تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال چهارم، شماره دوازدهم، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۲۹-۳۶
دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۳۶ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۲/۰۶

مقایسه الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گلوتلین، گلوبولین، آلبومین و پرولامین در بذر چهار رقم برنج (*Oryza sativa* L.)

علی اکبر احسانپور [۱]*، لیلا عرب [۲]، شکوفه حاجی هاشمی [۲] و محبوبه ریاحی [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

شناسایی و تفکیک رقم‌های برنج، کمک مفیدی به بهبود کیفیت غذایی این محصول می‌نماید. در مطالعه حاضر، چهار رقم برنج به نام‌های لنجانی، فریدون‌کنار، طارم و هندی از نظر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گلوتلین، گلوبولین، پرولامین و آلبومین بررسی شدند. گلوتلین‌ها و گلوبولین‌های برنج نوارهای پروتئینی نسبتاً زیادی نشان داد در حالی‌که آلبومین‌ها باند کمتری داشتند. کمترین مقدار پروتئین و تعداد نوار مربوط به پرولامین‌ها بود. روابط خویشاوندی پروتئین‌های گلوتلین و گلوبولین نشان داد که رقم‌های لنجانی و فریدون‌کنار بسیار نزدیک به یکدیگر و رقم هندی (سرآشپز) دورتر از این دو رقم و رقم طارم حد واسط بین رقم هندی و دو رقم دیگر قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: برنج، پروتئین، الکتروفورز

مقدمه

برنج یکی از غلات مهم از نظر اقتصادی است که منبع غذایی نیمی از مردم دنیا را تشکیل می‌دهد (Bellon *et al.*, 1998). برنج متعلق به خانواده Poaceae و جنس *Oryza* با ژنوم دیپلویید ($2n$) و ۲۴ کروموزوم است. صد گرم برنج به طور متوسط دارای ۳۳۰ کیلو کالری انرژی، ۷۹ گرم کربوهیدرات، ۸ گرم پروتئین و ۰/۶۹ گرم چربی است (Shewry *et al.*, 1990). پروتئین اصلی برنج گلوتلین و مقدار بسیار کمتری پرولامین است (Ravi *et al.*, 2003). گزارشات نشان می‌دهد گلوتلین برنج بیش از ۸۰ درصد و پرولامین برنج کمتر از ۵ درصد پروتئین‌های بذر برنج را تشکیل می‌دهد (Juliano, 1972).

اصولاً ترکیب اسیدهای آمینه در ذخایر پروتئینی دانه با ترکیب آنها در برگ و سایر بافت‌های رویشی متفاوت است (Shiraishi *et al.*, 1986). پروتئین‌های دانه معمولاً در یک یا بیش از سه اسید آمینه اصلی یعنی گلایسین، تریپتوفان و متیونین بسته به رقم و گونه گیاهی کمبود دارند. وجود این سه اسید آمینه در رژیم غذایی انسان ضروری و لازم است. بنابراین، اگر دانه‌ها

* ehsanpou@sci.ui.ac.ir

به‌عنوان تنها منبع پروتئینی به‌کار روند ارزش غذایی و زیستی پروتئین دانه برای انسان کمتر از پروتئین حیوانی خواهد بود.

پروتئین‌های بذر برنج را می‌توان به چهار گروه اصلی تقسیم نمود (Usman *et al*., 2009; Kawakatsu *et al*., 2010). این پروتئین‌ها عبارتند از:

۱- آلبومین‌ها: این گروه در اسیدیته خنثی یا اندکی اسیدی در آب حل شده و با حرارت نیز منعقد می‌شوند، آنزیم‌ها و سفیده تخم‌مرغ عمدتاً از آلبومین‌ها هستند.

۲- گلوبولین‌ها: این پروتئین‌ها در نمک حل می‌شوند و توسط حرارت به آسانی منعقد نمی‌شوند. دانه بقولات معمولاً غنی از گلوبولین هستند (گلایسین در سویا).

