Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Crop Production

Print ISSN: 2008- 739x
Online ISSN: 2008- 7403

Iranian Society of Agronomy and Plant Breeding Sciences

Assessment of seed storage protein quality of some quantitative and qualitative rice cultivars (*Oryza sativa* L.)

Mehdi Arefrad[1*], Kamelia Katalani[2], Ghorbanali Nematzadeh[3]

[1] PhD in Plant Breeding and Genetic Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Recourses University, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari, Iran, Email: mehdiarefrad@yahoo.com
[2] PhD in Plant Breeding and Genetic Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Recourses University, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari, Iran, Email: katalaniK.Bio@gmail.com
[3] Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Recourses University, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari, Iran, Email: gh.nematzadeh@sanru.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2021/01/15
Revised: 2021/10/16
Accepted: 2021/11/17

Keywords:
Band patterns of seed storage protein
Rice
Storage proteins

ABSTRACT

Background and objectives: Rice is a good source of energy and has the highest protein efficiency among plant proteins. However, its protein content is relatively low compared to other cereals. Seed storage protein in rice classified into four groups: albumin and globulin in aleurone layer, and prolamine and glutelin in endosperm. Therefore, during the bleaching process of rice grains, albumin proteins and part of globulin are removed by its bran. Since the protein content of the grain and its amount will be directly related to its nutritional quality and due to the importance of rice grain in diet, seed storage proteins quality in a quantitative and qualitative breeding population of rice such as two new mutant cultivars, Roshan and Shahriar, with their parents (Nemat and Amol3 respectively) as well as qualitative varieties, Sang-tarom, along with two different varieties of brown and black rice was studied.

Materials and methods: Qualitative properties of grain proteins were evaluated based on their solubility as well as the seed storage proteins For albumin, globulin, prolamine and glutelin proteins. Quantification of stored proteins was performed by Bradford reagent and quantification of their subunits by densitometric analysis.

Results: The results showed that there is a significant difference for the amount of seed storage proteins of different rice genotypes. So that Sang-tarom and Roshan cultivars had the highest amount of albumin protein (19.53 and 22.40 mg/g respectively). This was while the brown grain variety with the lowest amount of albumin and globulin protein and the highest amount of glutelin and prolamine proteins has the highest amount of total protein (1640.43 mg/g). Evaluation of the banding pattern of stored storage proteins also showed that this banding pattern was the same in different genotypes except in Roshan (60 kDa) and Shahriar (13 kDa) mutant cultivars. Densitometric analysis of protein subunits also showed that the highest amount of glutelin subunits was present in Sang-tarom cultivar and the lowest in Shahriar cultivar and brown grain variety. Also, the highest amount of prolamine subunits was observed in Sang-tarom cultivar and brown grain variety and the lowest in Shahriar cultivar. As Shahriar cultivar was able to have the highest amount of glutelin to prolamine protein.

Conclusion: Although the profiles of seed storage proteins in different varieties of rice are the same, but this pattern is different in the two cultivars

of mutant Roshan and Shahriyar. So that, the absent of the 60kDa subunit of proglutelin and the 13kDa subunit of prolamine can be used as protein markers in both Roshan and Shahriar, respectively. Our study demonstrated that although there is a significant relationship between protein subunits and the amount of stored proteins, but there was no significant relationship between stored proteins with different quantitative and qualitative rice cultivars. Therefore it seems that improving the seed storage protein quality will probably not limit the improvement of new rice cultivars with desirable quantitative and qualitative characteristics.

Cite this article: Arefrad, M., Katalani, K., Nematzadeh, Gh.A. 2022. Assessment of seed storage protein quality of some quantitative and qualitative rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Crop Production Journal*, 15 (3), 21-40.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/EJCP.2022.18658.2386
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

تولید گیاهان زراعی
شاپا چاپی: ۷۳۹x-۲۰۰۸
شاپا الکترونیکی: ۷۴۰۳-۲۰۰۸

ارزیابی کیفیت پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در برخی از ارقام کمی و کیفی برنج (*Oryza sativa* L.)

مهدی عارف‌راد[۱*]، کاملیا کتالانی[۲]، قربانعلی نعمت‌زاده[۳]

[۱] دکتری اصلاح نباتات، گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، ایران، رایانامه: mehdiarefrad@yahoo.com

[۲] دکتری اصلاح نباتات، گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، ایران، رایانامه: kataläniK.Bio@gmail.com

[۳] استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، ایران، رایانامه: gh.nematzadeh@sanru.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۶
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۶

واژه‌های کلیدی:
الگوی باندی پروتئین‌های دانه برنج
پروتئین‌های ذخیره‌ای

چکیده

سابقه و هدف: برنج منبع مناسبی از انرژی محسوب می‌شود و از بین پروتئین‌های گیاهی، بالاترین کارایی را برای ارزش غذایی پروتئین به خود اختصاص داده است. این درحالی است که محتوای پروتئین آن در مقایسه با سایر غلات نسبتاً پایین می‌باشد. پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه برنج شامل آلبومین و گلبولین در لایه آلورون و پروتئین‌های پرولامین و گلوتلین در آندوسپرم دانه می‌باشند. بنابراین، طی فرایند سفید کردن دانه برنج پروتئین‌های آلبومین و بخشی از گلوبولین در جداسازی سبوس آن حذف می‌گردند. باتوجه به اهمیت مصرف دانه برنج در رژیم غذایی، در این تحقیق کیفیت پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در یک جمعیت اصلاحی کمی و کیفی برنج شامل دو رقم جدید موتانت روشن و شهریار و والد آن‌ها (به ترتیب ارقام نعمت و آمل۳) به همراه رقم کیفی سنگ طارم و دو واریته مختلف برنج با رنگ دانه قهوه‌ای و سیاه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ارزیابی خصوصیات کیفی پروتئین‌های دانه بر اساس قابلیت انحلال آن‌ها (برای پروتئین‌های آلبومین، گلوبولین، پرولامین و گلوتلین) و همچنین، بر اساس الگوی باندی پروتئین‌های دانه انجام شد. کمیت سنجی پروتئین‌های ذخیره‌ای با استفاده از معرف برادفورد و کمیت سنجی زیرواحدهای آن‌ها نیز با آنالیز دنسیتومتری صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری برای میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای در ژنوتیپ‌های مختلف دانه برنج وجود دارد. به‌طوری‌که ارقام سنگ طارم و روشن بیش‌ترین میزان پروتئین آلبومین را به خود اختصاص دادند (به‌ترتیب ۱۹/۵۳ و ۲۲/۴۰ میلی‌گرم بر گرم). این درحالی بود که واریته دانه قهوه‌ای با کم‌ترین میزان پروتئین آلبومین و گلوبولین و بیش‌ترین میزان پروتئین‌های گلوتلین و پرولامین بیش‌ترین میزان پروتئین کل را به خود اختصاص داد (۱۶۴۰/۴۳ میلی‌گرم بر گرم). ارزیابی الگوی باندی پروتئین‌های ذخیره‌ای نیز نشان داد که این الگوی باندی به جز در ارقام موتانت روشن (۶۰ کیلودالتون) و شهریار (۱۳ کیلودالتون) در دیگر در ژنوتیپ‌های مختلف مورد ارزیابی یکسان و مشابه بود. آنالیز دنسیتومتری زیرواحدهای پروتئینی نیز نشان داد که بیش‌ترین میزان زیرواحدهای گلوتلین در رقم سنگ طارم و کم‌ترین آن در رقم شهریار و واریته دانه قهوه‌ای وجود دارد. همچنین، بیش‌ترین میزان زیرواحدهای پرولامین نیز در

رقم سنگ طارم و واریته دانه قهوه‌ای و کم‌ترین آن در رقم شهریار مشاهده شد. به‌طوری‌که رقم شهریار توانست بیش‌ترین میزان پروتئین گلوتلین به پرولامین را به خود اختصاص دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که اگرچه پروفایل پروتئین‌های دانه در واریته‌های مختلف کمی و کیفی برنج یکسان و مشابه است، اما این الگو در دو رقم موتانت روشن و شهریار متفاوت می‌باشد، به‌طوری‌که عدم بیان زیرواحدهای ٦٠ کیلودالتون پروگلوتلین و زیرواحد ١٣ کیلودالتون پرولامین می‌توانند به‌عنوان مارکرهای پروتئینی به ترتیب در دو رقم روشن و شهریار مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، این نتایج نشان داد که اگرچه بین زیرواحدهای پروتئنی و میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای ارتباط معنی‌داری وجود دارد، اما بین پروتئین‌های ذخیره‌ای با ارقام مختلف کمی و کیفی برنج ارتباط معنی‌داری حاصل نشد. بنابراین، به نظر می‌رسد که احتمالا اصلاح کیفیت پروتئین‌های دانه محدودیتی را برای اصلاح ارقام جدید برنج با خصوصیات کمی و کیفی مطلوب ایجاد نخواهد کرد.

