دانشکده کشاورزی
گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی

پایان نامه
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی گیاهی

عنوان

تهیه سازه RNAi اختصاصی بذر برای ژن‌های رمزگردان آلفا زئین ۱۹-kDa ذرت

استاد راهنما

دکتر بهرام باغبان کهنه روز

استاد مشاور

دکتر اشرف قلی زاده

پژوهشگر

میثم بسطامی

دی ۱۳۹۰

نام خانوادگی: بسطامی **نام**: میثم

عنوان پایان نامه: تهیه سازه RNAi اختصاصی بذر برای ژن‌های رمزگردان آلفازئین ۱۹-kDa ذرت

استاد راهنما: دکتر بهرام باغبان کهنه روز **استاد مشاور**: دکتر اشرف قلی زاده

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **دانشگاه**: تبریز **دانشکده**: کشاورزی

رشته: بیوتکنولوژی گیاهی **تعداد صفحات**: ۹۵ **تاریخ فارغ‌التحصیلی**: ۱۳۹۰/۱۰/۳

کلید واژه: خاموشی ژن، RNAi، کیفیت پروتئینی ذرت، آلفا زئین

چکیده

وجود سازه اختصاصی بذر برای تغییر ژنتیکی پروفایل پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه ذرت از مهمترین نیازهاست که در این تحقیق هدف گیری شده است. پروتئین‌های ذخیره‌ای غالب دانه ذرت، یعنی زئین‌ها که ۶۰٪ پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه ذرت را تشکیل می‌دهند ، از نظر محتوای اسیدآمینه‌های ضروری مانند لیزین و تریپتوفان دارای کمبود هستند که این امر منجر به کیفیت غذائی پائین دانه ذرت می‌شود. از طریق شناسایی موتانت‌ها یا دستکاری‌های ژنتیکی انجام شده، نشان داده شده است، دانه‌هایی که میزان پروتئین-های زئین آنها کاهش یافته، میزان کل اسیدآمینه‌های لیزین و تریپتوفان در آنها افزایش پیدا کرده است. زیرخانواده ۱۹-kDa از کلاس آلفا زئین ۴۰٪ از کل پروتئین‌های زئین را تشکیل می‌دهد و تقریبا بصورت کامل از اسیدآمینه‌های لیزین و تریپتوفان تهی است. هدف از اجرای این تحقیق تولید سازه پلاسمیدی RNAi (RNA interference) اختصاصی بذر برای خاموشی ژن‌های مربوط به زیرخانواده ۱۹-kDa از کلاس آلفا زئین از طریق فناوری RNAi می‌باشد تا از این طریق موجبات کاهش پروتئین‌های زئینی فقیر از اسیدآمینه‌های ضروری و به دنبال آن افزایش پلیوتروپیک پروتئین‌های غیر زئینی غنی از اسیدآمینه‌های لیزین فراهم گردد. بمنظور ساخت سازه مورد نظر، رشته همسو و ناهمسو ژن مورد نظر که هر دو تحت تنظیم یک راه‌انداز اختصاصی آندوسپرم بذر ذرت قرار دارند و توسط یک رشته غیر مشابه جدا می‌شوند در یک سازه با همدیگر همسانه سازی شدند. برای این کار در ابتدا قطعات مورد نظر شامل قطعه ۱۹Pro&S (رشته همسو حاوی راه‌انداز اختصاصی آندوسپرم بذر) و قطعه ۱۹AS (رشته ناهمسو) بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و پس از تایید اندازه آنها بوسیله الکتروفورز ژل آگارز، بصورت جداگانه در حامل همسانه سازی *p*GEM-T شرکت Promega همسانه‌سازی شدند. سپس قطعه ۱۹AS که تا پیش از این در حامل یاد شده همسانه‌سازی شده بود با برش توسط آنزیم‌های برشی *Sac* I و *Pst* I از حامل خارج و پس از استخراج از ژل آگارز بوسیله کیت استخراج از ژل شرکت Bioneer، در حامل همسانه‌سازی حاوی