۳- گلوتلین: این گروه از پروتئین‌ها در آب حل نشده اما در محلول بازهای قوی حل می‌شوند. گندم دارای گلوتن زیادی است که سبب افزایش ظرفیت خمیر نان از نظر تورم و چسبندگی می‌شود.

۴- پرولامین‌ها: در الکل ۷۰ تا ۹۰ درصد قابل حل هستند. دانه‌های غلات مانند گندم، جو، جو دوسر، ذرت، برنج و سوگوم غنی از پرولامین‌ها بوده، منبع نیتروژن خوبی برای رشد گیاهچه هستند (پروتئین زئین در دانه ذرت). در برنج حدود ۳۵ درصد از پروتئین کل ذخیره‌ای بذر را تشکیل می‌دهد (Shewry *et al*., 1990). در برنج سه گروه پرولامین بر اساس وزن مولکولی آن‌ها شناخته شده است که عبارتند از: پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۱۰، ۱۳ و ۱۶ کیلو دالتون. خانواده‌های پرولامین اصلی در برنج به نام‌های 3722 دارای ۲۰ عضو و خانواده 3139 با هفت عضو هستند. تمام پرولامین‌های برنج توسط ژن‌های تک اگزونی کد می‌شوند (Yamagata *et al*., 1982). به‌طور کلی، غلات از نظر پرولامین و گلوتلین غنی بوده، در این میان، *Avena sativa* با ترکیب پروتئینی که ۸۰ درصد آن گلوبولین است، یک استثناء است. برخلاف غلات، حبوبات از نظر گلوبولین‌ها و آلبولین‌ها غنی هستند که این امر مبیّن کیفیت غذایی بهتر آنهاست (Peter *et al*., 1995).

در هنگام جوانه زدن، پروتئین‌ها و به اسیدهای آمینه سازنده تجزیه می‌شوند، سپس به محور جنین منتقل شده، در آنجا با ترکیب جدیدی کنار هم قرار گرفته و پروتئین جدیدی را تشکیل می‌دهند که از نظر ترکیب اسیدهای آمینه متعادل است. به همین دلیل جوانه‌های بذر دارای کیفیت پروتئینی بالا و عالی بوده، به میزان زیادی در غذای انسان به‌کار می‌روند (Yamagata *et al*., 1982).

معمولاً از روش SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis)، برای جداسازی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر استفاده می‌شود (Ahmad and Slinkard, 1992). روش الکتروفورز با ژل پلی اکریلامید برای جداسازی و تفکیک پروتئین‌های بذر پیش از این نیز برای جداسازی پروتئین‌های بذر پسته (احسانپور و همکاران، ۱۳۸۹) و چند گیاه دیگر (Ravi *et al*., 2003) استفاده شده است. تاکنون مطالعاتی در زمینه تغییر الگوی پروتئین‌های برنج‌های پاکستان انجام شده است ولی بررسی پروتئین‌های اختصاصی برنج به این منظور بررسی نشده است. بنابراین، هدف این مطالعه، بررسی الگوی پروتئین‌های نسبتاً اختصاصی در بذر برنج شامل گلوتلین، گلوبولین، آلبومین و پرولامین در چهار رقم برنج با استفاده از SDS PAGE است. اطلاعات حاصل

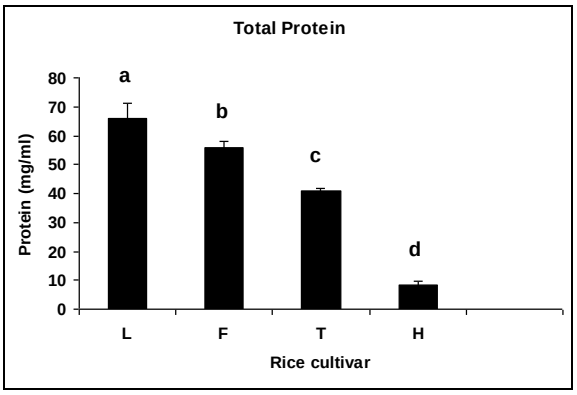
از این مطالعه ارتباط ارقام مختلف برنج از نظر ژنتیکی و احتمال معرفی نشانگر پروتئینی برای شناسایی ارقام برنج را فراهم می‌نماید.