استناد: عارف‌راد، م.، کتالانی، ک.، نعمت‌زاده، ق.ع. (١٤٠١). ارزیابی کیفیت پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در برخی از ارقام کمی و کیفی برنج (*Oryza sativa* L.). *مجله تولید گیاهان زراعی*، ١٥ (٣)، ٤٠-٢١.

DOI: 10.22069/EJCP.2022.18658.2386

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از منابع مهم تغذیه‌ای و تامین کننده انرژی در رژیم غذایی انسان بالاخص در نواحی آسیا محسوب می‌شود. در برنج پروتئین بعد از نشاسته دومین بخش مهم در منابع ذخیره‌ای دانه به حساب می‌آیند. پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه یکی از منابع مهم تامین نیتروژن برای انسان و دام محسوب می‌شود. از بین پروتئین‌های گیاهی، پروتئین برنج بالاترین کارایی تغذیه‌ای را برای پروتئین به خود اختصاص داده است، این درحالی است که محتوای پروتئین دانه برنج در مقایسه با سایر منابع پروتئینی نسبتا پایین می‌باشد (۱۰-۷ درصد) (۱). از آنجایی که محتوای پروتئینی دانه رابطه مستقیمی با کیفیت غذایی آن خواهد داشت (۲)، بنابراین، با افزایش میزان محتوای پروتئین برنج، ارزش غذایی آن نیز افزایش خواهد یافت (۳). پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه برنج بر اساس قابلیت انحلال به چهار نوع آلبومین، گلبولین، پرولامین و گلوتلین دسته‌بندی می‌گردند (٤). در اکثر غلات، پرولامین از اصلی‌ترین پروتئین‌های ذخیره‌ایی دانه محسوب می‌شوند، در حالی که در برنج پروتئین‌های گلوتلین (۸۰-٦۰ درصد) و پرولامین (۳۰-۲۰ درصد) مهم‌ترین پروتئین ذخیره‌ای آندوسپرم دانه محسوب می‌شوند (٥).

از بین پروتئین‌های دانه برنج، پروتئین‌های آلبومین و گلوبولین در بخش لایه آلورون و پروتئین‌های گلوتلین و پرولامین در بخش آندوسپرم دانه وجود دارند. از این بین، پروتئین‌های آلبومین و بخشی از گلوبولین طی فرآیند سفید کردن دانه طی فرایند سبوس‌گیری حذف می‌گردند (٦). پروتئین‌های گلوتلین نیز در ابتدا به صورت یک پروتئین پیش‌ساز ٦۰-٥٥ کیلودالتون به نام پروگلوتلین ساخته شده و سپس به زیرواحدهای اسیدی و بازی پردازش می‌گردند (٥، ۷). پرولامین‌ها نیز شامل زیرواحدهای مختلفی بین ١٦-١٠ کیلودالتون می‌باشند (۸). از بین پروتئین‌های بخش آندوسپرم، گلوتلین در مقایسه با پرولامین در لوله گوارش به راحتی هضم می‌شوند. از طرفی دیگر، پروتئین گلوتلین در مقایسه با پرولامین، غنی از اسید آمینه لایزین نیز می‌باشد. باتوجه به اینکه مهم‌ترین محدودیت در ارزش غذایی پروتئین‌های دانه برنج مرتبط با میزان اسید آمینه لایزین می‌باشد، ارزش غذایی پروتئین گلوتلین بیش‌تر از پروتئین‌های پرولامین برآورد می‌شود (۹).

در سال‌های اخیر افزایش کیفیت پروتئین‌های دانه یکی از اهداف مهم اصلاحی در جهت افزایش ارزش غذایی دانه برنج مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون گزارشات مختلفی در خصوص پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه برنج و پروفایل پروتئینی آن‌ها ارائه شده است (۱، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲). به‌طوری‌که برخی از این گزارشات توانسته است منابع ژنتیکی مفیدی را در اختیار اصلاح‌کنندگان جهت افزایش کیفیت پروتئین‌های دانه قرار دهد (۱۳، ۹ و ١٤).

با وجود اهمیت مصرف برنج در رژیم غذایی، تاکنون اطلاعات کاملی در خصوص کیفیت پروتئین‌های دانه در ارقام برنج داخلی ارائه نشده است. بنابراین، مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای در ارقام رایج زراعی برنج می‌تواند درک ما را در خصوص افزایش کیفیت پروتئین‌های آن افزایش دهد. لذا در این تحقیق کیفیت پروتئین‌های ذخیره‌ای در یک جمعیت اصلاحی از ارقام کمی و کیفی شامل دو رقم جدید موتانت با نام‌های روشن و شهریار با قابلیت توام عملکرد بالا و کیفیت مطلوب دانه به همراه والد مادری آن‌ها (به ترتیب ارقام نعمت و آمل۳) و همچنین، رقم بومی سنگ طارم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. همچنین، در این تحقیق پروتئین‌های دانه دو واریته متفاوت با رنگ دانه قهوه‌ای و سیاه نیز مورد مطالعه قرار گرفتند تا بتوان از حداکثر پتانسیل موجود

جهت درک هرچه بهتر پروتئین‌های دانه در ارقام مختلف برنج بهره جست.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق بذرهای رسیده ارقام مختلف زراعی مانند رقم محلی سنگ طارم و ارقام کمی آمل۳ و نعمت و همچنین، دو رقم جدید موتانت روشن و شهریار به ترتیب حاصل از ارقام نعمت و آمل۳ به همراه دو واریته متفاوت برنج با رنگ دانه قهوه‌ای و سیاه از بانک بذر پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان (GABIT) که در سال زراعی ۱۳۹۹ در مزرعه پژوهشی این مجموعه مورد کشت قرار گرفته بودند، تهیه گردید. هدف از انتخاب ژنوتیپ‌هایی با دانه‌های رنگی، ارزیابی پروفایل پروتئینی ارقام محلی و اصلاحی با واریته‌های متفاوت دانه رنگی بود تا بتوان تنوع لازم را برای مطالعه پروتئنی‌های دانه به کار برد. متاسفانه مشخصات کاملی از واریته‌های دانه رنگی مانند نام تجاری و خصوصیات کیفی آن‌ها مشخص نبود و این ژنوتیپ‌ها به منظور لاین‌های اصلاحی مورد کشت قرار می‌گیرند. در این تحقیق نام این دو X_1 و X_2 به‌ترتیب برای واریته دانه قهوه‌ای و دانه سیاه در نظر گرفته شد. مشخصات کمی و کیفی هریک از ارقام اصلاحی و روش اصلاحی آن‌ها در شکل ۱ و جدول ۱ نشان داده شد.

جدول ۱- مشخصات برخی از خصوصیات کمی و کیفی ارقام و واریته‌های مورد مطالعه.

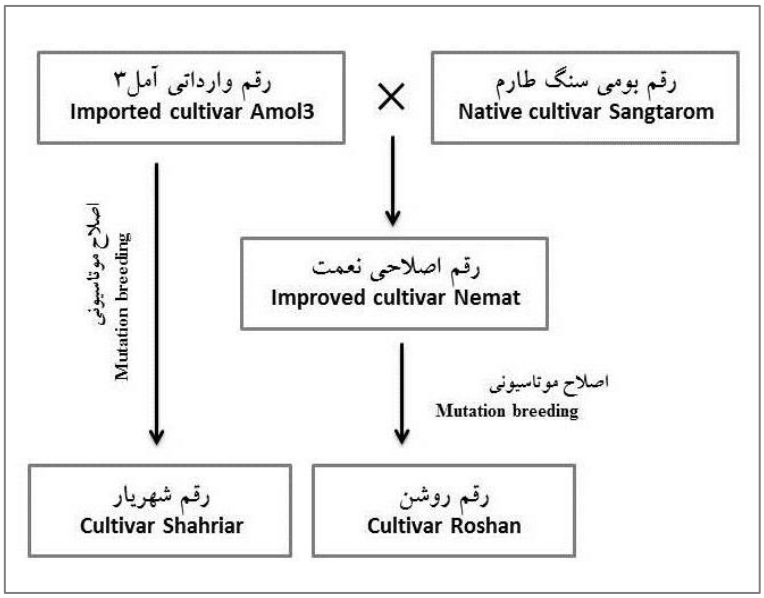
Table 1- Characteristics of some quantitative and qualitative characteristics of the studied cultivars and varieties.