قطعه ۱۹Pro&S تهیه شده از قبل و در پایین دست این قطعه و بصورت ناهمسو با آن درج شد. بعد از رونویسی این توالی تشکیل یک مولکول RNA دورشته‌ای سنجاق سری را می‌دهد که آغازگر فرایند RNAi است. در طول ساخت سازه مورد نظر صحت قطعات با استفاده از توالی یابی تایید شدند. آنالیزهای مقایسه‌ای کاست ساخته شده با نتایج ثبت شده با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی انجام گرفت.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه	۱
فصل اول: بررسی منابع	
۱-۱ اهمیت ذرت	۶
۱-۲ گیاهشناسی ذرت	۶
۱-۳ ارزش غذایی ذرت	۷
۱-۴ انواع ذرت	۷
۱-۵ کیفیت پروتئینی ذرت	۸
۱-۵-۱مشکلات جهش یافته‌های با لیزین بالا	۱۰
۱-۵-۲ ذرت با کیفیت پروتئینی بالا	۱۱
۱-۵-۳ مهندسی ژنتیک برای بهبود کیفیت پروتئینی دانه ذرت	۱۲
۱-۵-۳-۱ بیان ژن‌های هترولوگ	۱۲
۱-۵-۳-۲ مهندسی متابولیک مسیر اسیدآمینه‌های آزاد	۱۲
۱-۵-۳-۳ کاهش سنتز زئین از طریق RNAi	۱۳
۱-۶ پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه ذرت	۱۳
۱-۷ پرولامین‌ها (زئین‌ها)، پروتئین‌های ذخیره‌ای غالب دانه ذرت	۱۴
۱-۸ امکان افزایش محتوای لیزین ذرت و به دنبال آن بهبود پروفایل اسیدآمینه‌ای دانه ذرت از طریق کاهش بیان زئین‌ها	۱۵
۱-۹ آلفازئین‌ها و زیرخانواده ۱۹-kDa	۱۷
۱-۱۰ RNA interference (RNAi)	۱۸

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مطالعات بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرها ۲۳

۲-۲ استخراج DNA ژنومی ۲۵

۲-۳ بررسی کمیت و کیفیت DNA ۲۶

۲-۳-۱ روش اسپکتروفوتومتری ۲۶

۲-۳-۲ الکتروفورز ژل آگارز ۲۷

۲-۳-۲-۱ تهیه ژل آگارز ۰/۸٪ ۲۸

۲-۴ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۲۸

۲-۵ تخلیص DNA از ژل آگارز ۳۰

۲-۶ اتصال قطعات تخلیص شده به حامل همسانه سازی *p*GEM-T ۳۱

۲-۷ تراریختگی باکتری‌های *E. coli* سویه DH۵α با پلاسمیدهای نوترکیب ۳۳

۲-۷-۱ تهیه سلول‌های مستعد باکتریایی ۳۳

۲-۷-۲ تراریختگی باکتری‌های مستعد ۳۴

۲-۸ غربالگری باکتری‌های تراریخته ۳۴

۲-۹ تایید حضور قطعه در کلنی‌های سفید از طریق کلنی PCR ۳۵

۲-۱۰ استخراج پلاسمید ۳۵

۲-۱۰-۱ استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی ۳۵

۲-۱۰-۲ استخراج پلاسمید بوسیله کیت ۳۷

۲-۱۱ تایید حضور قطعه درجی از طریق هضم آنزیمی ۳۸

۲-۱۱-۱ هضم آنزیمی پلاسمید حاوی قطعه ۱۹Pro&S با آنزیم‌های *Hin*dIII و *Pst* I ۳۸

۲-۱۱-۱-۱ برش با آنزیم *Hin*dIII ۳۸

۲-۱۱-۱-۲ برش با آنزیم برشی *Pst* I ۳۹

۲-۱۱-۲ هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاوی قطعه ۱۹AS با آنزیم‌های *Sac* I و *Pst* I ۴۰

۲-۱۲ ریز همسانه سازی قطعه ۱۹AS در پلاسمید حاوی قطعه ۱۹Pro&S و قرار گیری آن بصورت ناهمسو در پایین دست قطعه ۱۹Pro&S ۴۱

۲-۱۳ هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاوی هر دو قطعه ۱۹Pro&S و ۱۹AS با آنزیم‌های *Hin*dIII و *Sac* I ۴۲

۲-۱۴ کشت گلیسرول ۱۵٪ باکتری ۴۲

۲-۱۵ توالی یابی ۴۳

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱ طراحی سازه RNAi ۴۵

۳-۲ مطالعات بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرها ۴۶

۳-۳ استخراج DNA ژنومی ۵۴

۳-۴ بررسی کمیت DNA با روش اسپکتروفوتومتری ۵۴

۳-۵ بررسی کیفیت DNA ژنومی استخراج شده با الکتروفورز ژل آگارز ۵۵

۳-۶ تکثیر قطعات مورد نیاز از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵۶

۳-۶-۱ تکثیر قطعه ۱۹Pro&S ۵۶

۳-۶-۲ تکثیر قطعه ۱۹AS ۵۷

۳-۷ اتصال قطعه تکثیر شده با واکنش PCR به حامل همسانه سازی *p*GEM-T ۵۸

۳-۸ تهیه سلول‌های مستعد باکتریایی ۵۸

۳-۹ تراریخته سازی باکتری‌های مستعد ۵۹

۳-۱۰ تایید حضور قطعه در کلنی‌های تراریخته از طریق کلنی PCR ۶۰

۳-۱۰-۱ بررسی حضور قطعه ۱۹Pro&S در کلنی‌های سفید ۶۰

۳-۱۰-۲ بررسی حضور قطعه ۱۹AS در کلنی‌های سفید ۶۱

۳-۱۱ استخراج پلاسمید از روش لیز قلیایی ۶۲
۳-۱۲ تایید حضور قطعه درجی از طریق هضم آنزیمی ۶۳
۳-۱۲-۱ هضم آنزیمی پلاسمید حاوی قطعه ۱۹Pro&S با آنزیم‌های *Hin*dIII و *Pst* I ۶۳
۳-۱۲-۲ هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاوی قطعه ۱۹AS با آنزیم‌های *Sac* I و *Pst* I ۶۶
۳-۱۳ ساخت کاست RNAi طراحی شده با برش و انتقال قطعه ۱۹AS به پلاسمید حاوی قطعه ۱۹Pro&S ۶۷
۳-۱۳-۱ هضم آنزیمی پلاسمید حاوی هر دو قطعه ۱۹Pro&S و ۱۹AS با آنزیم‌های *Hin*dIII و *Sac* I ۶۸
۳-۱۴ توالی یابی کاست RNAi ساخته شده ۶۹
نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۸۱

اشکال

۱-۹-۱ دندروگرام حاصل از همردیفی توالی‌های آلفازئین‌ها ۱۷

۱-۱۰-۱ مکانیزم مولکولی فرایند RNAi ۲۰

۲-۱-۱ آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه ۱۹Pro&S ۲۳

۲-۱-۲-آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه ۱۹AS ۲۴

۲-۳-۱ نشانگر وزن مولکولیDNA ۱kb ۲۷

۲-۶-۱- حامل همسانه‌سازی *p*GEM-T شرکت Promega ۳۲

۳-۱-۱ شمای کاست طراحی شده و چگونگی عملکرد آن ۴۶

۳-۲-۱ نتیجه بلاست رونوشت ژن az۱۹B۱ ۴۷

۳-۲-۲ شمای کاست RNAi طراحی شده در حامل *p*GEM-T ۵۰

۳-۲-۳ آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه ۱۹Pro&S ۵۱

۳-۲-۴ آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه ۱۹AS ۵۲

۳-۲-۵ نقشه برشی توالی ZMPMS۱ ۵۳

۳-۲-۶ توالی آغازگرها به همراه مکان‌های برشی گنجانده شده در آنها ۵۴

۳-۵-۱ الکتروفورز DNA ژنومی ۵۶

۳-۶-۱ تکثیر قطعه ۱۹Pro&S با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در یک گرادیان دمایی ۵۷

۳-۶-۲ تکثیر قطعه AS ۱۹با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در یک گرادیان دمایی ۵۷

۳-۱۰-۱ بررسی حظور قطعه ۱۹Pro&S از طریق کلنی PCR ۶۰

۳-۱۰-۲ بررسی حظور قطعه۱۹AS در دو کلنی سفید از طریق کلنی PCR ۶۱

۳-۱۱-۱ پلاسمیدهای استخراج شده به روش لیز قلیایی ۶۲

۳-۱۲-۱ نحوه قرار گیری قطعه ۱۹Pro&S به شکل مورد نظر در حامل همسانه سازی ۶۴

۳-۱۲-۲ هضم آنزیمی پلاسمید حاوی قطعه ۱۹Pro&S با آنزیم‌های *Hin*dIII و *Pst* I ۶۵

۳-۱۲-۳ برش پلاسمیدهای حاوی قطعه ۱۹AS با دو آنزیم *Sac* I و *Pst* I ۶۶

۳-۱۳-۱ مراحل ساخت کاست RNAi مورد نظر ۶۸

۳-۱۳-۲ هضم آنزیمی پلاسمید حاوی هر دو قطعه ۱۹Pro&S و ۱۹AS با آنزیم‌های *Hin*dIII ۶۹
و *Sac* I

۳-۱۴-۱ کروماتوگرام مربوط به توالی یابی کاست مورد نظر ۷۰

۳-۱۴-۲ همردیفی توالی مربوط به قطعه راه‌انداز و رشته همسو (قطعه ۱۹Pro&S) از کاست ۷۲
مورد نظر با توالی X۵۳۵۸۲ بوسیله نرم افزار Clustal X ۲/۰/۱۱

۳-۱۴-۳ همردیفی آغازگر رفت برای تکثیر قطعه ۱۹Pro&S با توالی کاست ۷۴

۳-۱۴-۴ همردیفی آغازگر برگشت برای تکثیر قطعه ۱۹Pro&S با توالی کاست ۷۴

۳-۱۴-۵ همردیفی قطعه ۱۹AS در کاست با توالی X۵۳۵۸۲ ۷۵

۳-۱۴-۶ توالی کامل کاست ساخته شده به همراه مکان‌های برشی موجود در آن ۷۶

۳-۱۴-۷ بلاست توالی کاست با ژنوم ذرت ۷۷

جداول

جدول ۲-۴-۱- مواد تشکیل دهنده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۲۹