مواد و روش‌ها

بذرهای چهار رقم برنج به نام‌های لنجانی، فریدون‌کنار، طارم و هندی معروف به سرآشپز بررسی شد. ابتدا بذرها به صورت پودر درآمد و سپس با استفاده از نیتروژن مایع مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم پودر برنج ساییده شد و با استفاده از سه نوع محلول استخراج شامل NaCl ۰/۵ درصد برای گلوبولین‌ها، اتانول ۷۰ درصد برای استخراج پرولامین‌ها، NaOH یک نرمال با اسیدیته ۸/۵ برای گلوتلین‌ها و آب مقطر برای استخراج آلبومین‌ها استفاده شد. اندازه‌گیری پروتئین کل (میلی‌گرم در گرم پودر) بر اساس روش تغییر یافته Bradford (۱۹۷۶) با استفاده از BSA (Buvin Serum Albomin) به‌عنوان استاندارد انجام شد (Sadarudin *et al.*, 2010). آنالیز SDS-PAGE با استفاده از ژل جداکننده ۱۲ درصد و متمرکزکننده ۵ درصد انجام شد (Hames, 1990) و پس از الکتروفورز در ۱۲۰ ولت نوارهای پروتئینی با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. همه آزمایشات در ۴ تکرار انجام شد و داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۰/۰ با تحلیل آماری ANOVA و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $P<0.05$ مقایسه شدند. همچنین، روابط خویشاوندی ارقام پسته به کمک نرم‌افزار NTSYSPc2 ارزیابی گردید.

نتایج

اندازه‌گیری میزان پروتئین چهار رقم مختلف برنج (که سه رقم آن در ایران وجود دارد و یک رقم دیگر جزء ارقام وارداتی برنج است) نشان داد که حداکثر میزان پروتئین در برنج رقم لنجانی و کمترین مقدار آن در رقم هندی وارداتی وجود دارد. اختلاف بین میزان پروتئین در تمام ارقام از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0.05$) (شکل ۱).