ردیف Row	نام ژنوتیپ Genotypes	میانگین عملکرد شلتوک Average of yield	کیفیت پخت Cooking quality	زمان رسیدن Maturity	کیفیت عطر Fragrance quality
1	سنگ طارم Sangetarom	چهار تن Four ton	عالی Excellent	میان رس Moderate	معطر Aromatic
2	آمل۳ Amol3	هفت تن Seven ton	ضعیف Weak	دیر رس Late maturity	بدون عطر Non aromatic
3	نعمت Nemat	هفت تن Seven ton	ضعیف Weak	دیر رس Late maturity	بدون عطر Non aromatic
4	روشن Roshan	هشت و نیم تن Eight and a half ton	متوسط Moderate	میان رس Moderate	معطر Aromatic
5	شهریار Shariar	هشت و نیم تن Eight and a half ton	متوسط Moderate	میان رس Moderate	بدون عطر Non aromatic
6	X1 (دانه قهوه ای) X1 (Brown seed)	.....	متوسط Moderate	.....	بدون عطر Non aromatic
7	X2 (دانه سیاه) X2 (Black seed)	.....	متوسط Moderate	.....	بدون عطر Non aromatic

جهت استخراج و جداسازی پروتئین‌های دانه ابتدا دانه‌ها با دست پوست‌گیری شده و سپس دانه‌های پوست‌گیری شده در هاون به کمک ازت مایع به خوبی پودر گردیدند. در این تحقیق کیفیت پروتئین‌های دانه بر اساس قابلیت انحلال آن‌ها (بافر Tris-Hcl pH: 7.5 برای پروتئین آلبومین و محلول‌های NaCl، Isopropanol و NaOH به‌ترتیب برای پروتئین‌های گلوبولین، پرولامین و گلوتلین) و همچنین، بر اساس الگوی باندی زیرواحدهای پروتئینی مورد مطالعه قرار گرفت.

استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه بر اساس قابلیت انحلال آن‌ها به‌صورت جز به جز صورت گرفت (۱۴). ابتدا به هر نمونه به نسبت ۱۰:۱ (وزنی/حجمی) بافر استخراج 10mM Tris-HCl

pH:7.5 اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت دو ساعت در دمای اتاق به خوبی مخلوط شده و سپس در دستگاه سانتریفیوژ (Eppendrorf 5417R) با دور ۱۳۰۰۰rpm با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. محلول حاصل به عنوان پروتئین‌های آلبومین جداسازی شد. سپس به رسوب حاصل محلول 1M NaCl همانند روش قبل اضافه و از مخلوط حاصل پروتئین‌های گلوبولین جداسازی شد. سپس به رسوب حاصل از این مرحله همانند قبل محلول 60% n-propanol; 1mM EDTA-2Na اضافه و پروتئین‌های پرولامین جداسازی گردیدند. در نهایت به رسوب حاصل بافر 0.05 M NaOH اضافه و پروتئین‌های گلوتلین استخراج گردیدند (١٤).



شکل ۱- روش اصلاحی در جمعیت ارقام مورد مطالعه.

Figure 1- Breeding method of improved cultivars.

تعیین کمیت پروتئین‌های استخراج شده بر اساس روش برادفورد صورت گرفت و از BSA (Bovine serum Albumin)، نیز به‌عنوان استاندارد استفاده گردید (١٥). جهت ارزیابی پروفایل پروتئین‌های دانه نیز به هر نمونه به نسبت ۱۰:۱ (وزنی/حجمی) بافر استخراج پروتئین اضافه گردید (Tris-HCl 0.05M pH 8.0, SDS 2%, Urea 7M, Thiourea 2M, Merceptoetanol 1%). پس از اینکه نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق با بافر استخراج به خوبی مخلوط شدند در نهایت با دور ۱۳۰۰۰rpm و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول حاصل جهت الکتروفورز پروتئین‌ها جداسازی گردید (٩). الگوی باندی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه توسط تکنیک SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) مورد مطالعه قرار گرفت (١٦). در این روش غلظت ژل جدا کننده ١٤ درصد و غلظت ژل متراکم کننده ٦ درصد در نظر گرفته شد. پس از تهیه ژل پلی‌اکریلامید و قرارگیری آن در دستگاه الکتروفورز عمودی بافر الکتروفورز (0.025M Tris pH 8.3, 0.192M Glycine, 1% SDS) به آن اضافه گردید. قبل از بارگذاری نمونه‌ها ابتدا از هر نمونه به میزان ۱۵ میکرولیتر پروتئین با ۱۵ میکرولیتر بافر نمونه (0.5M Tris, 10% SDS, Glycerol 5ml,

β-Mercapto ethanol 2.56 ml, Bromo Phenol Blue 0.001%) به خوبی مخلوط و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در این تحقیق از استاندارد پروتئینی شرکت Thermo (Prestained Protein Ladder 26616) و همچنین، از BSA با دو غلظت پنج و ۱۰ میکروگرم جهت ارزیابی وزن مولکولی و کمیت سنجی زیرواحدهای پروتئینی استفاده گردید. الکتروفورز پروتئین‌ها با ولتاژ ۱۲۰ ولت و برای هشت ساعت صورت گرفت. پس از پایان الکتروفورز ژل حاصل جدا شده و به مدت نیم ساعت در محلول رنگ (0.2% Coomassie brilliant blue, 45%Methanol, 9% Acetic acid) قرار گرفت. پس از پایان رنگ‌آمیزی ژل‌ها دو مرتبه با محلول شستشو (25% Methanol, 7.5% Acetic acid) شسته شدند.

پس از پایان رنگ‌آمیزی، ژل حاصل با دستگاه Bio Rad GS-800 با وضوح ۶۰۰ پیکسل (dpi) اسکن شد. سپس موقعیت هریک از زیرواحدهای پروتئینی بر اساس وزن مولکولی آن‌ها با گزارشات Kim et al., (10) و Jiang et al., (9) مطابقت گردید. کمیت سنجی پروتئین‌های ذخیره‌ای و زیرواحدهای آن‌ها نیز توسط نرم افزار Melanie V.6 بر اساس میزان حجم باند پروتئنی (براساس معیار Volume) مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و همچنین، داده‌های حاصل از کمیت سنجی زیرواحدهای پروتئینی با استفاده از نرم افزار SAS و برنامه Excel صورت گرفت. تمامی آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار اجرا شدند. میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) مقایسه شدند.

نتایج و بحث

پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه: نتایج تجزیه واریانس برای پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه بر اساس قابلیت انحلال آن‌ها در جدول ۲ نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود داشت.

جدول ۲- تجزیه واریانس پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه بر اساس قابلیت انحلال آن‌ها.

Table 1- Analysis of variance of seed storage proteins based on their solubility.

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	آلبومین Albumin	گلوبولین Globulin	پرولامین Prolamine	گلوتلین Glutelin	کل پروتئین محلول Total soluble protein	گلوتلین/ پرولامین Glutelin/ Prolamine
ژنوتیپ Genotypes	6	33.23 **	61.25 **	66.19 **	24715.17 **	23346.23 **	21096.81 **
خطا Error	14	1.14	2.22	0.32	14.76.78	1403.08	1033.79
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		5.92	18.37	5.93	2.65	2.52	17.41

** معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۱ درصد.

** Significant at 1% probability levels.

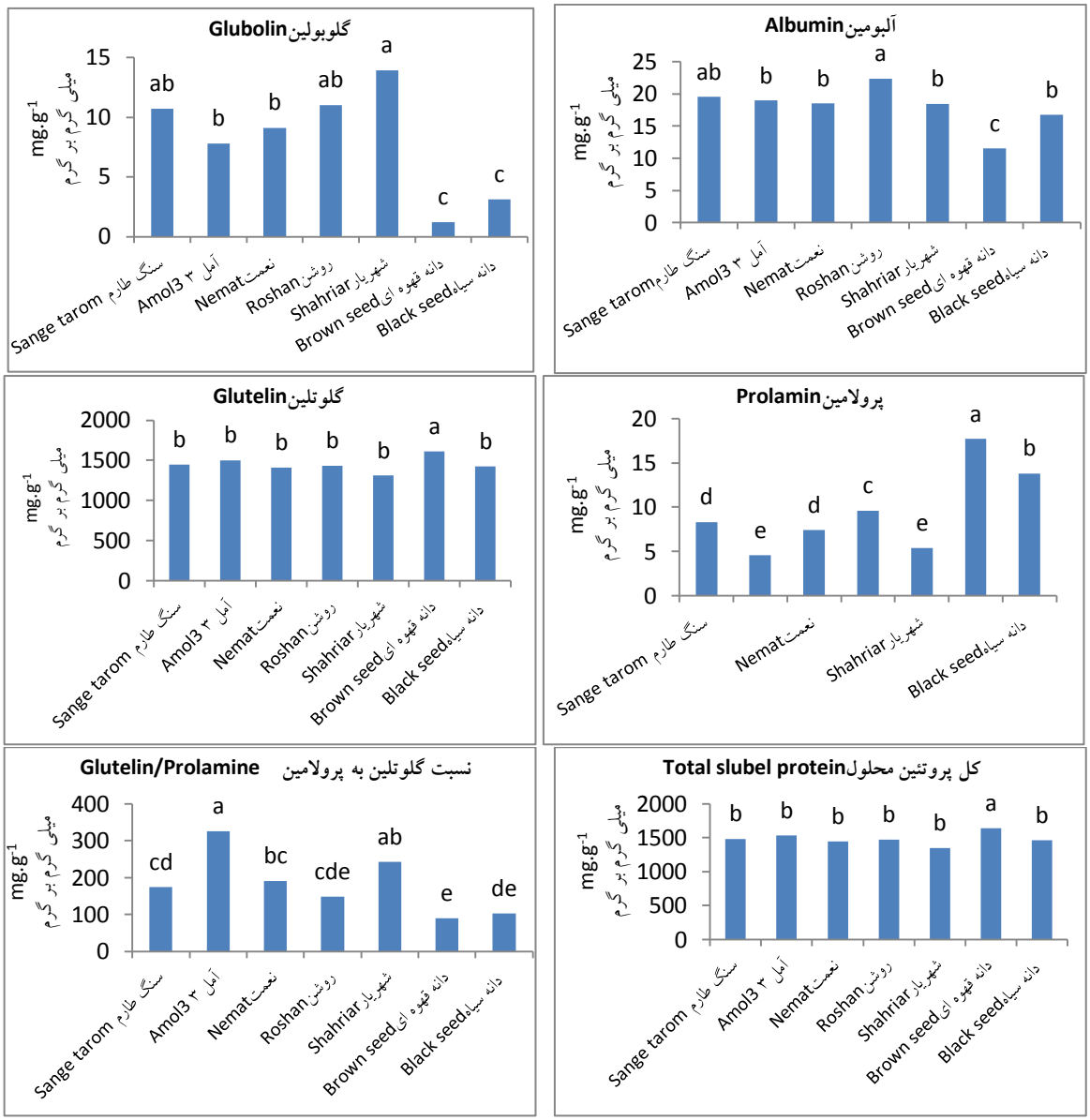
مقایسات میانگین برای این پروتئین‌های در شکل ۲ نشان داد که ارقام سنگ طارم و روشن بیش‌ترین میزان پروتئین آلبومین را دارا بودند (به‌ترتیب ۱۹/۵۳ و ۲۲/۴۰ میلی‌گرم بر گرم). این درحالی است که رقم شهریار بیش‌ترین میزان پروتئین گلوبولین را به خود اختصاص داد (۱۳/۹۵ میلی‌گرم بر گرم). از طرفی دیگر، واریته‌های دانه قهوه‌ای با کم‌ترین میزان آلبومین و گلوبولین (به‌ترتیب ۱۱/۵۲ و ۱/۲۰ میلی‌گرم بر

گرم)، بیش‌ترین میزان پرولامین و گلوتلین را به خود اختصاص داد (به‌ترتیب ۱۶۱۰/۰۰ و ۱۷/۷۰ میلی‌گرم بر گرم). در نهایت از بین ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی واریته دانه قهوه‌ای با بیش‌ترین میزان پروتئین‌های پرولامین و گلوتلین بیش‌ترین میزان پروتئین کل را به خود اختصاص داد (۱۶۴۰/۴۳ میلی‌گرم بر گرم)، تاکنون گزارشات متفاوتی درخصوص میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای در واریته‌های مختلف برنج گزارش شده است (۱).

از بین پروتئین‌های دانه، پروتئین‌های آلبومین و برخی از زیرواحدهای پروتئین گلبولین در بخش لایه آلورون دانه وجود دارند. بنابراین، طی فرآیند سفید کردن دانه و آردسازی بخش زیادی از این پروتئین‌ها توسط سبوس آن تقریبا حذف می‌گردند (۶). این درحالی است که پروتئین‌های پرولامین و گلوتلین در بخش آندوسپرم دانه ذخیره می‌شوند. از بین پروتئین‌های بخش آندوسپرم، گلوتلین‌ها در مقایسه با پرولامین‌ها در لوله گوارش به راحتی هضم می‌شوند. از طرفی دیگر، پروتئین‌های گلوتلین در مقایسه با پروتئین‌های پرولامین غنی از اسید آمینه لایزین نیز می‌باشد. باتوجه به اینکه مهم‌ترین محدودیت در پروتئین‌های دانه برنج مرتبط با میزان اسید آمینه لایزین می‌باشد، بنابراین، در پروتئین‌های دانه برنج ارزش غذایی پروتئین گلوتلین بیش‌تر از پروتئین‌های پرولامین برآورد می‌شود. به‌طوری‌که امروزه در برنامه اصلاحی پروتئین‌های دانه برنج عموما افزایش کیفیت پروتئین‌های دانه (افزایش اسید آمینه لایزین) نسبت به کمیت آن بیش‌تر مورد قرار می‌گیرد (۹). نتایج این تحقیق نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ارقام و کیفی برنج برای پروتئین‌های پرولامین و گلوتلین وجود نداشت. بنابراین، به نظر می‌رسد که می‌توان در برنامه اصلاحی برنج به ارقامی کیفی با ارزش غذایی بالا نیز دست یافت. به‌طوری‌که از بین واریته‌های مورد مطالعه ارقام شهریار و آمل۳ با کم‌ترین میزان پروتئین پرولامین توانستند بیش‌ترین میزان نسبت گلوتلین به پرولامین را به خود اختصاص دهند (به‌ترتیب ۲۴۳/۰۵ و ۳۲۶/۰۸).

الکتروفورز پروتئین‌های دانه: الگوی باندی هر یک از زیرواحدهای پروتئنی در واریته‌های مختلف دانه برنج در شکل ۳ نشان داده شده است. موقعیت هر یک از زیرواحدهای پروتئنی بر اساس وزن مولکولی آن‌ها با گزارشات سایر محققان (۹، ۱۰، ۱۷) مطابقت داده شد. به‌طوری‌که پروتئین‌های پروگلوتلین با دو زیر واحد ۶۰-۵۵ کیلودالتون شناسایی شدند. پروتئین‌های گلوتلین نیز دارای زیرواحدهای اسیدی (۳۵-۳۰ کیلودالتون) و بازی (۲۰- ۱۸ کیلودالتون) بود. پروتئین‌های پرولامین نیز با زیرواحدهای ۱۳-۱۰ کیلودالتون شناسایی شدند.

ارزیابی الگوی باندی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در ژنوتیپ‌های مختلف برنج نشان داد که به‌جز در دو رقم جدید موتانت در دیگر واریته‌های کمی و کیفی برنج این الگوی باندی مشابه بود. مشابه بودن الگوی باندی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه نشان دهنده تنوع ژنتیکی بسیار کم پروتئینی در ارقام کمی و کیفی برنج ایرانی می‌باشد. در این راستا، گزارشات متفاوتی در خصوص ارزیابی تنوع ژنتیکی پروتئین‌های دانه برنج صورت گرفته است. ابوذری گزافرودی و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه الگوی باندی پروتئین‌های دانه در ۴۹ واریته بومی، اصلاحی و خارجی برنج عنوان داشتند که گروه‌بندی بر اساس داده‌های الکتروفورز پروتئین‌های دانه دارای محدودیت بوده و نمی‌تواند معیار کاملی برای تمییز دادن ارقام نزدیک به ویژه ارقام خویشاوند باشد (۱۸).