جدول ۲-۴-۲- نحوه تنظیم چرخه‌های دمایی واکنش PCR ۳۰

جدول ۲-۶-۱- مواد واکنش اتصال ۳۲

جدول ۲-۱۱-۱- شرایط واکنش برش با آنزیم برشی *Hin*dIII ۳۹

جدول ۲-۱۱-۲- شرایط واکنش برش با آنزیم برشی *Pst* I ۴۰

جدول ۲-۱۱-۳- شرایط واکنش برش با آنزیم‌های برشی *Pst* I و *Sac* I ۴۰

جدول ۲-۱۲-۱- شرایط واکنش برش با آنزیم برشی *Sac* I ۴۱

جدول ۲-۱۲-۲- واکنش اتصال وکتور خطی شده حاوی قطعه ۱۹Pro&S و قطعه ۱۹AS ۴۲

پیوست‌ها

۱ بافر استخراج CTAB (۱X) ۹۲

۱-۱ محلول Tris-HCl (pH=۸) ۲M ۹۲

۱-۲ محلول EDTA (pH=۸) ۰/۵M ۹۲

۱-۳ محلول NaCl ۵M ۹۲

۱-۴ محلول CTAB دو درصد ۹۲

۲ بافر بارگذاری ۹۳

۳ بافر TBE (۵X) ۹۳

۴ محلول اتیدیوم برماید ۱۰mg/ml ۹۳

۵ محیط LB مایع ۹۳

۶ محلول TSS (۲X) ۹۳

۷ محیط کشت LB/agar/ampicillin/X-gal/IPTG ۹۴

۷-۱ X-gal دو درصد ۹۴

۷-۲ IPTG ۱۰۰ میلی مولار ۹۴

۸ محیط کشت LB/ampicillin مایع ۹۴

۹ بافر معلق کننده ۹۴

۱۰ بافر لیز کننده ۹۵

۱۰-۱ SDS ٪۱۰ ۹۵

۱۰-۲ NaOH ۵ نرمال ۹۵

۱۱ بافر خنثی کننده ۹۵

۱۲ گلیسرول ٪۵۰ ۹۵

مقدمه

علیرغم موفقیت‌های انقلاب سبز[۱] در نیمه دوم قرن ۲۰ در افزایش میزان محصولات کشاورزی، تولید پایدار آنها و افزایش درآمد در این حوزه، رشد سریع جمعیت و استفاده مداوم از مواد شیمیایی کشاورزی مانند حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، قارچکش‌ها و کودها، ایمنی و سلامت محصولات کشاورزی را با محدودیت مواجه ساخته است. بر اساس گزارش سازمان ملل تولید غذا بایستی تا سال ۲۰۳۰ ، ۵۰ ٪ افزایش یابد تا بتواند پاسخگوی درخواست روزافزون رشد جمعیت جهانی باشد (بروچی و همکاران، ۲۰۱۱). رفع این مشکل به همراه کاهش هزینه‌های تولید، مبارزه با بحران گرسنگی و فقر، تولید غذای سالم، ایمن و با کیفیت غذایی بالا، پاکسازی و حفظ محیط زیست و تولید و معرفی محصولات غذایی جدید، نیاز مبرمی را به توسعه تکنولوژی‌های نوین از جمله زیست فن‌آوری[۲] و دستکاری ژنتیکی به وجود آورده است. بیوتکنولوژی نوین عبارت از کاربرد فن‌آوری‌های برتر در موجودات زنده و سیستم‌های بیولوژیکی به منظور توسعه محصولات جدید و یا تغییر فرایندهای موجود در آنها برای رفع نیازهای بشر و محیط زیست می‌باشد. همچنین بیوتکنولوژی عرصه‌های جدیدی را در حوضه سلامت با ارائه روش‌های جدید در قرنطینه، تشخیص، جلوگیری و درمان بیماری‌ها گشوده است. در طول دهه گذشته تولید محصولات تراریخته[۳] بطرز شگرف و قابل توجهی افزایش یافته و جایگاه مهم و استراتژیکی را هم در کشورهای توسعه یافته و هم در کشورهای در حال توسعه کسب کرده است. سال ۲۰۱۱، شانزدهمین سال تولید تجاری (از سال ۱۹۹۶) محصولات تراریخته در دنیاست. در حال حاضر ۲۹ کشور دنیا در حال تولید تجاری محصولات تغییر یافته ژنتیکی در دنیا هستند که با سطح زیر کشت ۱۴۸ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۰، در مقایسه با مساحت ۱/۷ میلیون هکتار در سال ۱۹۹۹، یک افزایش ۸۷ برابری را نشان می‌دهد که سریع‌ترین رشد را در طول تاریخ تجارت کشاورزی به خود اختصاص داده است (جیمز، ۲۰۱۰). ایالات متحده امریکا به تنهایی ۴۵٪ از سطح زیر کشت جهانی محصولات تراریخته را با ۶۶/۸ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۰ در اختیار داشته است. سطح زیر

۱. Green revolution

۲. Biotechnology

۳. Genetically modified crops

کشت چهار محصول اصلی GM در دنیا شامل: ۵۰٪ سویا (۷۳/۳ میلیون هکتار)، ۳۱٪ ذرت (۴۶/۸ میلیون هکتار)، ۱۴٪ پنبه (۲۱ میلیون هکتار) و ۳٪ کانولا (۷ میلیون هکتار) است (ادنل، ۲۰۱۱). صنعت بیوتکنولوژی امروزه به چنان حوزه مهمی در صنعت جهانی تبدیل شده است که ارزش بازار جهانی آن در سال ۲۰۱۰ بالغ بر ۵۰۰ میلیارد دلار برآورد شده است، در حالی که این مقدار در سال ۱۹۹۹، ۵۴ میلیارد دلار و در سال ۲۰۰۳، ۱۰ میلیارد دلار بوده است (بروچی و همکاران، ۲۰۱۱؛ اندرو، ۲۰۰۳).

