دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان

جداسازی راه‌اندازهای اختصاصی ژن‌های زئین بذر ذرت

استاد راهنما

دکتر بهرام باغبان

استاد مشاور

دکتر اشرف قلیزاده

پژوهشگر

فرزاد بصیری

بهمن 1389

نام خانوادگی: بصیری کلوجه		نام: فرزاد
عنوان پایان‌نامه: جداسازی راه‌اندازهای اختصاصی ژن‌های زئین بذر ذرت		
استاد راهنما: دکتر بهرام باغبان استاد مشاور: دکتر اشرف قلیزاده		
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد	رشته: بیوتکنولوژی کشاورزی	دانشگاه: تبریز
دانشکده: کشاورزی	تاریخ فارغ‌التحصیلی:	تعداد صفحه: 86
کلیدواژه‌ها: راه‌انداز، راه‌انداز اختصاصی بذر، آلفا-زئین، ذرت		

چکیده:

علیرغم اینکه همه سلول‌های یک موجود زنده دارای ژنوم یکسانی هستند، تمایز سلول‌ها، تشکیل بافت‌های مختلف و تداوم عمل آنها نیازمند بیان اختصاصی برخی ژن‌ها در بافت‌ها و شرایط مختلف است؛ راه‌اندازهای ژنی یکی از اصلی‌ترین وظایف را در این مورد برعهده دارند. با توجه به اهمیت ذرت به عنوان یک گیاه زراعی و یک گونه مدل مهم در مطالعات ژنتیکی، جداسازی بخش راه‌اندازی ژن‌های آلفا-زئین به عنوان راه‌اندازهای اختصاصی بذر، در این تحقیق هدف‌گیری شد. این راه‌اندازها چه در تولید پروتئین‌های نوترکیب و چه در تغییر کیفیت و خصوصیات بذر/دانه ذرت می‌توانند حائز اهمیت باشند. به منظور جداسازی این راه‌اندازهای اختصاصی ، ابتدا اطلاعات موجود در پایگاه داده‌های نوکلئوتیدی، جمع‌آوری شده، سپس اقدام به طراحی آغازگرهای اختصاصی از توالی‌های مرتبط گردید و از آنها برای تکثیر راه‌اندازها توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. برای تهیه ماده آزمایشی گیاهی، بذور دو رقم 704 و ذرت شیرین در شرایط گلخانه‌ای کشت شده و با استفاده از روش CTAB از گیاهان دو برگی DNA کل استخراج شد. پس از ارزیابی محصولات تکثیری و استخراج آنها از ژل، اقدام به همسانه‌سازی آنها در ناقل pGEM-T Easy Vector گردید. سپس باکتری‌های سویه DH5α با استفاده از روش TSS مستعد شده و با محصول واکنش اتصال تراریخت شدند. برای گزینش کلنی‌های موردنظر از آمپی سیلین و تست آبی- سفید در حضور X-gal و IPTG استفاده شد. حضور قطعه مورد نظر در پلاسمید نیز توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کلنی‌ها و برش آنزیمی تأیید شد. پس از توالی‌یابی، نتایج بدست آمده با اطلاعات موجود در شبکه مقایسه شده و تفاوت‌ها و شباهت‌های آنها مشخص گردید.

فهرست مطالب **صفحه**

1- بررسی منابع

مقدمه 1

1-1- ذرت 4

1-1-1- ذرت و اهمیت آن 4

1-1-2- گیاه‌شناسی ذرت 5

1-1-3- بذر ذرت 5

1-1-3-1- ساختمان بذر ذرت 5

1-1-3-2- ارقام ذرت 6

1-1-3-3- ترکیب بیوشیمیایی بذر ذرت 7

1-1-3-4- پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ذرت 8

1-1-3-4-1- گلوبولین‌های ذخیره‌ای 8

1-1-3-4-2- زئین‌ها 9

1-1-3-5- تولید و انباشت پروتئین‌های ذخیره‌ای 10

1-2- راه‌انداز 12

1-2-1- کلیات 12

1-2-2- راه‌اندازهای گیاهی 17

1-2-3- اهمیت راه‌انداز اختصاصی بذر 22

1-2-4- راه‌اندازهای اختصاصی ژن‌های زئین بذر ذرت 23

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد گیاهی جهت استخراج DNAی ژنومی 29