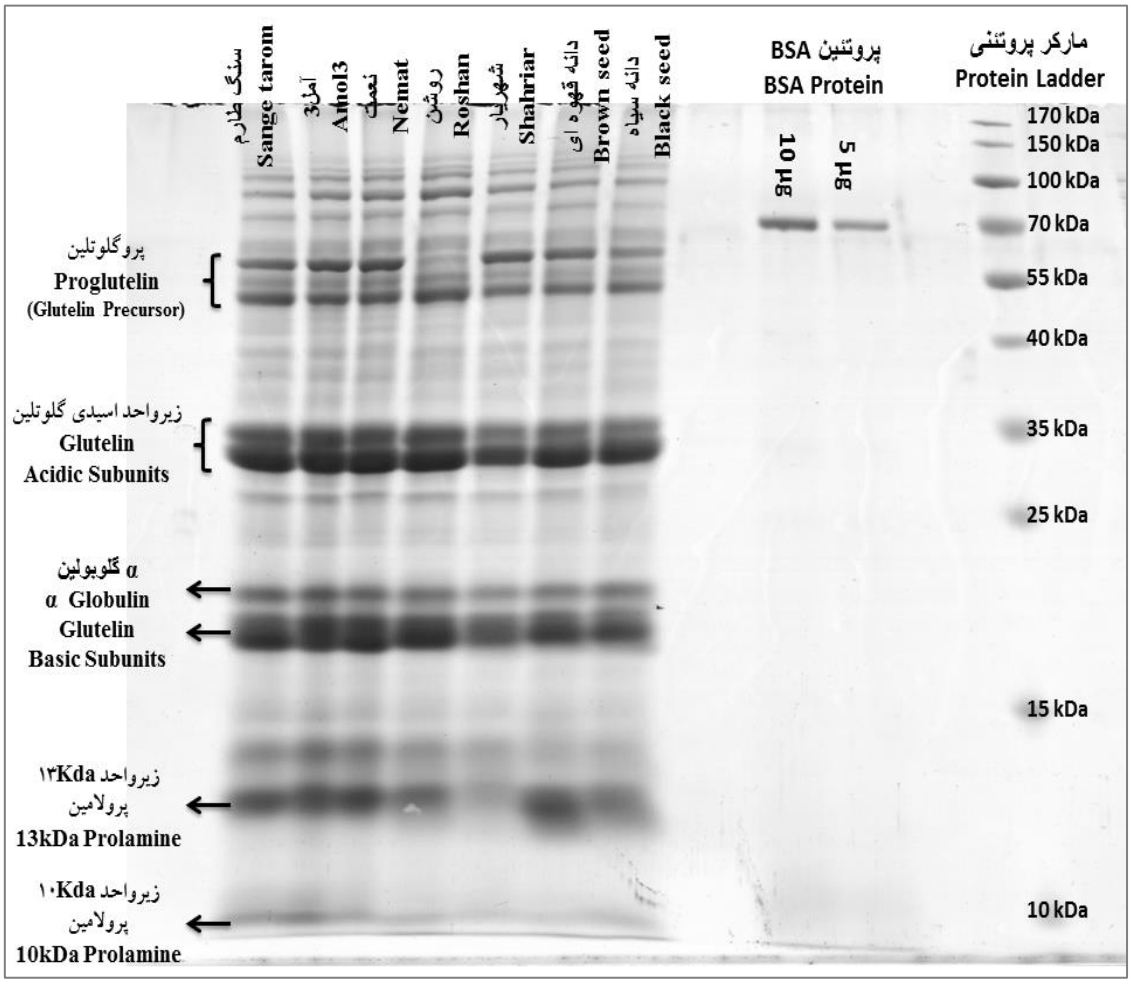


شکل ۲- میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه بر اساس قابلیت انحلال بر حسب میلی‌گرم در هر گرم نمونه در واریته‌های مختلف برنج.

Figure 2- Seed storage protein composition based on their solubility in milligrams per gram of sample in different rice variety.

در ارزیابی تنوع الگوی باندی پروتئین‌های دانه در ۱۰ رقم تجاری در پاکستان نیز بین ارقام کمی و کیفی مختلف اختلاف بسیار پائینی گزارش گردید (۱۹). همچنین، در مطالعه دیگری نیز با ارزیابی ۸۷ لاین اصلاحی برنج در پاکستان تنوع بسیار پائینی برای پروتئین‌های دانه گزارش شده است (۲۰). بنابراین، نتایج این تحقیق و دیگر گزارشات حاکی از این است که بین ارقام مختلف کمی و کیفی برنج تنوع بسیار پائینی برای پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه وجود دارد. این درحالی است که در این تحقیق دو رقم موتانت روشن و شهریار الگوی باندی متفاوتی را بر اساس پروتئین‌های دانه در مقایسه با دیگر ارقام زراعی و همچنین واریته‌های دانه رنگی نشان دادند. به‌طوری‌که زیرواحد ۶۰ کیلودالتون از پروتئین پروگلوتلین در رقم روشن و زیرواحد ۱۳ کیلودالتون از پروتئین پرولامین در رقم شهریار با دیگر ارقام متفاوت بود.

بنابراین، وجود پلیمورفیسم یا چندشکلی این دو الگوی باندی می‌تواند به عنوان مارکرهای پروتئین برای این دو رقم جدید مورد استفاده قرار گیرند.



شکل ۳- پروفایل پروتئین‌های دانه در واریته‌های مختلف دانه برنج.

Figure 3- Seed storage protein profile in different of rice varieties.

از بین روش‌های مختلف اصلاحی، اصلاح موتاسیونی توانسته خزانه ژنی متنوع‌تری را در منابع گیاهی ایجاد کند (۱۳). جهش‌های حاصل از موتاژن‌های شیمیایی و همچنین، پرتوهای یونیزه‌کننده اشعه گاما موجب ایجاد آلل‌های جدید شده که این تغییرات در نهایت باعث تغییر در میزان بیان ژن‌ها و یا حتی تغییر عملکرد آن‌ها خواهد شد (۲۱). برخی از محققین توانسته بودند با تکنیک اصلاح موتاسیونی به لاین‌هایی دست یابند که تنوع بالایی را در الگوی باندی پروتئین‌های دانه داشتند (۱٤، ۲۲، ۲۳، ۲٤).

کمیت سنجی زیراحدهای پروتئینی: نتایج تجزیه واریانس برای هر یک از زیرواحدهای پروتئن‌های دانه نشان داد که اگرچه الگوی باندی پروتئین‌های دانه در ارقام مختلف (به‌جز در دو رقم موتانت روشن و شهریار) نسبتا یکسان بود، اما اختلاف معنی‌داری برای میزان هر یک از زیرواحدهای پروتئینی وجود داشت (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس آنالیز دنسیتومتری زیرواحدهای پروتئینی حاصل از SDS-PAGE.

Table 2- Analysis of variance of densitometry analysis of protein subunits from SDS-PAGE.

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	ژنوتیپ Genotypes	خطا Error	ضریب تغییرات (درصد) CV (%)
زیرواحد 130kDa 130kDa Subunit	6	3941696.96 **	237.44	4.03
زیرواحد 110kDa 110kDa Subunit		4747153.73 **	3731.84	6.54
زیرواحد 90kDa 90kDa Subunit		1275443 **	698.09	16.88
زیرواحد پروگلوتین 60kDa 60kDa Progluteli subunit		7393763.73 **	141445.07	8.18
زیرواحد پروگلوتین 55kDa 55kDa Progluteli subunit		5254890.01 **	8976.81	5.09
زیرواحد اسیدی گلوتین 35kDa 35kDa Glutelin acetic subunit		1289410.41 **	33770.13	7.65
زیرواحد اسیدی گلوتین 30kDa 30kDa Glutelin acetic subunit		6559180.52 **	35252.30	3.79
زیرواحد آلفا گلوبولین 22kDa 22kDa α Globulin subunit		155719.78 **	4473.78	11.92
زیرواحد بازی گلوتین 20kDa 20kDa Glutelin basic subunit		2636986.62 **	10824.80	8.44
زیرواحد بازی گلوتین 18kDa 18kDa Glutelin basic subunit		2895659.69 **	16802.72	5.02
زیرواحد 14kDa 14kDa Subunit		2052473.63 **	7501.56	38.25
زیرواحد پرولامین 13kDa 13kDa Prolamine Subunit		3167887.28 **	74602.13	12.96
زیرواحد پرولامین 10kDa 10kDa Prolamine Subunit		49234.35 **	3089.47	39.28

** Significant at 1% probability levels.

** معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۱ درصد.

در یک مطالعه پروفایل پروتئین‌های دانه در ارقام مختلف زراعی ژاپونیکا و ایندیکا با سه واریته وحشی *Oryza rufipogon*، *Oryza officinalis* و *Oryza meyeriana* با تکنیک دو بعدی (2D) مورد مقایسه قرار گرفتند (۹). نتایج این تحقیق نشان داد که این الگوی باندی در ارقام مختلف زراعی ژاپونیکا و ایندیکا و گونه وحشی *O. rufipogon* یکسان و مشابه بود. این محققین عنوان داشتند که با توجه به پایین بودن تنوع ژنتیکی پروتئین‌های دانه بین ارقام زراعی برنج، گونه‌های خویشاوند می‌توانند منابع ژنتیکی جدیدی را در برنج ایجاد نماید (۹). بنابراین، با توجه به نتایج این تحقیق و دیگر گزارشات می‌توان اینگونه استنباط نمود که تلاقی‌های بین گونه‌ای و اصلاح موتاسیونی می‌توانند در جهت افزایش تنوع ژنتیکی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه برنج مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به محدودیت‌های تلاقی بین گونه‌ای برای ژن‌های نامطلوب زراعی، به نظر می‌رسد اصلاح موتاسیونی می‌تواند ابزار قدرتمندی در جهت ایجاد تنوع و افزایش کیفیت پروتئین‌های دانه در مقایسه با سایر روش‌های کلاسیک مورد استفاده بیشتری قرار گیرد.