بر اساس آخرین آمار تقریبا ۹۲۵ میلیون انسان در دنیا (۱۹ میلیون نفر در کشورهای توسعه یافته و ۹۰۶ میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه) در سال ۲۰۱۰ دچار سوء تغذیه هستند (FAO[۱] و WFP[۲]، ۲۰۱۰) که در این میان کمبود پروتئین در رژیم غذایی یکی از مهمترین عوامل موثر می‌باشد. سوء تغذیه ناشی از کمبود پروتئین مهلک‌ترین نوع سوء تغذیه است و از هر چهار کودک در دنیا یکی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (WHO[۳]، ۲۰۰۶). اکثر گیاهان بر اساس نیاز انسان‌ها و حیوانات دارای پروفایل پروتئینی فقیری از نظر محتوای اسیدآمینه‌های ضروری هستند. غلات (ذرت، گندم، برنج و ...) محتوی لیزین پائینی هستند که این امر لیزین را به مهمترین اسیدآمینه ضروری تبدیل کرده است چراکه پائین‌ترین میزان را در دانه‌های غلات که بخش اعظم تولید جهانی را شامل می‌شوند داراست. در سطح جهانی ذرت ۱۵٪ پروتئین و ۲۰٪ کالری رژیم غذایی را تأمین می‌کند (سوفی و همکاران، ۲۰۰۹). متاسفانه ارزش غذایی ذرت بخاطر فقیر بودن از نظر محتوای اسیدآمینه‌های ضروری[۴] لیزین، تریپتوفان و متیونین ناشی از سهم نسبتا بالای پرولامین‌ها[۵] در پروتئین‌های ذخیره‌ای ذرت[۶] که ذاتا از نظر این اسیدآمینه‌های ضروری تهی هستند، پائین است. بنابراین نیاز به ایجاد لاین‌های ذرت غنی از لیزین ضروری به نظر می‌رسد. برای افزایش ارزش

۱. Food and Agriculture Organization
۲. World Food Programme
۳. World Health Organization
۴. Essential amino acid
۵. Prolamins
۶. Maize storage proteins

بیولوژیکی ذرت از سال ۱۹۶۴ که یک لاین جهش یافته طبیعی تحت عنوان اوپک ۲[۱] که حاوی ۶۹٪ لیزین بیشتری بود شناسایی شد تاکنون تلاش‌های زیادی در این زمینه صورت گرفته است. به دنبال کشف جهش یافته اوپک ۲ و بخاطر کیفیت پروتئینی بالای آن تلاش‌های گسترده‌ای در مدت زمانی بیش از ۴۰ سال در "CIMMYT"[۲] و دیگر نقاط جهان از طریق روش‌های اصلاح نباتات رایج[۳] برای ایجاد لاین ذرتی از لاین-های جهش یافته طبیعی اوپک ۲ که دارای محتوای لیزین و تریپتوفان بالایی بوده و از توان رقابت با ذرت نرمال برخوردار باشد صورت پذیرفت و منتج به تولید واریته‌های با کیفیت پروتئینی بالا برای مصرف انسان و دام در کشورهای در حال توسعه شد (پراسانا و همکاران، ۲۰۰۱). با ورود مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری در عرصه تحقیقات کاربردی نیز تلاش‌هایی در این زمینه صورت گرفته است. از جمله مثال‌های موفق در این مورد می‌توان به معرفی یک لاین ذرت تراریخت با لیزین بالا (LY۰۳۸) از طریق بیان ژن دی هیدروپیکولینات سنتاز[۴] غیر حساس به مهار بازخوردی[۵] از باکتری کورینه باکتریوم[۶] تحت راه‌انداز ژن گلوبولین-۱ توسط شرکت مونسانتو[۷] در سال ۲۰۰۶ اشاره کرد (سوفی و همکاران، ۲۰۰۹). آنزیم دی هیدروپیکولینات سنتاز از آنزیم‌های کلیدی در مسیر سنتز اسیدآمینه‌های ضروری در گیاهان عالی است. در این لاین اسیدآمینه آزاد لیزین (بر اساس وزن خشک) از ppm ۲۸۰۰-۲۵۰۰ در ذرت معمولی به ppm ۵۳۰۰-۳۵۰۰ افزایش پیدا کرده است. مشخص شده است که میزان بالای لیزین در جهش یافته اوپک ۲ ناشی از کاهش کلی سنتز زئین‌های فقیر از نظر این اسیدآمینه‌های ضروری و افزایش پلیوتروپیک تجمع پروتئین‌های غیر زئینی غنی از اسیدآمینه‌های ضروری لیزین و تریپتوفان است (سوفی و همکاران، ۲۰۰۹). با آگاهی از ژنتیک مولکولی زئین‌ها، بکارگیری یک روش جایگزین و موثر زیست فن‌آوری برای بهبود کیفیت پروتئینی ذرت، از طریق کاهش سنتز پروتئین‌های زئینی فقیر از اسیدآمینه‌های ضروری بواسطه فن‌آوری