2-2- استخراج DNAی ژنومی 29
2-3- بررسی کیفیت و کمیت DNAی استخراج شده 31
2-3-1- اندازه‌گیری غلظت DNAی استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری 31
2-3-2- بررسی DNAی استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز 31
2-4- تکثیر راه‌انداز توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 32
2-4-1- طراحی آغازگرهای اختصاصی 32
2-4-2- مواد مورد نیاز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 34
2-4-3- چرخه‌های دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 35
2-4-4- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 35
2-5- همسانه‌سازی قطعات در pGEMT-Easy Vector 35
2-5-1- تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ژل آگارز 35
2-5-2- واکنش اتصال قطعه به ناقل 37
2-5-3- تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد به روش TSS 38
2-5-3-1- کشت شبانه باکتری 38
2-5-3-2- تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد 38
2-5-4- تراریزش باکتری *E. coli* سویه DH5α با محلول واکنش اتصال 39
2-6- شناسایی کلنی‌های نوترکیب به روش آبی- سفید 40
2-7- بررسی حضور قطعه مورد نظردر پلاسمید 42
2-7-1- بررسی حضور قطعه مورد نظردر پلاسمید توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مستقیم کلنی‌های سفید 42
2-7-2- جداسازی DNAی پلاسمیدی 42
2-7-2-1- جداسازی DNAی پلاسمیدی به روش لیز قلیایی 42
2-7-2-2- جداسازی DNAی پلاسمیدی با استفاده از کیت 44

2-7-3- بررسی حضور قطعه مورد نظردر پلاسمید توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پلاسمیدهای جداسازی شده 45
2-7-4- بررسی حضور قطعه مورد نظردر پلاسمید نوترکیب توسط هضم آنزیمی 46
2-7-4-1- هضم پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم *Eco*RI 46
2-7-4-2- هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم *Hin*dIII.....46
2-7-4-3- هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم *Nco*I.....47
2-7-4-4- هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط دو آنزیم *Hin*dIII و *Nco*I بصورت جداگانه 47
2-7-4-5- هضم توام پلاسمید نوترکیب توسط آنزیمهای *Hin*dIII و *Nco*I 48
2-8- کشت گلیسرول 15% باکتری‌ها 48
2-9- توالی‌یابی قطعه تکثیر شده.....49

3- نتایج و بحث

3-1- استخراج DNAی ژنومی.....51
3-2- کیفیت و کمیت DNAی استخراج شده 52
3-2-1- روش اسپکتروفتومتری 52
3-2-2- روش الکتروفورز ژل آگارز.....52
3-3- تکثیر قطعات ژن‌های آلفا-زئین 19 و 22 کیلودالتون از ژنوم ذرت توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....53
3-3-1- طراحی آغازگرهای اختصاصی 53
3-3-1-1- طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعات ZN19PRO+UTR+SIG و ZN19PRO+UTR...53
3-3-1-2- طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعات ZN22PRO+UTR+SIG و ZN22PRO+UTR...56
3-3-2- بهینه‌سازی چرخه‌های دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعات از ژنوم ذرت.....57
3-3-3- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....58
3-3-3-1- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (قطعه ZN19PRO+UTR+SIG) 58
3-3-3-2- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (قطعه ZN22PRO+UTR+SIG) 58

3-4- همسانه‌سازی قطعات تکثیر یافته آلفا-زئین 19 و 22 کیلودالتون در pGEM-T Easy Vector 59
3-4-1- تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ژل آگارز 59
3-4-2- واکنش اتصال قطعات تخلیص شده به ناقل 60
3-5- شناسایی کلنی‌های نوترکیب به روش آبی- سفید 62
3-6- تأیید حضور قطعات درپلاسمید 62
3-6-1- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مستقیم کلنی‌های سفید یا پلاسمید نوترکیب استخراج شده 62
3-6-1-1- واکنش زنجیرهای پلیمراز برای تأیید حضور قطعه ZN19PRO+UTR+SIG 63
3-6-1-2- واکنش زنجیرهای پلیمراز برای تأیید حضور قطعه ZN22PRO+UTR+SIG 64
3-6-2- تأیید حضور قطعات ZN19PRO+UTR+SIG و ZN22PRO+UTR+SIG توسط هضم آنزیمی 64
3-7- توالی‌یابی قطعه تکثیر شده 66
3-8- تجزیه و تحلیل توالی قطعات بدست آمده 68
3-8-1- مقایسه توالی قطعات با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های NCBI 68
3-8-1-1- مقایسه توالی قطعه ZN19PRO+UTR+SIG با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های NCBI برای دو رقم 704 و ذرت شیرین 68
3-8-1-2- مقایسه توالی قطعه ZN22PRO+UTR+SIG با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های NCBI برای رقم 704 76
نتیجه‌گیری و پیشنهادها 80
نتیجه‌گیری 80
پیشنهادها 80
منابع 82
پیوست‌ها 87