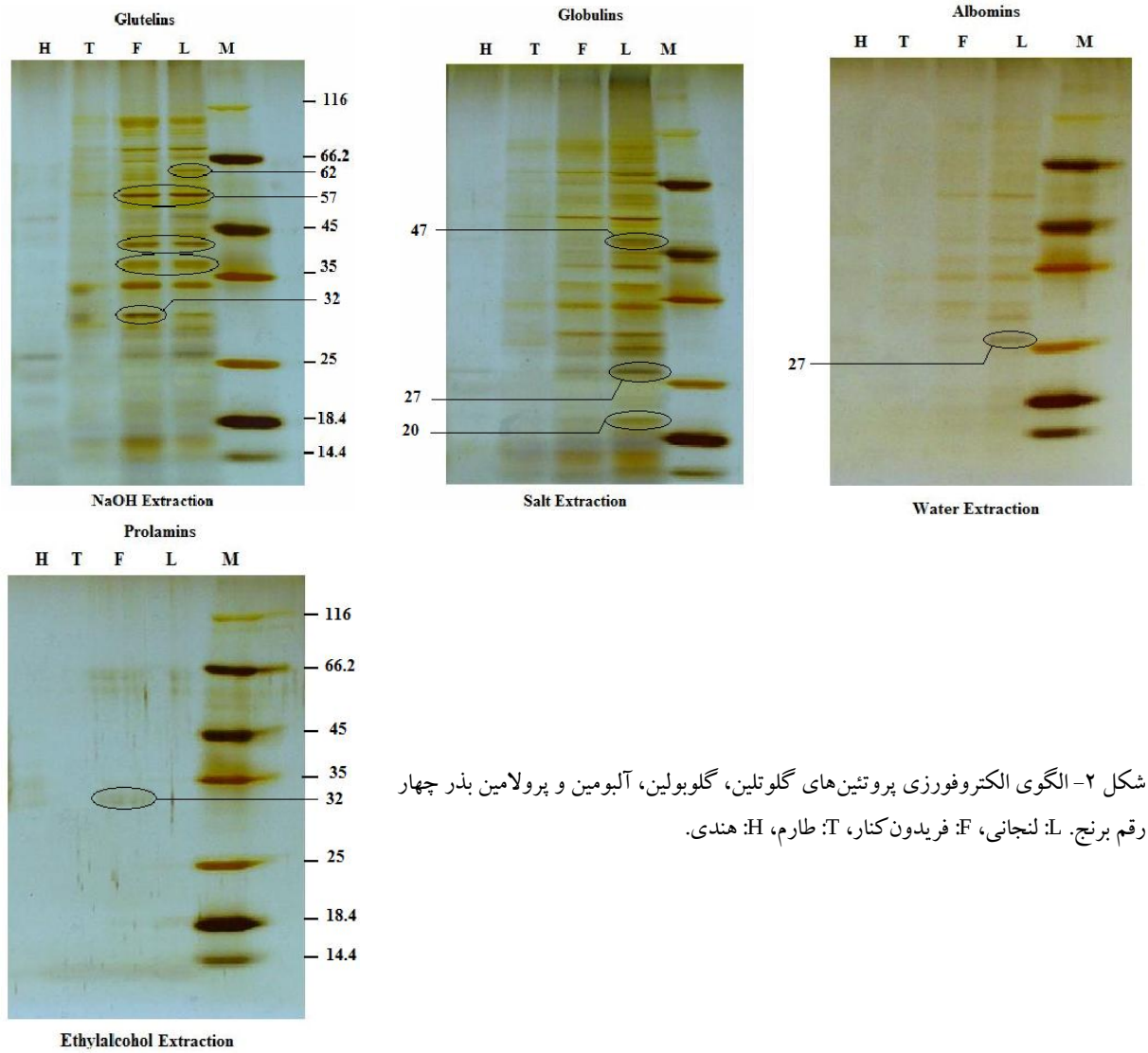


شکل ۱- میزان پروتئین کل در بذر چهار رقم مختلف برنج. L: لنجانی، F: فریدون‌کنار، T: طارم، H: هندی. حروف مشترک بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) بر اساس آزمون توکی است.

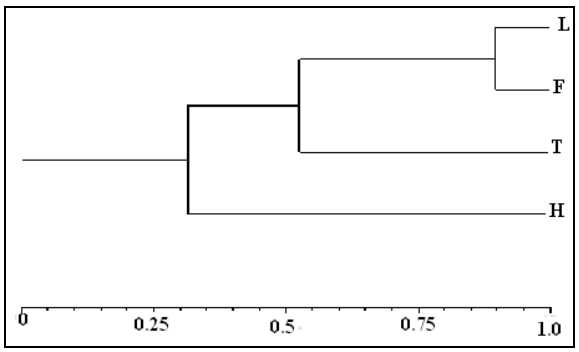
الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های مختلف بذر در ارقام مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که نتایج نشان داد بیشترین نوارهای پروتئینی شامل گلوبولین‌ها و گلوتلین‌هاست، در حالی‌که پرولامین بذر کمترین باندهای پروتئینی را نشان می‌دهد. آلبومین‌های بذر نوارهای کم و بیش مشابه گلوبولین و گلوتلین‌ها را نشان داد ولی با شدت بسیار کمتر روی ژل ظاهر شد. از بین نوارهای گلوبولین نوارهایی با اندازه ۵۷ و ۴۰ کیلو دالتون شاخص این پروتئین در برنج است در حالی‌که گلوبولین‌هایی با اندازه ۴۷، ۲۷ و ۲۰ کیلو دالتون از پروتئین‌های شاخص گروه گلوبولین‌هاست. نوارهای مذکور در دو گروه فوق (گلوبولین‌ها و گلوتلین‌ها) در بذر برنج رقم هندی و رقم طارم دیده نشدند. نوارهای پروتئینی پرولامین اگر چه بسیار ضعیف بودند ولی می‌توان گفت نوارهای