---

۱. Opaque 2
۲. International Maize and Wheat Improvement Center
۳. Conventional breeding
۴. Dihydropicolinate synthase
۵. Feedback inhibition
۶. Corynebacterium
۷. Monsanto

RNAi[1] و به دنبال آن افزایش پلیوتروپیک پروتئین‌های غیر زئینی غنی از اسیدآمینه‌های لیزین، می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. برای نیل به این هدف، تولید سازه اختصاصی مورد نیاز بعنوان اولین گام در این تحقیق هدف گیری شده است.

[1]. RNA interference

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱ اهمیت ذرت

ذرت (Zea mays L.) گیاهی است یکساله که به عنوان غذای انسان و دام از ده‌ها هزار سال پیش مورد توجه واقع شده است و امروزه بصورت گسترده در سرتاسر جهان کشت می‌شود. موارد استفاده متعدد و گسترده ذرت متاثر از گذشته طولانی آن در استفاده از آن به عنوان یک غله اهلی و همچنین دارا بودن یک مخزن ژن گسترده است (گوین، ۲۰۰۳). تولید جهانی ذرت در سال ۲۰۰۹، ۸۱۷ میلیون تن بوده (بیش از برنج و گندم) و بیش از ۱۵۹ میلیون هکتار از اراضی جهان به کشت ذرت اختصاص یافته است. آمریکا ۴۰٪ تولید جهانی ذرت را در اختیار دارد و ذرت گسترده‌ترین محصول تولید شده در این کشور با تولید ۳۳۲ میلیون تن در سال است. در سال ۲۰۰۹، ذرت تراریخته[۱] بصورت تجاری در ۱۱ کشور جهان شامل آمریکا (جایی که ۸۵٪ از کل محصول ذرت تولید شده تراریخته است)، آرژانتین (۸۳٪)، آفریقای جنوبی (۵۷٪)، کانادا (۸۴٪)، فیلیپین (۱۹٪)، اسپانیا (۲۰٪) تولید شده است (http://www.gmo-compass.org/). ذرت یکی از مهمترین غلات در ایران است و برای مصرف علوفه‌ای و دانه‌ای کشت می‌شود. در سال ۲۰۱۰ تقریبا ۳۲۰ هزار هکتار از اراضی ایران با تولید ۲/۵۶ میلیون تن و با متوسط تولید ۸ تن در هکتار به کشت ذرت اختصاص یافته است (نورکی و همکاران، ۲۰۱۱). در حال حاضر ذرت گسترده‌ترین غله‌ی تولیدی در جهان است که نه فقط برای غذای انسان و دام، بلکه برای تولید بیو اتانول[۲]، نشاسته صنعتی، روغن و همچنین اخیرا به عنوان کارخانه‌ای برای تولید ترکیبات مولکولی با ارزش مثل پروتئین‌های دارویی نوترکیب[۳] و ترکیبات شیمیایی خاص استفاده می‌شود (نکوی و همکاران، ۲۰۱۰).

۱-۲ گیاهشناسی ذرت

ذرت گیاه یکساله است که ارتفاع بوته آن در بعضی موارد بیش از ۵ متر نیز بوده و در عرض مدت سه

۱. Transgenic maize

۲. Bioethanol

۳. Recombinant pharmaceutical proteins

تا چهار ماه به رشد مطلوب می‌رسد و هم‌چنین گیاهی است یک پایه[۱] بدین معنی گل‌های نر و ماده از هم جدا ولی بر روی یک پایه قرار دارند. گل‌های ماده ذرت از جوانه‌ای که در قائده غلاف برگ وجود دارد تولید می‌شود. اندام زایشی نر در انتهای ساقه اصلی بصورت خوشه و خوشه‌های فرعی قرار دارد که روی این خوشه یا خوشه‌های فرعی دو سنبلچه یکی بلند و دیگری کوتاه بطور منظم قرار گرفته است. هر سنبلچه[۲] دارای دو گل و هر گل دارای سه پرچم[۳] می‌باشد. دانه ذرت میوه ایست گندمه و پوسته آن فقط شامل پوسته میوه است. تعداد بلال‌های ذرت در هر گیاه بسته به ژنوتیپ‌های مختلف کاملا متفاوت است و بین ۱ تا ۱۲ عدد نوسان دارد. ذرت دارای ساقه راست و مستقیم بوده و برگ‌های آن مثل سایر غلات نواری است و شامل پهنک برگ و غلاف[۴] می‌باشد (کریمی، ۱۳۷۵).