فهرست جدول‌ها **صفحه**

جدول 1-1- درصد نسبی بخش‌های تغذیه‌ای در قسمت‌های مختلف بذر ذرت 7

جدول 2-1- مواد لازم برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 34

جدول 2-2- برنامه دمایی بهینه شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 35

جدول 2-3- شرایط واکنش اتصال قطعه تکثیر شده به pGEMT-Easy Vector.....37

جدول 2-4- شرایط واکنش هضم پلاسمید توسط آنزیم برشی *Eco*RI.....46

جدول 2-5- شرایط واکنش هضم پلاسمید توسط آنزیم برشی *Hin*dIII 46

جدول 2-6- شرایط واکنش هضم پلاسمید توسط آنزیم برشی *Nco*I.....47

جدول 2-7- شرایط واکنش هضم پلاسمید توسط آنزیم برشی *Nco*I و *Hin*dIII 48

جدول 3-1- توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه ZN19PRO+UTR+SIG 55

جدول 3-2- توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه ZN22PRO+UTR+SIG 57

جدول 3-3- تغییرات توالی قطعه ZN19PRO+UTR+SIG رقم 704 در مقایسه با توالی X05911 و محل وقوع آنها 75

جدول 3-4- تغییرات توالی قطعه ZN19PRO+UTR+SIG ذرت شیرین در مقایسه با توالی X05911 و محل وقوع آنها.....75

جدول 3-5- تغییرات توالی قطعه ZN22PRO+UTR+SIG رقم 704 در مقایسه با توالی AF090447 و محل وقوع آنها 79

فهرست شکل‌ها **صفحه**

شکل 1-1- بذر ذرت 6

شکل 1-2- زئین‌های بذر ذرت 10

شکل 1-3- مراحل مختلف شکل‌گیری اجسام پروتئینی در آندوسپرم ذرت. 11

شکل1-4- اجسام پروتئینی یک سلول زیر لایه آلورن در آندوسپرم سخت ذرت. 12

شکل 1-5- کنترل رونویسی در یوکاریوت‌ها 13

شکل 1-6- شکل شماتیک ژنی که توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شود. 15

شکل 1-7- راه‌انداز پایه RNA پلیمراز II. 25

شکل 1-8- راه‌اندازهای دارای جعبه TATA و فاقد TATA 16

شکل 2-1 نشانگر اندازه GeneRuler 1 Kb DNA Ladder 32

شکل 3-1- الکتروفورز DNAی ژنومی استخراج شده 53

شکل 3-2- نواحی همسانه‌سازی شده از ژن‌های آلفا-زئین 54

شکل 3-3- توالی نوکلئوتیدی قطعه ZN19PRO+UTR+SIG و محل اتصال آغازگرها 55

شکل 3-4- توالی نوکلئوتیدی قطعه ZN22PRO+UTR+SIG و محل اتصال آغازگرها.....56

شکل 3-5- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (قطعه ZN19PRO+UTR+SIG).....58

شکل 3-6- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (قطعه ZN22PRO+UTR+SIG).....59

شکل 3-7- تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(قطعه ZN19PRO+UTR+SIG) از ژل آگارز 60

شکل 3-8- نقشه فیزیکی pGEM-T Easy Vector.....61

شکل 3-9-کلنی‌های سفید و آبی 62

شکل3-10- الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده 63

شکل3-11- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از پلاسمیدهای حاوی قطعه ZN19PRO+UTR+SIG رقم 704 و ذرت شیرین به عنوان الگو 63

شکل3-12- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از پلاسمیدهای حاوی قطعه ZN22PRO+UTR+SIG رقم 704 و ذرت شیرین به عنوان الگو 64

شکل 3-13- الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاوی قطعه ZN19PRO+UTR+SIG.....65

شکل 3-14- الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاوی قطعه ZN22PRO+UTR+SIG.....65

شکل 3-15- نتیجه توالی‌یابی قطعه تکثیر شده ZN19PRO+UTR+SIG رقم 704. 66

شکل 3-16- نتیجه توالی‌یابی قطعه تکثیر شده ZN19PRO+UTR+SIG کیلودالتون رقم ذرت شیرین. 67