۶۰ کیلو دالتونی در رقم‌های لنجانی و فریدون‌کنار مشاهده می‌شود. نوار ۳۲ کیلو دالتون فقط در رقم فریدون‌کنار و باند حدود ۱۳ در هر چهار رقم دیده شد. از نظر آلبومین باند ۵۷ کیلو دالتون تنها در دو رقم لنجانی و فریدون‌کنار و نوار حدود ۲۰ کیلو دالتون تنها در رقم لنجانی به عنوان یک شاخص دیده شد.

بر اساس داده‌های الکتروفورز، پروتئین‌های گلوتلین و گلوبولین (همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد) نوارهای پروتئینی گلوتلین و گلوبولین نسبت به سایر پروتئین‌ها بیشتر بود و به همین دلیل روابط خویشاوندی بر اساس این الگوی این پروتئین ها تعیین شد. روابط خویشاوندی رقم‌های برنج مطالعه شده، بررسی و دندروگرام مربوط به شباهت آنها ترسیم گردید (شکل ۲). دندروگرام پروتئین‌ها نشان می‌دهد که رقم‌های لنجانی و فریدون‌کنار با ۹۰ درصد شباهت، نزدیک‌ترین ارقام به یکدیگر و رقم هندی با حدود ۳۰ درصد دورترین رقم نسبت به رقم‌های دیگر برنج در این مطالعه تشخیص داده شد. رقم طارم با حدود ۵۵ درصد شباهت، حد واسط رقم‌های لنجانی و فریدون‌کنار و رقم هندی قرار گرفت.



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گلوتلین، گلوبولین، آلبومین و پرولامین بذر چهار رقم برنج. L: لنجانی، F: فریدون‌کنار، T: طارم، H: هندی.



شکل ۳- دندروگرام روبط خویشاوندی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گلوتلین و گلوبولین چهار رقم برنج. L: لنجانی، F: فریدون‌کنار، T: طارم، H: هندی

بحث

نظر به اینکه، یکی از روش‌های مطمئن برای شناسایی شباهت‌ها و اختلاف‌های بین گونه‌ای و حتی بین ارقام مختلف گیاهان زراعی و همچنین، معرفی نشانگر پروتئینی به عنوان معرف یک ویژگی خاص در گیاه به کارگیری الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های بذر گیاه است، این روش تاکنون برای شناسایی ارتباط بین ارقام مختلف برنج (Mullah *et al.*, 2010)، ارقام مختلف پسته (احسانپور و همکاران، ۱۳۸۹) و برخی گیاهان دیگر به کار گرفته شده است (De Vries, 1996). از نظر میزان پروتئین کل، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین میزان پروتئین در برنج رقم لنجانی و کمترین مقدار پروتئین در رقم هندی یافت می‌شود ارقام فریدون‌کنار و طارم با اختلاف معنی‌دار به ترتیب در رتبه‌های دوم و سوم قرار می‌گیرند. از آنجایی که یکی از شاخص‌های کیفیت خوب از نظر غذایی میزان پروتئین برنج است، می‌توان گفت ارزش غذایی برنج لنجانی و فریدون‌کنار از سایر برنج‌ها به خصوص برنج هندی بالاتر است.