نتایج مقایسات میانگین برای این زیرواحدهای پروتئینی در جدول ٤ نشان می‌دهد که رقم جدید روشن بیشترین میزان زیرواحدهای پروتئینی ۱۳۰-۱۱۰ کیلودالتون را دارا بود (۳/۰۹). از پروتئین‌های پروگلوتلین نیز ارقام سنگ طارم، آمل۳، نعمت، شهریار و دانه قهوه‌ای بیش‌ترین زیرواحدهای ٦۰ کیلودالتون و ارقام سنگ طارم و روشن بیش‌ترین زیرواحد ٥٥ کیلودالتون را به خود اختصاص دادند. در صورتی که رقم روشن عدم بیان زیرواحد ٥٥ کیلودالتون پروگلوتلین را نشان داد. برای زیرواحدهای اسیدی (۳۵-۳۰ کیلودالتون) و بازی (۲۰-۱۸ کیلودالتون) گلوتلین نیز رقم زراعی سنگ طارم بیشترین میزان را به خود اختصاص داد (به‌ترتیب ۱۹/۲۳، ٤۳/۱۷، ۸/٤۱ و ۲۳/٥٦). برای پروتئین‌های پرولامین نیز رقم زراعی سنگ طارم و واریته دانه قهوه‌ای بیشترین زیرواحد ۱۳ کیلودالتون و رقم زراعی سنگ طارم بیش‌ترین میزان زیرواحد ۱۰ کیلودالتون را به خود اختصاص دادند (به‌ترتیب ۲۰/۷۳، ۱۸/۲۷ و ۲/۲۲). از طرفی دیگر، بیش‌ترین میزان پروتئین آلفا گلوبولین نیز در رقم سنگ طارم مشاهده شد (٥/۰٥).

مقایسه میانگین پروتئین‌های دانه بر اساس مجموع زیرواحدهای آن‌ها در شکل ٤ نشان داد که رقم سنگ طارم با بیش‌ترین مقدار پروگلوتلین و بیش‌ترین زیرواحدهای اسیدی و بازی گلوتلین بیش‌ترین میزان پروتئین گلوتلین را دارا بود (۱۱۷/۳۳). برای پروتئین‌های پرولامین نیز رقم سنگ طارم و واریته دانه قهوه‌ای بیش‌ترین میزان را دارا بودند (به ترتیب ۲۲/۹٦ و ۱۸/۳۰)، درحالی که رقم شهریار کم‌ترین میزان را به خود اختصاص داد (۰/۰۱). این درحالیست که رقم شهریار با کم‌ترین میزان پروتئین پرولامین توانسته بود بیش‌ترین نسبت پروتئین گلوتلین به پرولامین به خود اختصاص دهد (۲۰۹٥/٤۰). در نهایت از بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، رقم زراعی سنگ طارم که یک رقم کیفی می‌باشد با بیش‌ترین میزان پروتئین گلوتلین و پرولامین بیش‌ترین میزان زیرواحدهای پروتئنی را به خود اختصاص داد، در حالی که رقم شهریار با کم‌ترین میزان پروتئین‌های گلوتلین و پرولامین کم‌ترین میزان زیرواحدهای پروتئنی را دارا بود (به‌ترتیب ۱٥٥/۲٦ و ٤۲/٤۸).

از طرفی دیگر، برخی از مطالعات نشان داده‌اند که تغییر بیان برخی از زیرواحدهای پروتئینی موجب تغییر در بیان زیرواحدهای دیگر می‌شوند (۱٤). به‌طوری‌که با کاهش بیان زیرواحد ۱۰ کیلودالتون پرولامین که غنی از اسیدهای آمینه گوگردی می‌باشد

زیرواحدهای دیگر پرولامین که غنی از اسیدهای آمینه گوگردی می‌باشد افزایش بیان را نشان دادند، این در حالی است که دیگر زیر واحدهای پرولامین که در اسیدهای آمینه گوگردی ضعیف بودند تغییر بیانی نشان ندادند. در تحقیقی دیگر وقتی که یک پروتئین غنی از گوگرد از آفتابگردان (*Helianthus annuus*) در آندوسپرم دانه برنج بیان شد، اگرچه بیان برخی از پروتئین‌های دانه برنج تغییر کرد اما میزان کل اسیدهای آمینه گوگردی تغییری نداشتند (۲۵). همچنین، در برخی از مطالعات نشان داده شده است که با کاهش بیان پروتئین ۱۳ کیلودالتون پرولامین که در اسیدهای آمینه گوگردی ضعیف می‌باشد، میزان بیان پروتئین‌های گلوتلین افزایش یافت. این محققین عنوان داشتند که با توجه به بالا بودن میزان اسید آمینه لایزین در پروتئین گلوتلین در نتیجه میزان اسید آمینه لایزین آن افزایش یافته بود (۱۴). در مطالعه دیگر در کشور کره جنوبی با تکنیک RNA interference بیان زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پروتئین پرولامین را در آندوسپرم دانه برنج خاموش نمودند و گزارش کردند با توجه به جبران کاهش پروتئین پرولامین، میزان بیان پروتئین گلوتلین افزایش یافت، که این افزایش بیان منجر به افزایش ۲۸ درصدی اسید آمینه لایزین نیز شده بود (۱۰). با توجه به این گزارش‌ها، این‌گونه به نظر می‌رسد که در دانه برنج برای زیرواحدهای پروتئینی و میزان اسیدهای آمینه تعادلی وجود دارد (۱۴). در این تحقیق نیز اگرچه رقم جدید روشن عدم حضور زیرواحد ۶۰ کیلودالتون از پروتئین پروگلوتلین را دارا بود، اما با افزایش بیان زیرواحد ۵۵ و ۱۸ کیلودالتونی گلوتلین در نهایت در میزان کل پروتئین‌های گلوتلین تفاوت معنی‌داری را با والد مادری خود (نعمت) نشان نداد (شکل ٤). از طرفی دیگر، بین پروتئین‌های پرولامین و گلوتلین نیز ارتباط معکوسی گزارش شده است (۱۷)، به‌طوری‌که نسبت گلوتلین به پرولامین را شاخصی جهت ارزیابی کیفیت پروتئین‌های دانه در برنج را در نظر می‌گیرند (۱٤). اما در یک مطالعه با ارزیابی ژنوتیپی از برنج که میزان گلوتلین پائینی داشت و در آن زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین نیز بیان نمی‌شد مشاهده شد نه تنها میزان اسید آمینه لایزین آن کاهش نیافته بود بلکه میزان آن در مقایسه با لاین مادری خود افزایش یافته بود. در این ژنوتیپ با کاهش پروتئین‌های گلوتلین و زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین، پروتئین‌های دیگری مانند گلوبولین و برخی از پروتئین‌های چاپرونی Bip (Chaperone Binding Protein) که در تعیین ساختار دوم پروتئین‌های دانه دخیل هستند افزایش بیان داشتند. آن‌ها گزارش کردند که علاوه بر گلوتلین پروتئین‌های دیگری نظیر گلوبولین و Bip دارای اسید آمینه لایزین نسبتا بالایی نیز می‌باشند. به‌طوری‌که این افزایش بیان توانسته بود میزان اسیدآمینه لایزین را به‌طور نسبی افزایش دهد (۱٤). بنابراین، این طور به نظر می‌رسد که صرف نظر از میزان پروتئین کل ارتباط نزدیکی بین پروتئین‌های مختلف دانه با میزان اسیدآمینه لایزین وجود دارد. در این تحقیق نیز رقم شهریار اگرچه کم‌ترین میزان پروتئین را دارا بود، اما بالاترین نسبت گلوتلین به پرولامین را به خود اختصاص داده بود. از طرفی، این رقم (شهریار) با عدم بیان زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین، بیش‌ترین میزان پروتئین گلوبولین را نیز به خود اختصاص داده بود. بنابراین، از آنجایی که بین پروتئین‌های دانه با زیرواحدهای پروتئنی به خصوص زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین ارتباط معنی‌داری گزارش شده است، لذا می‌بایست جهت درک بهتر از کیفیت پروتئین‌های دانه کمیت اسیدهای آمینه به خصوص اسید آمینه لایزین نیز در ارقام مختلف رایج زراعی ایران به خصوص رقم جدید شهریار مورد مطالعات بیش‌تری قرار گیرد.

جدول ٤- مقایسات میانگین آنالیز دنسیتومتری زیرواحدهای پروتئینی حاصل از SDS-PAGE.

Table 3- Main comparisons of densitometry analysis of protein subunits from SDS-PAGE.