شکل 3-17- نتیجه توالی‌یابی قطعه تکثیر شده آلفا-زئین ZN22PRO+UTR+SIG رقم 704.....68

شکل 3-18- خلاصه نتیجه بلاست قطعه ZN19PRO+UTR+SIG برای رقم 704. 71

شکل 3-19- نتیجه همردیفی با نزدیکترین توالی گزارش شده به ZN19PRO+UTR+SIG برای رقم 704. 72

شکل 3-20- خلاصه نتیجه بلاست قطعه ZN19PRO+UTR+SIG برای ذرت شیرین. 73

شکل 3-21- نتیجه همردیفی با نزدیکترین توالی گزارش شده به ZN19PRO+UTR+SIG برای ذرت شیرین. 74

شکل 3-22- خلاصه نتیجه بلاست قطعه ZN22PRO+UTR+SIG برای رقم 704. 77

شکل 3-23- نتیجه همردیفی با نزدیکترین توالی گزارش شده به ZN22PRO+UTR+SIG برای رقم 704.....78

مقدمه

با توجه به افزایش روزافزون جمعیت جهان و محدود بودن منابع، استفاده از روشهای مرسوم، بشر آینده را با مشکلاتی جدی از قبیل کمبود مواد غذایی، تخریب جنگل‌ها و مراتع، گسترش بیابان‌ها، از بین رفتن گونه‌های گیاهی و جانوری، آلودگی محیط زیست با انواع سموم و نیز مقاوم شدن آفات و عوامل بیماریزا به این سموم روبرو خواهد کرد. لذا نیاز مبرمی به بهره‌گیری از روشهای جدید احساس می‌گردد. بیوتکنولوژی و بطور اخص بیوتکنولوژی کشاورزی و گیاهی می‌تواند ابزار قدرتمندتر و سالمتری را برای تأمین نیازهای بشر و کاهش روند این مشکلات فراهم نماید. بیوتکنولوژی توانایی ایجاد خصوصیات بسیاری نظیر مقاومت به آفات، بیماریها، علف‌کش‌ها و شرایط نامساعد، ارزش غذایی یا دارویی خاص، تولید فراورده‌ای خاص، قابلیت نگهداری و فراوری بهتر و... را در گیاهان دارد.

طبق قاعده اساسی زیست شناسی مولکولی[1] که با انتقال جز به جز[2] اطلاعات بین سه بیوپلیمر حاوی اطلاعات یعنی DNA، RNA و پروتئین سروکار دارد، اطلاعات موجود در توالی DNA با رونویسی به RNA و سپس با ترجمه به پروتئین منتقل می‌شود. جز تعداد اندکی از ژن‌ها که به طور دایمی بیان می‌شوند، اکثر ژن‌ها فقط زمانی بیان می‌شوند که محصول آنها مورد نیاز باشد و یکی از مهمترین مراحلی که تنظیم بیان ژن در آن مرحله انجام می‌گیرد، رونویسی می‌باشد. انجام رونویسی نیز مستلزم اتصال RNA پلیمراز به DNA در جایگاهی صحیح و با فراوانی کنترل شده است. راه‌انداز ژن که معمولا در بالادست ژن قرار دارد، یکی از مهمترین وظایف را در این زمینه بر عهده دارد و در واقع این راه‌انداز ژن است که تعیین می‌کند یک ژن در چه بافتی، در چه

1- The central dogma of molecular biology
2- Residue-by-residue

مرحله رشدی و با چه شدتی بیان شود. راه‌اندازها این وظیفه مهم را با همکاری عوامل رونویسی مختلفی که به آن متصل می‌شوند، انجام می‌دهند.

ذرت علاوه از آنکه یک گونه زراعی مهم است و به عنوان سومین غله تولیدی دنیا، کاربردهای بسیار فراوانی دارد، به عنوان یک گونه مدل مهم نیز مطرح بوده و مطالعات ژنتیکی فراوانی بر روی آن انجام می‌پذیرد. با توجه به مشکلاتی که بیان سراسری ژن‌ها دارد و نیز با توجه به اینکه ایجاد هر نوع تغییر اختصاصی در بذر به عنوان مهمترین بخش اقتصادی ذرت، مستلزم استفاده از راه‌اندازی است که بطور اختصاصی و با کارایی بالا در بذر بیان یابد، جداسازی راه‌انداز اختصاصی بذر حائز اهمیت فراوانی است. آلفا-زئین‌ها پرولامین‌های بذر ذرت هستند که منحصرا در آندوسپرم بذر یافت می‌شوند. بر این اساس تحقیق حاضر، با هدف جداسازی راه‌انداز آلفا-زئین‌های بذر ذرت به منظور تغییر خصوصیات بذر و استفاده در پروژه‌های انتقال ژن صورت پذیرفت.