نتایج مطالعات پیشین بر روی پروتئین‌های بذر برنج نشان می‌دهد حداکثر فاصله ژنتیکی حدود ۸۰ درصد بین رقم برنج Basmathi-385 و سایر رقم‌های بومی در پاکستان وجود دارد. نکته جالب اینکه در مطالعه حاضر بین رقم هندی به عنوان یک رقم وارداتی و رقم‌های برنج بومی ایران یعنی لنجانی و فریدون‌کنار اختلاف بیش از ۷۰ درصد مشاهده می‌شود (Mullah *et al.*, 2010). نظیر چنین مطالعه‌ای در مورد ارقام برنج در ژاپن نیز توسط Kawakatsu و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش شده است. علاوه بر الگوی عمومی، پروتئین‌های اختصاصی‌تر برنج شامل گلوتلین، گلوبولین، آلبومین و پرولامین در مطالعات مشابه انجام گرفته ولی برخی از نتایج با آنچه در مطالعه حاضر گزارش شد، متفاوت است؛ برای مثال، گلوتلین با اندازه ۵۷ و ۳۲ کیلو دالتون قبلاً در ارقام برنج گزارش شده است (Krishnan and Okita,. 1986). ولی پروتئین‌های با اندازه حدود ۶۲ و ۳۵ تا ۴۵ کیلو دالتون در ارقام مورد مطالعه حاضر مشاهده شد. نظیر چنین اختلافی در الگوی گلوبولین‌های برنج با اندازه ۴۷ و ۲۷ کیلو دالتون نسبت به گلوبولین‌های سایر ارقام به ویژه ارقام برنج در پاکستان گزارش شده است. اختلاف در الگوی این پروتئین‌ها نسبت به ارقام سایر کشورها را می‌توان به تنوع ژنتیکی بین ارقام در نقاط مختلف جغرافیایی نسبت داد. الگوی پروتئین پرولامین در ارقام مطالعه شده نشان داد که نه تنها میزان پروتئین در نوارهای مشاهده شده کم است بلکه تعداد نوارهای پروتئینی ظاهر شده روی ژل نیز انگشت شمار است. کم بودن پرولامین در برخی ارقام برنج پیشتر توسط محققان دیگر گزارش شده است (Li and Okita, 1993; Amber *et al.*, 2011). از نظر پرولامین کلیه ارقام مورد مطالعه حاضر یک نوار نسبتاً ضعیف پروتئینی

با اندازه تقریبی ۱۳ کیلو دالتون نشان داد که چنین پرولامینی در برنج قبلاً نیز گزارش شده است (Peter and Arthur, 1990). گلوبولین‌های برنج‌های مطالعه شده نیز اختلافاتی را بین خود نشان دادند. برای مثال، دو پروتئین با اندازه‌های ۴۷ و ۲۷ کیلو دالتون در رقم لنجانی مشاهده شد که این باند با شدت بسیار کم در رقم فریدون‌کنار وجود داشت در حالی‌که در رقم‌های طارم و هندی چنین باندی قابل مشاهده نبود. به طور کلی نتایج تحلیل الگوی پروتئینی بذر چهار رقم برنج در مطالعه حاضر نشان داد که اولاً پروتئین‌های گلوتلین و گلوبولین نسبت به آلبومین و پرولامین چه از نظر کمّی و چه تعداد باندهای پروتئینی (که خود معرف جایگاه‌های ژنتیک هستند)، شاخص‌های بهتری هستند (Ogawa *et al.*, 1986)، ثانیاً برخی از پروتئین‌ها به طور انحصاری در نمونه‌های بذر مورد مطالعه حاضر بیان شده‌اند و در منابع علمی پیشین گزارشی از آنها وجود ندارد که این موضوع می‌تواند به عنوان یک ابزار ارزشمند برای معرفی نشانگر اختصاصی رقم های بذر برنج مورد مطالعه حاضر به کار رود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به واسطه حمایت از این طرح پژوهشی قدردانی می‌نمایند.

منابع

احسانپور، ع. ا.، شجاعی، ب. و رستمی، ف. (۱۳۸۹) استفاده از نشانگرهای پروتئین‌های جنینی و ذخیره‌ای بذر در جداسازی چهار رقم پسته. تاکسونومی و بیوسیستماتیک ۳: ۱-۱۰.

Ahmad, F. and Slinkard, A.E. (1992) Genetic relationships in the genus *Cicer* L. as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins. Theoretical and Applied Genetics 84: 688-692.

Amber, A., Ghulam Muhammad, A., Asif, M. and Setsuko, K. (2011) Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. Plant Cell Report 30:745-763.