۱-۳ ارزش غذایی ذرت

دانه بدون آب ذرت حاوی ۷۷٪ نشاسته[۵]، ۲٪ قند، ۹٪ پروتئین، ۵٪ چربی، ۵٪ پنتوزان[۶] و ۲٪ خاکستر و تیامین است. میزان درصد پروتئین و چربی ارقام مختلف ذرت کاملا متغیر است. حداکثر پروتئین ممکن است به ۱۵٪ و حداقل آن به ۶٪ برسد (کریمی، ۱۳۷۵).

۱-۴ انواع ذرت

ارقام مختلف ذرت که بر حسب خواص دانه به وسیله متخصصین نامگذاری شده‌اند عبارت‌اند از:

- ذرت سنگی، ذرت بلوری، ذرت سخت — Zea mays var. indurate (Flint corn)
- ذرت دندان اسبی، دندانی — Zea mays var. indentata (Dent corn)
- ذرت پستانی، ذرت بلال، پاپ کورن — Zea mays var. everta (Pop corn)

۱. Monoecious
۲. Spikelet
۳. Stamen
۴. Pod
۵. Starch
۶. Pentosan

- ذرت شیرین، ذرت قندی — Zea mays var. saccharata (Sweet corn)
- ذرت آردی، ذرت نشاسته‌ای، ذرت نرم — Zea mays var. amylacea (Flour corn)
- ذرت مومی — Zea mays var. ceratina (Waxy corn)
- ذرت پیله‌ای، ذرت غلافی — Zea mays var. tunicata (Pod corn)

۱-۵ کیفیت پروتئینی ذرت

پروتئین‌ها همانطور که از ریشه یونانی اسم آنها که proteios و به معنی اولیه و اصلی پیداست، به عنوان مهمترین ماده غذایی انسان و حیوانات شناخته می‌شوند. در مقایسه با گوشت، تولید پروتئین‌های گیاهی از لحاظ اقتصادی ارزان‌تر است (سان و لو، ۲۰۰۴). میزان اسیدآمینه‌های ضروری[۱] در پروتئین‌ها بیانگر کیفیت غذایی آنهاست. در انسان هشت عدد از بیست اسیدآمینه استاندارد[۲] بخاطر اینکه بدن قادر به سنتز آنها نیست و بایستی از رژیم غذایی تامین شوند تحت عنوان اسیدآمینه‌های ضروری شناخته می‌شود که عبارتند از: لوسین، ایزولوسین، والین، فنیل آلانین، ترئونین، متیونین، تریپتوفان و لیزین. لیزین به عنوان مهمترین اسیدآمینه ضروری شناخته می‌شود چراکه پایین‌ترین میزان را در دانه‌های غلات که بخش اعظم تولید جهانی را شامل می‌شوند داراست (یوفاز و جلیلی، ۲۰۰۸). غلات منبع اصلی تامین پروتئین رژیم غذایی انسان‌ها و دام‌ها محسوب می‌شوند (شوری، ۲۰۰۷). وقتی گیاهان به عنوان منبع اصلی تامین پروتئین رژیم غذایی انسان و دام‌ها در نظر گرفته می‌شوند اکثر پروتئین‌های گیاهی بخاطر کمبود میزان اسیدآمینه‌های ضروری در آنها از کیفیت غذایی پایینی برخوردارند که در میان آنها سطح لیزین و تریپتوفان بصورت ویژه در ذرت پایین است. ذرت در سطح جهانی ۱۵٪ پروتئین رژیم غذایی را تامین می‌کند (سوفی و همکاران، ۲۰۰۹). پروتئین‌های غالب موجود در بافت تخصص یافتهٔ آندوسپرم[۳] ذرت اکثرا از نظر محتوای اسیدآمینه‌های ضروری بویژه لیزین، تریپتوفان و متیونین فقیر هستند و این امر منجر به ارزش غذایی و