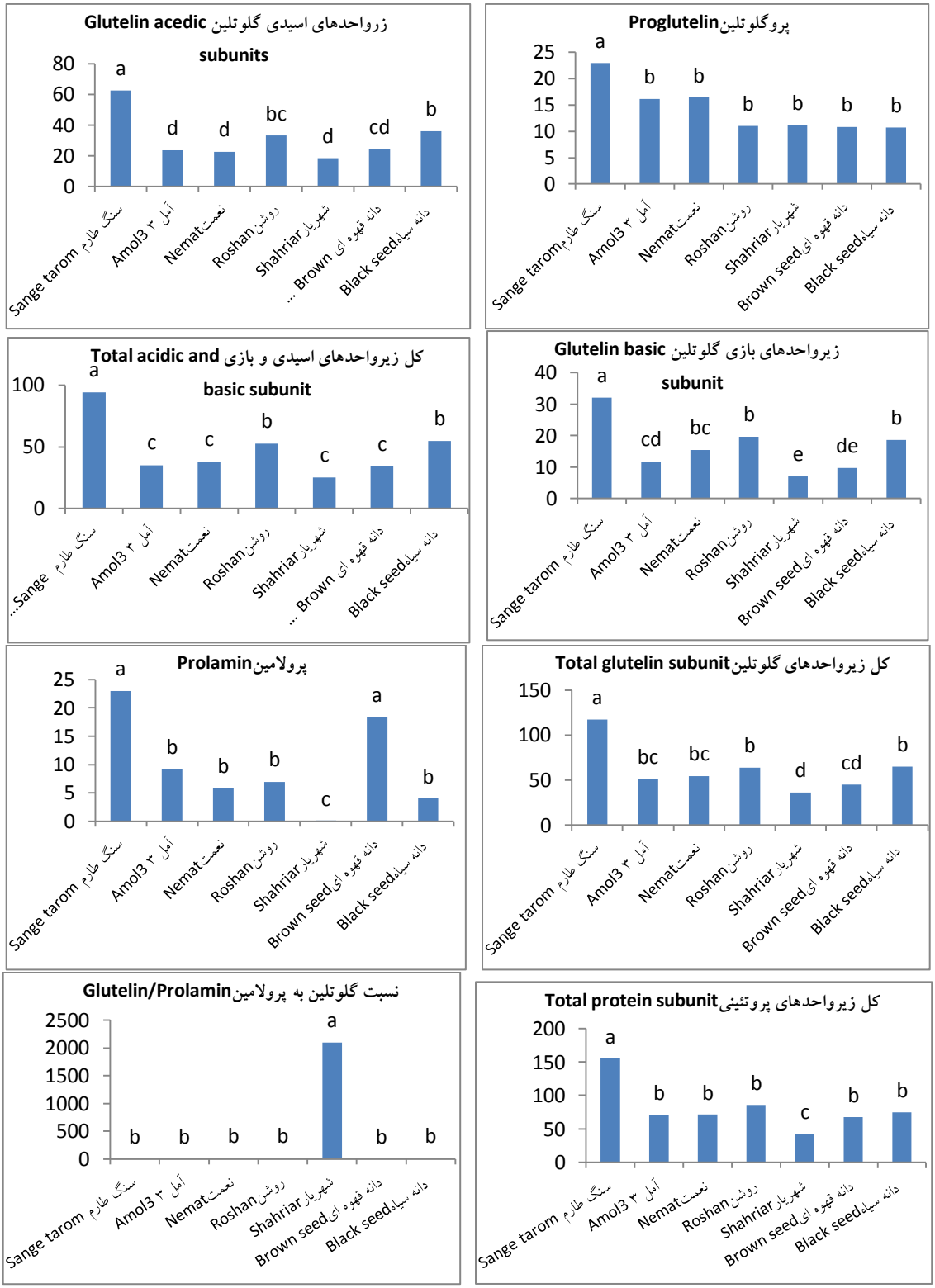
ژنوتیپ‌ها Genotypes	زیرواحد ۱۳۰کیلودالتونی 130kDa Subunit	زیرواحد ۱۱۰کیلودالتونی 110kDa Subunit	زیرواحد ۹۰کیلودالتونی 90kDa Subunit	زیرواحد پروگلوتین ۶۰کیلودالتونی 60kDa Proglutelin subunit	زیرواحد پروگلوتین ۵۵کیلودالتونی 55kDa Proglutelin subunit	زیرواحد گلوتین اسیدی ۳۵کیلودالتونی 35kDa Glutelin acetic subunit	زیرواحد گلوتین اسیدی ۳۰کیلودالتونی 30kDa Glutelin acetic subunit	زیرواحد گلوبولین ۲۲کیلودالتونی 22kDa α Globulin subunit	زیرواحد گلوتین بازی ۲۰کیلودالتونی 20kDa Glutelin basic subunit	زیرواحد گلوتین بازی ۱۸کیلودالتونی 18kDa Glutelin basic subunit	زیرواحد ۱۴کیلودالتونی 14kDa Subunit	زیرواحد پروتئازی ۱۳کیلودالتونی 13kDa Protamine Subunit	زیرواحد پروتئازی ۱۰کیلودالتونی 10kDa Protamine Subunit
سنگ طارم Sange tarom	225.07 ^{b}	282.96 ^{cd}	113.93 ^{ab}	1380.62 ^{a}	1718.60 ^{a}	2596.06 ^{a}	5828.08 ^{a}	682.36 ^{a}	1135.76 ^{a}	3180.73 ^{a}	714.71 ^{a}	2799.73 ^{a}	299.92 ^{a}
آمل ۳ Amol3	251.12 ^{b}	375.65 ^{cd}	163.35 ^{a}	1258.88 ^{a}	918.52 ^{bc}	1229.62 ^{bc}	1940.72 ^{c}	458.12 ^{ab}	925.89 ^{ab}	658.29 ^{cd}	132.94 ^{b}	1012.55 ^{b}	233.90 ^{ab}
نعمت Nemat	265.66 ^{b}	781.40 ^{b}	182.18 ^{a}	1114.51 ^{a}	1096.97 ^{b}	1303.34 ^{bc}	1743.52 ^{c}	226.88 ^{bc}	883.37 ^{ab}	1202.55 ^{c}	20.68 ^{b}	767.76 ^{b}	20.93 ^{b}
روشن Roshan	418.09 ^{a}	1326.73 ^{a}	62.81 ^{ab}	0.00 ^{c}	1491.80 ^{a}	1892.22 ^{ab}	2560.05 ^{c}	229.13 ^{bc}	754.52 ^{abc}	1903.18 ^{b}	42.07 ^{b}	933.37 ^{b}	7.12 ^{b}
شهریار Shahriar	212.26 ^{b}	502.19 ^{c}	36.25 ^{b}	912.89 ^{a}	594.07 ^{c}	715.26 ^{c}	1746.52 ^{c}	54.66 ^{c}	451.27 ^{bc}	503.36 ^{d}	4.83 ^{b}	1.00 ^{c}	1.34 ^{b}
X1 (دانه قهوه‌ای) Brown seed	98.83 ^{c}	337.78 ^{cd}	66.99 ^{ab}	838.97 ^{a}	621.76 ^{c}	817.71 ^{c}	2460.52 ^{c}	116.09 ^{c}	535.99 ^{bc}	783.57 ^{cd}	1.32 ^{b}	2467.38 ^{a}	3.80 ^{b}
X2 (دانه سیاه) Black seed	72.40 ^{c}	170.11 ^{d}	6.92 ^{b}	365.91 ^{b}	1083.22 ^{b}	1153.20 ^{b}	3713.03 ^{b}	499.58 ^{ab}	297.34 ^{c}	2207.77 ^{b}	0.78 ^{b}	535.42 ^{b}	4.86 ^{b}

محاسبه هر یک از زیرواحدهای پروتئینی در نرم افزار Melani V.6 بر حسب Volume نسبت به کل زیرواحدهای پروتئینی از طریق معیار $\frac{\text{volume}}{\sum_{s=1}^{n}\text{Volumes}} \times 100$ محاسبه شد.

میانگین حروف مشابه در هر ستون از لحاظ آماری در آزمون LSD در سطح احتمال آماری ۵ درصد در یک گروه قرار دارند.

The calculation of each protein subunit in Melani V.6 software is calculated in terms of volume relative to the total protein subunits using the formula $\frac{\text{volume}}{\sum_{s=1}^{n}\text{Volumes}} \times 100$.

Means followed by the similar letters in each column are not significantly different by LSD test at 5%probability level.



شکل ٤- میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه بر حسب مجموع زیرواحدهای پروتئینی حاصل از آنالیز دنسیتومتری.

Table 4- The amount of grain storage proteins in terms of the sum of protein subunits obtained from densitometric analysis.