Bellon, M. R., Brar, D. S., Lu, B. R. and Pham, J. L. (1998) Rice genetic resources. sustainability of rice in the global food system. International Rice Research Institute 251-284.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitayion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

De Vries, I. M. (1996) Characterization and identification of *Latuca sativa* cultivars and wild relative with SDS-electrophoresis. Genetic Recourse and Crop Ecology 43: 193-202.

Hames, B. D. (1990) Gel electrophoresis of proteins, a practical appreoach. (eds. Hames, B. D. and Rickwood, D.) 2nd edition. Oxford University Press, Oxford.

Juliano, B. O. (1972) The rice caryopsis and its composition. Rice Chemistry and Technology 16-74.

Kawakatsu, T., Sakiko Hirose, H. Y. and Fumio, T. (2010) Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. Plant Physiology 154: 1842-1854.

Krishnan, H. B. and Okita, T. W. (1986) Structural relationship among the rice glutelin polypeptides. Plant Physiology 81: 748-753

Li, X. and Okita, T. W. (1993) Accumulation of prolamines and glutelins during rice seed development: A quantitative evaluation. Plant and Cell Physiology 34: 385-390.

Mullah, I., Ahmed Khan, I., Ahmad, H., Sajid-ul, G. and Sahib, G. (2010) Seed storage protein profile of rice varieties commonly grown in Pakistan. Asian Journal of Agricultural Sciences 2: 120-123.

Ogawa S. C., Takahashi, M. M. and Asada, K. (1986) The processing of a 57 kDa precursor peptide to subunits of rice glutelin. Plant Cell Physiology 27: 1579-1586.

Peter, R. R., Johnathan, A. N. and Arthur, S. (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. The Plant Cell 7: 945-956.

Peter, R. S. and Arthur, S. (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds. Structure and Evolution Biochemistry Journal 267: 1-12.

Ravi, M., Geethanjali, S., Sameeyafarheen, F. and Maheswaran, M. (2003) Molecular marker based genetic diversity analysis in rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers. Euphytica 33: 243-252.

Sadarudin, S. Toshihiro, K. and Hikaru, S. (2010) Pakistan rice genetic resources III: SDS PAGE diversityprofile of glutelins. Pakestanian Journal of Botany 42(4): 2523-2530.

Shewry, P. R. and Arthur S. Tathamt. (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Biochemistry Journal 267: 1-12.

Shiraishi, M., Kumamaru, T., Satoh, H. Omura, T., Iwata, N. and Ogawa, M. (1986) Variation for storage protein in rice endosperm among varieties. Japan Journal of Breeding (Suppl. 2) 36: 76-77.

Usman, L. A., Ameen, O. M., Lawal A. and Awolola, G. V. (2009) Effect of alkaline hydrolysis on the quantity of extractable protein fractions (prolamin, albumin, globulin and glutelin) in *Jatropha curcas* seed. African Journal of Biotechnology 8: 6374-6378.

Yamagata, H., Sugimoto, T., Tanaka, K. and Kasai, Z. (1982) Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. Plant Physiology 70: 1094-1100.

Comparison of electrophoresis patterns of prolamins, glutellins, globulins and albomins proteins of four seed rice (*Oryza sativa* L.) cultivars

Ali akbar Ehsanpour [1]*, Leila Arab [2], Shekoofeh Haji Hashemi [2] and Mahboobeh Riahi [2]

[1] Department of Biology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Identification and recognition of rice cultivars help to improve the nutritional quality of this product. In the present study, four rice cultivars including Lenjani, Feridonkenar, Tarom and Indian known as Sarashpaz were analyzed based on the electrophoresis pattern of Glutellin, Globulin, Albomin and Prolamin. Glutellin and globulins showed higher number of protein bands while prolamins had lower protein content as well as number of bands. The relationship among cultivars showed that, cultivars Lenjani and Ferindonkenar were very close to each other while cultivar Indian (Sarashpaz) had the higest distance and cultivar Tarom was somewhere in between.

Key words: Rice, Protein, Electrophoresis

* ehsanpou@sci.ui.ac.ir