بررسی منابع

1-1- ذرت

1-1-1- ذرت و اهمیت آن

ذرت با نام علمی *Zea mays* L. گیاهی متعلق به خانواده Poaceae می‌باشد. ذرت بعد از گندم و برنج، سومین غله مهم دنیا به شمار می‌آید و از متوسط 157 کیلوگرم غله‌ای که هر فرد سالانه در جهان مصرف می‌کند، به ترتیب 44% آن به گندم، 37% آن به برنج و 12% آن به ذرت اختصاص دارد. ذرت 15% پروتئین و 20% کالری مورد نیاز جهانی را تأمین می‌کند (ناس و تانومیهارجو، 2010). میزان تولید جهانی ذرت در سال 2009 میلادی جمعاً 817/110509 میلیون تن بوده است و در ایران نیز در سال زراعی 1387-1386 میزان تولید این محصول، به 1/78 میلیون تن رسیده است (رادمهر، 1388).

ذرت گیاهی است که کاربردهای بسیار متنوعی دارد. علاوه از اینکه یک محصول دانه‌ای است، می‌توان آنرا به عنوان یک علوفه سیلویی نیز کشت کرد (راشد محصل و همکاران، 1380). علت این کاربرد وسیع ذرت به پراکنش جهانی آن، قیمت پائین آن نسبت به سایر غلات، انواع متفاوت دانه و دامنه وسیعی از ویژگی‌های زیستی و صنعتی آن مربوط می‌شود (داوسول، 1996).

مرکز پیدایش[1] ذرت در ناحیه آمریکای مرکزی (احتمالاً در ارتفاعات مکزیک) بوده و قدیمی‌ترین ذرت در دره تهوکان مکزیک یافت شده است که مربوط به 7000 سال پیش می‌شود (براون، 1985).

ذرت گیاهی استثنائی است. زیرا هم یک گیاه زراعی عمده و هم یک گونه مدل برای مطالعات ژنتیکی بشمار می‌آید. بعنوان یک گیاه مدل، آزمایشات در ذرت منجر به کشف 1- دوباره قوانین وراثت مندل، 2- نظریه ژنتیک کمی، 3- تعیین اثر اشعه X روی کروموزوم‌ها و 4- کشف عناصر ترانسپوزون گردید (اسکات، 2009).

1 - Center of Origin

ذرت گیاهی دیپلوئید با 20 کروموزوم می‌باشد. ژنوم ذرت 2/3 تا 2/7 گیگا جفت باز است که هم‌اندازه ژنوم انسان (2/8 گیگا جفت باز) می‌باشد. ژنوم ذرت کوچکتراز ژنوم جو (5 گیگا جفت باز) و گندم (17 گیگا جفت باز)است، اما همواره بعنوان یک مدل برای ژنوم‌های گیاهی بزرگ مطرح بوده است (رابینوویکز و بنتزن، 2006). ژنوم ذرت در حدود 42000 تا 56000 ژن را در بر می‌گیرد (بروگمن و همکاران، 2006).

1-1-2- گیاه‌شناسی ذرت

ذرت گیاهی یک‌ساله و تک‌لپه می‌باشد. ساقه ذرت مانند سایر غلات بندبند و استوانه‌ای است. ذرت سه نوع ریشه دارد: 1- ریشه‌های بذری و ریشه‌های اولیه[1]،2- ریشه‌های تاجی[2] و 3- ریشه‌های هوایی یا نگهدارنده. برگ‌های ذرت نیز همانند سایر غلات، شامل پهنک و غلاف است که غلاف برگ ساقه را در آغوش می‌گیرد. ذرت گیاهی تک‌پایه[3] می‌باشد. بدین معنی که گل‌های نر و ماده جدا از هم و بر روی یک پایه قرار دارند. گل‌های ماده ذرت از جوانه‌ای که در قاعده غلاف برگ وجود دارد، تولید می‌شوند و بعد از لقاح و تکامل، به بلال تبدیل می‌شوند. گل‌های نر نیز در انتهای ساقه اصلی به صورت خوشه قرار دارند. به علت جدا بودن گل‌های نر و ماده، گرده‌افشانی بطور غیرمستقیم انجام می‌شود (بی‌نام، 2008).

