alpha-globulin in trimethyl ammonium bromide solution. Int. J. Pept. Protein Res. 10(2): 120-8.
13. Spangnoletti, Z. and C. Qualset. 1987. Geographical diversity for quantitative spike characters in a world collection of durum wheat. Crop Sci. 27: 235-241.