۱. Essential amino acids
۲. Standard amino acids
۳. Endosperm

کیفیت پروتئینی پایین دانه ذرت شده است. پروتئین‌های زئین[۱] که ۶۰٪ کل پروتئین‌های بذر ذرت را تشکیل می‌دهند، غنی از اسیدآمینه‌هایی مانند گلوتامین، پرولین، آلانین و لوسین هستند در حالی که تقریبا بصورت کامل از اسیدآمینه‌های ضروری مانند لیزین و تریپتوفان تهی هستند (کولمن و لارکینز، ۱۹۹۹). با توجه به اطلاعات فوق نقطه ضعف پروتئین بذری ذرت مربوط به فقر شدید اسیدآمینه‌های لیزین ، تریپتوفان و متیونین می‌باشد. این اسیدآمینه‌های ضروری برای انسان و دام‌های غیر نشخوارکننده بخصوص در کشورهای توسعه یافته که ۷۸٪ کل تولید ذرت برای تغذیه این دام‌ها استفاده می‌شود، حائز اهمیت زیادی خواهند بود. در ذرت روش‌های متعددی برای حل این مشکل بکار گرفته شده است. برای افزایش ارزش بیولوژیکی ذرت در اوایل سال ۱۹۹۰ تلاش دانشمندان برای پیدا کردن لاین‌های ذرتی که دارای کیفیت بهتری از محتوای اسیدآمینه‌های موجود در آندوسپرم باشند، معطوف شد. دو مشکل عمده در این مسیر وجود داشت: نخست آنکه تا آنموقع هیچ ژنی که بصورت اختصاصی پروفایل اسیدآمینه های پروتئین‌های ذرت را تحت کنترل داشته و قابلیت استفاده در برنامه‌های اصلاحی را داشته باشد، پیدا نشده بود. دوم اینکه نبود یک سیستم ژنتیکی ساده از بکار بردن برنامه‌های تلاقی برگشتی[۲] برای بهبود کیفیت پروتئینی در ذرت جلوگیری می‌کرد (سوفی و همکاران، ۲۰۰۹). مرتز و همکاران (۱۹۶۴) یک لاین جهش یافته طبیعی تحت عنوان اوپک ۲[۳] را در ذرت شناسایی کردند که حاوی ۶۹٪ لیزین بیشتری بود. این گزارش مهم با شناسایی جهش یافته فلوری ۲[۴] که محتوای مشابهی از نظر اسیدآمینه لیزین با جهش یافته اوپک۲ داشت (نلسون و همکاران، ۱۹۶۵) و کشف تعداد دیگری از جهش یافته‌های با لیزین بالا ادامه پیدا کرد (دالبی و تاسی، ۱۹۷۵؛ تاسی و همکاران، ۱۹۷۸؛ سالامینی و همکاران، ۱۹۷۹؛ میسرا و همکاران، ۱۹۷۵؛ ما و نلسون، ۱۹۷۵). این گونه به نظر می‌رسد که میزان بالای لیزین در دو جهش یافته اوپک ۲ و فلوری ۲ ناشی از کاهش کلی سنتز زئین‌های فقیر از نظر این اسیدآمینه ضروری و افزایش تجمع پروتئین‌های غیر زئینی[۵]

۱. Zein proteins
۲. Backcross
۳. opaque 2
۴. floury 2
۵. Non-zein proteins

غنی از اسیدآمینه ضروری است.

۱-۵-۱ مشکلات جهش یافته‌های با لیزین بالا

اگرچه جهش یافته‌های با لیزین بالا اشتیاق و امیدواری زیادی را در بین محققان به خاطر امکان استفاده گسترده از آنها به عنوان ذرت‌های با کیفیت پروتئینی بالا پدید آورد، اما کم کم اثرات منفی پلیوتروپیک این جهش یافته‌ها آشکارتر شد. این صفات نامطلوب یک عامل محدود کننده در مقبولیت و استفاده گسترده از این جهش یافته‌ها بود (لادردال، ۲۰۰۲). گرچه جهش یافته‌های پروتئین‌های آندوسپرم مانند اوپک۲ و فلوری۲ بطرز مناسبی پروفایل اسیدآمینه‌های دانه ی ذرت را تغییر می‌دادند، اما همچنانکه در مورد اکثر جهش یافته‌ها انتظار می‌رود، ویژگی‌های نامطلوبی را نیز به همراه داشتند. این صفات نامطلوب شامل کاهش عملکرد محصول، استحکام کم دانه و آندوسپرم نشاسته‌ای[۱] که آب را در خود نگه می‌دارد، بود (تورو و همکاران، ۲۰۰۳). این صفات نامطلوب باعث ایجاد یک آندوسپرم نرم و نشاسته‌ای می‌گردد که به کندی آب خود را از دست داده و باعث افزایش حساسیت دانه به آفات و بیماری‌ها و افزایش آسیب پذیری آن می‌شود، ایجاد پریکارپ ضخیم، بر میزان محصول اثر منفی گذاشته و موجب از دست رفتن بیشتر محصول دانه‌ای می‌شود (سوفی و همکاران، ۲۰۰۹). از آنجا که دانه‌های ذرت نیز در این جهش یافته‌ها بخاطر بسته بندی سست نشاسته با مقدار زیادی از حباب‌های هوا همراه بوده و از تراکم کمتری برخوردار شده است، از این طریق منجر به کاهش عملکرد در حد ۱۰٪ و یا بیشتر می‌گردد (سینگ و ونکاتش، ۲۰۰۶).

۱-۵-۲ ذرت با کیفیت پروتئینی بالا[۲]

جهش یافته‌های اوپک۲ بخاطر اهمیت فوق‌العاده کیفیت پروتئینی، محققان را در "CIMMYT"[۳] و

[۱]. Starchy endosperm

[۲]. Quality Protein Maize (QPM)

[۳]. International Maize and Wheat Improvement Center