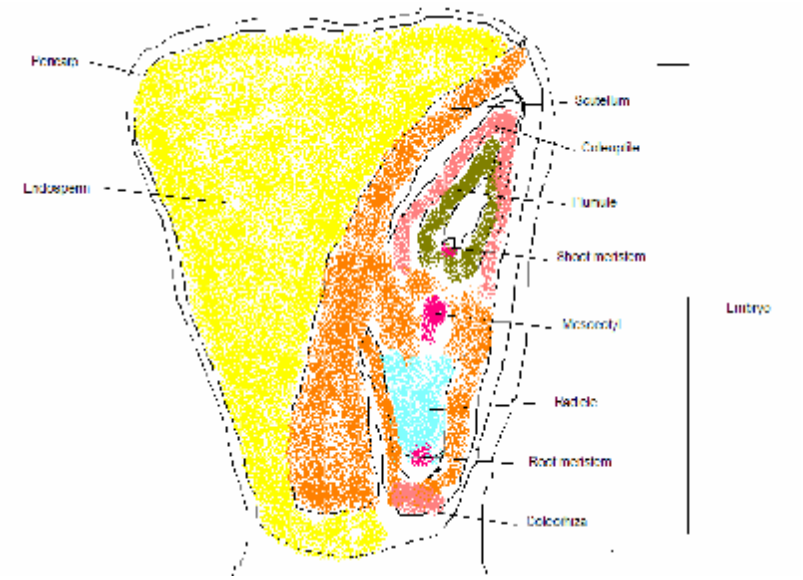
1-1-3- بذر ذرت

1-1-3-1- ساختمان بذر ذرت

بذر ذرت بسیار بزرگتر از بذر دیگر غلات می‌باشد و از لحاظ گیاه‌شناسی یک میوه گندمه[4] است. بدین معنی که پریکارپ (دیواره تخمدان) و تستا (پوسته بذر) به یکدیگر چسبیده‌اند و به همین جهت دو ساختار

1- Seminal roots
2- Coronal roots
3- Monoecious
4- Caryopsis

جداگانه میوه و بذر در هم ادغام شده و یک ساختار را بوجود آورده‌اند. بذر ذرت از سه بخش اصلی آندوسپرم (83%)، جنین (11%) و دیواره میوه (6%) تشکیل شده است که مجموعاً 42% از وزن خشک گیاه را به خود اختصاص می‌دهند. خود جنین نیز همانطور که در شکل 1-1 دیده می‌شود شامل این بخش‌های اصلی می باشد: کلئوپتیل، ساقه اولیه، ریشه اولیه و کلئوریز (ناس و تانومیهارجو، 2010).



شکل 1-1- بذر ذرت

1-1-3-2- انواع ذرت

طبقه‌بندی ذرت بیشتر بر اساس کیفیت، کمیت و الگوی اجزای آندوسپرم بذر آن صورت می‌گیرد (براون، 1985). هرچند که صدها رقم ذرت وجود دارد، با این حال ارقامی که بصورت تجاری کشت می‌گردند عبارتند از (براون، 1985؛ بی‌نام، 2008):

ذرت سخت[2] (*Zea mays* L. var. *Indurate*)، ذرت دندان اسبی[3] (*Zea mays* L. var. *Indentata*)، ذرت بو

1- Plumule
2- Flint corn
3- Dent corn

داده[1] (*Zea mays* L. var. *Everta*)، ذرت آردی[2] (*Zea mays* L. var. *Amylocea*)، ذرت شیرین[3] (*Zea mays* L. var. *Saccharata*)، ذرت مومی[4] (*Zea mays* L. var. *Ceratina*) و ذرت غلاف‌دار[5] (*Zea mays* L. var. *Tunicate*).

1-1-3-3- ترکیب بیوشیمیایی بذر ذرت

بذر بالغ ذرت از 75-70 درصد نشاسته، 10-8 درصد پروتئین و 5-4 درصد چربی تشکیل شده است. با این وجود، تفاوت زیادی در درصد نسبی این اجزا در بین بخش‌های مختلف بذر وجود دارد (جدول 1-1). همان طور که دیده می‌شود بخش اعظم آندوسپرم (تقریباً 90 درصد) از نشاسته تشکیل شده است درحالیکه جنین از سطوح بالایی از چربی (تقریباً 33 درصد) و پروتئین (تقریباً 18 درصد) تشکیل شده است (بی‌نام، 2008).

جدول 1-1- درصد نسبی بخش‌های تغذیه‌ای در قسمت‌های مختلف بذر ذرت (بی‌نام، 1992).