در خصوص ارتباط میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای با کیفیت آندوسپرم دانه نیز گزارشات مختلفی ارائه شده است. در یک پروژه تحقیقاتی لاین‌های موتانت در برنج شناسایی شده‌اند که اگرچه میزان اسید آمینه لایزین بالایی داشتند، اما آندوسپرم آن‌ها چسبنده و آردی بود (۲٤). از طرف دیگر، ژنوتیپ‌هایی از برنج شناسایی شدند که با وجود کاهش بیان زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین آندوسپرم شیشه‌ای داشته و از نظر محتوی نشاسته نیز با والد مادری خود تفاوتی نداشتند (۱٤). همچنین، نتایج نشان داده است که گرانول‌های نشاسته در آمیلوپلاست و پروتئین‌های دانه در اجسام پروتئنی BP (Protein Body) دانه ذخیره شده و از آنجایی که گرانول‌های نشاسته قبل از شکل‌گیری اجسام پروتئینی تشکیل می‌شوند، بنابراین، بین آن‌ها اثرات متقابلی وجود ندارد (۲٦). از طرفی، بین زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین با پروتئین‌های گلوتلین و گلوبولین و همچنین آندوسپرم شیشه‌ای نیز ارتباط منفی گزارش شده است، به‌طوری‌که عدم بیان این زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین را مهم‌ترین هدف در جهت افزایش کیفیت پروتئین‌های دانه برنج در نظر می‌گیرند (۱٤). در رقم موتانت شهریار که زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین بیان نمی‌شد نیز کیفیت پخت در مقایسه با والد مادری خود (آمل۳) افزایش یافته بود (شکل ۱). همچنین، در این رقم با وجود اینکه کم‌ترین میزان پروتئین را دارا بود، اما بیش‌ترین میزان پروتئین گلوبولین و بیش‌ترین نسبت گلوتلین به پرولامین را نیز به خود اختصاص داده بود. بنابراین، پیشنهاد می‌شود این رقم در خصوص میزان اسید آمینه لایزین مورد مطالعات بیش‌تری قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که واریته دانه قهوه‌ای در مقایسه با ارقام مختلف کمی و کیفی در این تحقیق بیش‌ترین میزان پروتئین‌های قابل حل را به خود اختصاص داد. رقم کیفی سنگ طارم بیش‌ترین زیرواحدهای پرولامین و گلوتلین را در پروفایل پروتئین‌های دانه نشان داد. این درحالی بود که رقم موتانت شهریار کم‌ترین میزان پروتئین پرولامین و کم‌ترین زیرواحد ۱۳ کیلودالتون از پروتئین‌های پرولامین را به خود اختصاص داده بود. همچنین، نتایج این تحقیق نشان داد که اگرچه پروفایل پروتئین‌های دانه در واریته‌های مختلف برنج یکسان و مشابه است، اما این الگو در دو رقم موتانت روشن و شهریار متفاوت می‌باشد، به‌طوری‌که عدم بیان زیرواحدهای ٦۰ کیلودالتون پروگلوتلین و زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین می‌توانند به‌عنوان مارکرهای پروتئینی به ترتیب در دو رقم روشن و شهریار مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، این نتایج نشان داد که بین زیرواحدهای پروتئنی و میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای نیز ارتباط معنی‌داری وجود دارد، به‌طوری‌که اگرچه زیرواحد ٦۰ کیلودالتون گلوتلین در رقم روشن بیان نشد، اما با افزایش دیگر زیرواحدهای گلوتلین در نهایت باعث شد این رقم تفاوت معنی‌داری را در میزان پروتئین گلوتلین با والد مادری خود نشان ندهد. اگرچه در رقم شهریار زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین بیان نشد، اما میزان پروتئین گلوبولین آن به طور معنی‌داری افزایش یافت. از آنجایی که بین پروتئین‌های دانه با زیرواحدهای پروتئینی به خصوص زیرواحد ۱۳ کیلودالتون پرولامین ارتباط معنی‌داری حاصل شده است، لذا پیشنهاد می‌شود که کمیت اسیدهای آمینه به خصوص اسید آمینه لایزین در ارقام مختلف مورد مطالات بیش‌تری قرار گیرد. از طرف دیگر، نتایج این تحقیق نشان داد که احتمالا بین پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه با ارقام کمی و کیفی ارتباط معنی‌داری وجود نداشت، بنابراین به نظر می‌رسد که احتمالا اصلاح کیفیت پروتئین‌های دانه محدودیتی را برای اصلاح ارقام جدید با خصوصیات کمی و کیفی مطلوب ایجاد نخواهد کرد.

References

1. Chen, P., Shen, Z., Ming, L., Li, Y., Dan, W., Lou, G. and Zhao, D. 2018. Genetic basis of variation in rice seed storage protein (Albumin, Globulin, Prolamine, and Glutelin) content revealed by genome-wide association analysis. Front. Plant Sci. 9: 612. 1-15.
2. Shewry, P.R., Halford, N.G., Belton, P.S. and Tatham, A.S. 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biol. Sci. 357: 1418.133-142.
3. Khush, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. Plant Mol. Biol. 35: 1-2. 25-34.
4. Osborne, T.B. 1924. The vegetable proteins. Longmans, Green and Co., London. Pp: xiii-154.
5. Kawakatsu, T., Yamamoto, M.P., Hirose, S., Yano, M. and Takaiwa, F. 2008. Characterization of a new rice glutelin gene GluD-1 expressed in the starchy endosperm. J. Exp. Bot. 59: 15. 4233-4245.
6. Shewry, P.R. 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. J. Cereal Sci. 46: 3. 239-250.
7. Sarker, S.C., Ogawa, M., Takahashi, M.A. and Asada, K. 1986. The processing of a 57kDa precursor peptide to subunits of rice glutelin. PCP. 27: 8. 1579-1586.
8. Muench, D.G., Ogawa, M., Okita, T.W. 1999. The prolamines of rice. P 93-108, In: Shewry P, Casey R, (eds). Seed proteins. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
9. Jiang, C., Cheng, Z., Zhang, C., Yu, T., Zhong, Q., Shen, J.Q. and Huang, X. 2014. Proteomic analysis of seed storage proteins in wild rice species of the Oryza genus. Proteome sci. 12: 51. 1-12.
10. Kim, H.J., Lee, J.Y., Yoon, U.H., Lim, S.H. and Kim, Y.M. 2013. Effects of reduced prolamine on seed storage protein composition and the nutritional quality of rice. Int. J. Mol. Sci. 14: 8. 17073-17084.
11. Ren, Y., Wang, Y., Liu, F., Zhou, K., Ding, Y., Zhou, F. and Ma, W. 2014. Glutelin precursor accumulation3 encodes a regulator of post-Golgi vesicular traffic essential for vacuolar protein sorting in rice endosperm. Plant Cell. 26: 1. 410-425.
12. Wang, Y., Zhu, S., Liu, S., Jiang, L., Chen, L., Ren, Y. and Liu, X. 2009. The vacuolar processing enzyme OsVPE1 is required for efficient glutelin processing in rice. TPJ. 58: 4. 606-617.
13. Bagheri, I., Alizadeh, M.R. and Safari, M. 2013. Varietal differences in physical and milling properties of paddy grains. Int. J. Agric. Crop Sci. 5: 6. 606-611.
14. Kawakatsu, T., Hirose, S., Yasuda, H. and Takaiwa, F. 2010. Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. Plant Physiol. 154: 4. 1842-1854.
15. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72: 680-685.
16. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 5259. 680-685.
17. Iida, S., Takano, T., Tsubaki, K., Ikezawa, Z. and Nishio, T. 1993. Evaluation of a rice mutant as a material of hypoallergenic rice. J. J. Breed. 43: 3. 389-394.
18. Abouzari Gazafroudi, A., Rabiei. B., Honarnezhad. R. and Pourmoradi, S. 2007. An investigation of selection indices in rice (*Oryza sativa* L.) varieties. J. Agric. Sci. 38: 1. 93-103. (In Persian)
19. Galani, S., Naz, F., Soomro, F., Jamil, I., Azhar, A. and Ashraf, A. 2011. Seed storage protein polymorphism in ten elite rice *(Oryza sativa* L.) genotypes of Sindh. African J. Biotechnol. 10: 7. 1106-1111.
20. Khan, S.A., Shinwari, Z.K. and Rabbani, M.A. 2013. Study of total seed protein pattern of rice (*Oryza sativa* L.) breeding lines of Pakistan through SDS-PAGE. Pak. J. Bot. 45: 3. 871-876.

21. Anbarasan, K., Rajendran, R., Sivalingam, D., Anbazhagan, M. and Chidambaram, A. 2013. Effect of gamma radiation on seed germination and seedling growth of Sesame (*Sesamum indicum.* L) Var. TMV3. Int. J. Bot. 3: 2. 27-29.
22. Krishnan, H.B., White, J.A. and Pueppke, S.G. 1992. Characterization and localization of rice (*Oryza sativa* L.) seed globulins. Plant Sci. J. 81: 1. 1-11.
23. Kusaba, M., Miyahara, K., Iida, S., Fukuoka, H., Takano, T., Sassa, H. and Nishio, T. 2003. Low glutelin content1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multi gene family via RNA silencing in rice. Plant Cell. 15: 6. 1455-1467.
24. Schaeffer, G.W. and Sharpe, F.T. 1987. Increased lysine and seed storage protein in rice plants recovered from calli selected with inhibitory levels of lysine plus threonine and S-(2-aminoethyl) cysteine. Plant Physiol. 84: 2. 509-515.
25. Hagan, N., Upadhyaya, N., Tabe, L. and Higgins, T. 2003. The redistribution of protein sulfur in transgenic rice expressing a gene for a foreign, sulfur-rich protein. The Plant J. 34: 1. 1-11.
26. Gibbon, B.C., Wang, X. and Larkins, B.A. 2003. Altered starch structure is associated with endosperm modification in quality protein maize. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 26. 15329-15334.