بخش تغذیه‌ای	جنین	آندوسپرم	پریکارپ (پوسته بذر)
پروتئین	18/4	8/0	3/7
فیبر	8/8	2/7	86/7
چربی	33/2	0/8	1/0
نشاسته	8/3	87/6	7/3
قند	10/8	0/62	0/34

1- Pop corn
2- Floury corn
3- Sweet corn
4- Waxy corn
5- Pod corn

1-1-3-1-4- پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ذرت

پروتئین‌های ذخیره‌ای دسته‌ای از پروتئین‌ها هستند که به هنگام رشد بذر تجمع یافته و بعداً در طی دوره جوانه‌زنی به عنوان منبع نیتروژن، توسط جنین استفاده خواهد شد. البته پروتئین‌های ذخیره‌ای منحصراً در بذر وجود ندارند و ممکن است در ریشه یا ساقه هم تجمع یابند (شارما، 2005). T.B. Osborne (1859-1929) که به عنوان پدر شیمی پروتئین‌های گیاهی هم شناخته می‌شود، پروتئین‌ها را بر اساس قابلیت انحلال‌شان به چند دسته تقسیم می‌کند: آلبومین‌ها (محلول در آب)، گلوبولین‌ها (محلول در نمک‌های رقیق)، پرولامین‌ها (محلول در مخلوط آب و الکل) و گلوتلین‌ها (محلول در اسیدها یا بازهای ضعیف (شوری و هالفورد، 2002).

بذر ذرت شامل پروتئین‌های زیر می‌باشد: پرولامین‌ها یا همان زئین‌ها (حدود 50 درصد)، گلوتلین‌ها (35 درصد)، آلبومین‌ها (7 درصد)، گلوبولین‌ها (5 درصد) و غیرپروتئین‌ها (یا همان اسیدآمینه‌های آزاد 6 درصد) که از اینها، پرولامین‌ها و گلوتلین‌ها اختصاصی آندوسپرم می‌باشند (بی‌نام، 1992). دو دسته مهم از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ذرت عبارتند از: گلوبولین‌های ذخیره‌ای و زئین‌ها که در زیر به آنها اشاره می‌شود.

1-1-3-1-4-1- گلوبولین‌های ذخیره‌ای[1]

جنین و لایه آلورن بذر غلات حاوی پروتئین‌های ذخیره‌ای گلوبولین می‌باشند. در ذرت این پروتئین‌ها به خوبی شناخته شده‌اند؛ این گلوبولین‌های ذخیره‌ای در محلول‌های نمکی رقیق قابل حل بوده و ضریب رسوب[2] حدود هفت دارند. توالی آنها بسیار شبیه ویسیلین‌های[3] 7s در لگوم‌ها و دیگر دولپه‌ای‌ها می‌باشد. در آندوسپرم حداقل برخی از غلات (نظیر گندم، برنج و یولاف) گلوبولین‌های ذخیره‌ای 11-12s وجود دارد. این پروتئین‌ها

1- Storage globulins
2- Sedimentation coefficient
3- Vicilins

شباهت زیادی (هم از نظر داشتن دو زیرواحد اسیدی و بازی که با یک پیوند دی‌سولفیدی بهم متصلند و هم از نظر ساختارهای شش‌تایی[1]) به لگومین‌های از نوع گلوبولین گیاهان دولپه‌ای دارند (شوری و هالفورد، 2002).

1-1-3-1-4-2- زئین‌ها

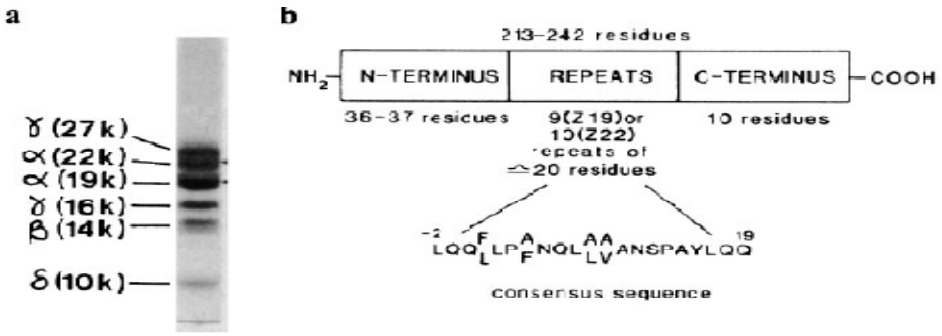
زئین‌ها در واقع پرولامین‌های ذرت می‌باشند. جز برنج و یولاف، عمده پروتئین ذخیره‌ای بذر غلات، پرولامین‌ها می‌باشند. این نامگذاری بیشتر به دلیل غنی بودن آنها از اسیدآمینه پرولین و آمید نیتروژن حاصل از گلوتامین می‌باشد. جرم مولکولی آنها بین 10 تا 100 کیلودالتون می‌باشد. پرولامین‌ها پپتید نشانه شبکه آندوپلاسمی خشن (بخش 1-1-3-5) را دارا می‌باشند. زنجیره پلی‌پپتیدی آنها برخلاف لگومین‌ها و ویسیلین‌ها (دو گروه عمده پروتئین‌های ذخیره‌ای دولپه‌ای‌ها) برش نمی‌یابد. پرولامین‌ها محصول فعالیت حدود 100-30 ژن می‌باشند و ژن‌های آنها برخلاف لگومین‌ها و ویسیلین‌ها، اینترون ندارند (شارما، 2005).

با مقایسه توالی آمینواسیدی، این احتمال داده می‌شود که پرولامین‌های Triticeae، زئین‌های نوع β، γ و δ ذرت، آلبومین‌های ذخیره‌ای 2s دولپه‌ای‌ها و... منشأ تکاملی مشترکی دارند. بنابراین این پروتئین‌ها باهم بعنوان ابرخانواده پرولامین غلات[2] خوانده می‌شوند (کریس و همکاران، 1985 به نقل از شوری و هالفورد، 2002).

پرولامین‌های ذرت (زئین‌ها) و دیگر غلات Panicoid (سورگوم و ارزن‌ها) از یک گروه اصلی یعنی آلفا-زئین‌ها و چند گروه کوچک (β، γ و δ-زئین‌ها) تشکیل شده است. مقایسه توالی نشان می‌دهد که β، γ و δ-زئین‌ها همگی جز ابرخانواده پرولامین‌ها می‌باشند. در مقابل، به نظر می‌رسد آلفا-زئین‌ها، به جز شباهتی که با آلفا-پرولامین‌های دیگر غلات Panicoid دارند، هیچ ارتباطی با دیگر پرولامین‌ها ندارند. آلفا-زئین‌ها شامل دو

1- Hexameric
2- Cereal Prolamin Superfamily

گروه اصلی با نامهای 19 کیلودالتون و 22 کیلودالتون می‌باشند. هر دو گروه شامل تکرارهایی از 20 اسید آمینه می‌باشند که تعداد این واحدها در 19 کیلو دالتون، نه عدد و در 22 کیلو دالتون، ده عدد می‌باشد (شکل2-1). آلفا-زئین‌ها که فراوان‌ترین نوع زئین بوده و 80 درصد از کل زئین‌ها را شامل می‌شوند، توسط یک خانواده بزرگ ژنی رمز می‌شوند درحالیکه بقیه زئین‌ها توسط یک یا دو ژن رمز می‌شوند. آلفا-زئین‌ها تنها شامل یک یا دو اسید آمینه سیستئین به ازای هر مولکول می‌باشند و در داخل بذر نیز به صورت مونومری یا الیگومری یافت می‌شوند، درحالیکه β، γ و δ-زئین‌ها همگی غنی از سیستئین بوده و به صورت پلی‌مری دیده می‌شوند (شوری و همکاران، 1995؛ هنری و کتل‌ول، 1996؛ شوری و هالفورد، 2002).



شکل 2-1- زئین‌های بذر ذرت. a- SDS-PAGE کل زئین‌های ذرت b- ساختار شماتیک آلفا-زئین‌های ذرت.

1-1-3-1-5- تولید و انباشت پروتئین‌های ذخیره‌ای

تصور بر این است که گلوبولین‌های ذخیره‌ای 7s (جنین و لایه آلورن) و 11s (آندوسپرم) غلات توسط همان مسیری تولید می‌شوند که در بذر دولپه‌ای‌ها وجود دارد. بنابراین آنها در شبکه آندوپلاسمی خشن همزمان با ترجمه وارد لومن می‌شوند. سپس از طریق دستگاه گلژی وارد واکوئل‌های ذخیره‌کننده پروتئین‌ها (متفاوت از واکوئل‌های تجزیه‌کننده[1]) می‌شوند. در ذرت، دیگر غلات Panicoid و برنج به نظر می‌رسد پرولامین‌ها مستقیماً

1- Lytic vacuoles