نشریه پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد ۱، شماره ۱، صفحه ۶۴-۵۷، نیمه اول ۱۳۸۹

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 1, No. 1, 2010, p. 57-64

بررسی نقش احتمالی ژن فسفوانول پیروات کربوکسی‌کیناز در میزان پروتئین دانه در برخی از ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer arietinum.* L)

ماریا بیهقی[1*]، عبدالرضا باقری[2]، احمدرضا بهرامی[3]، فرج‌الله شهریاری[4] و احمد نظامی[2]

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی
۲- اعضای هیأت علمی دانشکده‌ی کشاورزی و پژوهشکده‌ی علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- عضو هیأت علمی دانشکده‌ی علوم دانشگاه فردوسی مشهد
۴- عضو هیأت علمی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۶/۰۹

چکیده

ژن *pepck*، پروتئین فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز را کُد می‌کند که در طی واکنش گلوکونئوژنز نقش اساسی دارد. اخیراً معلوم شده است که این آنزیم علاوه بر تأمین گلوکز، دارای وظایف دیگری نیز می‌باشد. با توجه به این‌که یکی از عوامل مهم در ارزش غذایی بقولات، درصد پروتئین موجود در دانه آن‌ها می‌باشد، لذا توجه محققان به بررسی نقش احتمالی آنزیم PEPCK در متابولیسم نیتروژن و ترکیبات نیتروژنه به فرم‌های پروتئین در دانه این گیاهان معطوف شده است. در این تحقیق، بیان ژن *pepck* در رشد و نمو گیاه نخود و تأثیر آن در پُرشدن و افزایش میزان پروتئین دانه مورد بررسی قرار گرفته است. به منظور مطالعه بیان ژن *pepck* در افزایش میزان پروتئین دانه گیاه نخود، ابتدا پس از اندازه‌گیری درصد پروتئین دانه در ۲۰ ژنوتیپ از نخود زراعی، تعدادی بذر سالم و یکنواخت از ژنوتیپ‌های دارای حداقل (MCC291 و MCC373) و حداکثر (MCC053 و MCC458) مقدار پروتئین، انتخاب و میزان بیان ژن *pepck* در آن‌ها با روش RT-PCR مشخص شد. با توجه به تکثیر باندهای ۴۰۰ و ۵۰۰ جفت بازی، تنها در ژنوتیپ‌های حداکثر پروتئین، احتمال می‌رود این آنزیم دارای دو ایزوفرم باشد که هردو فرم آن، در ژنوتیپ‌های با پروتئین بالا بیان می‌شوند در حالی‌که در ژنوتیپ‌های با حداقل پروتئین، هیچ‌کدام از این دو فرم بیان نمی‌شوند. بنابراین با توجه به این نتایج ممکن است بتوان تفاوت در بیان را به نقش احتمالی این آنزیم در پُرشدن و افزایش ظرفیت دانه نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز، متابولیسم نیتروژن، PEPCK

مقدمه

نخود (*Cicer arietinume* L.) یکی از مهم‌ترین بقولات دانه‌ای در غرب آسیا، شمال آفریقا، جنوب اروپا، آمریکای مرکزی و جنوب استرالیا می‌باشد. این گیاه در بین حبوبات از لحاظ سطح زیرکشت، مقام سوم را در جهان به خود اختصاص داده است. دانه‌های این گیاه، منبع خوبی از نظر کربوهیدرات (۶۷/۶-۴۸/۲درصد)، پروتئین (۳۱/۵-۱۲/۴درصد)، نشاسته (۵۰-۴۱درصد)، اسیدهای چرب (۶درصد)، ویتامین‌های گروهB و مواد مغذی می‌باشد (Icriast, 2005). همچنین با توجه به غنی بودن آن از نظر برخی از اسیدهای آمینه، به‌ویژه اسیدآمینه لیزین ، به عنوان مکمل غذایی با غلات توصیه شده است.

با بررسی ژن‌هایی که به نحوی در پُرشدن و افزایش میزان پروتئین دانه‌ی نخود نقش دارند، می‌توان گیاه تراریختی را تولید کرد که به نحوی میزان بیان این ژن‌ها در آن افزایش یافته و ارزش غذایی دانه بهبود یابد. از جمله ژن‌های مورد بررسی، ژن فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز (*pepck*) می‌باشد. این ژن، پروتئینی را کُد می‌کند که در مسیر گلوکونئوژنز نقش اساسی دارد. این پروتئین در واکنش تبدیل شدن اگزالواستات به فسفوانول پیروات به عنوان کاتالیزور عمل می‌کند و PEP تولید شده در طی واکنش‌هایی مجدداً به قند تبدیل می‌شود (Ruffner, 1975; 1982 & Leegood, 1999). بنابراین با افزایش فعالیت PEPCK میزان اسیدهای آلی، کاهش و قند گیاه افزایش می‌یابد (Malone, 2007). اخیراً نقش احتمالی آنزیم PEPCK، در متابولیسم نیتروژن و ترکیبات نیتروژن‌دار و تبدیل آن‌ها به فرم‌های پروتئینی در

* **نویسنده مسئول:** دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی، پُست الکترونیک: maria_beihaghi@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

دانه برخی بقولات گزارش شده است (Aivalakis, *et al.* 2003). این ژن در رشد دانه‌های نخود فرنگی (*Pisum sativum*)، ذخیره نیتروژن، پُرشدن دانه و افزایش میزان اسیدهای آمینه از جمله آسپاراژین نقش دارد. در بذر بقولات، پوسته‌ی دانه به عنوان بافتی است که حاوی مقادیر فراوانی آنزیم‌های انتقال‌دهنده‌ی نیتروژن و اینورتاز می‌باشد. این آنزیم‌ها در متابولیسم اسیدهای آمینه و هیدرات‌های کربن نقش دارند. ارتباط میان PEPCK و متابولیسم اسیدهای آمینه و آمیدها نشان می‌دهد که PEPCK در پوسته بذر و کوتیلدون نسبت به سایر آنزیم‌ها به حضور ترکیبات نیتروژنه بسیار حساس می‌باشد و میزان آن در پوسته بذر نخودفرنگی، تحت تأثیر نیترات، آمونیوم و آسپاراژین و در کوتیلدون، تنها تحت تأثیر آسپاراژین قرار می‌گیرد (Icrisat, 2005). افزایش مقدار این آنزیم، با افزایش میزان آنزیم‌های درگیر در متابولیسم اسیدهای آمینه از جمله، آسپاراژین آمینو ترانسفراز میتوکندریایی، آلانین آمینو ترانسفراز سیتوزولی و استیل کوانزیمآ کربوکسیلاز، همراه است که به این نحو در متابولیسم، جذب و انتقال ترکیبات نیتروژنه سهم به‌سزایی دارد (Walker, *et al.* 2003).

تاکنون در مورد بیان این ژن و نقش آن در نخود، گزارشی ارائه نشده است. به این منظور در تحقیق حاضر، ابتدا درصد پروتئین در برخی از ژنوتیپ‌های نخود زراعی مورد بررسی قرار گرفت و سپس میزان بیان ژن *pepck* در مراحل مختلف پُرشدن دانه، در بعضی از آن‌ها تعیین و با یکدیگر مقایسه شد. امید است در ادامه‌ی این بررسی بتوان با استفاده از نتایج این مطالعه به نقش این ژن در افزایش میزان اسیدهای آمینه در نخود پی بُرد و در بلندمدت با انجام آزمایشات تکمیلی بر روی ژنوتیپ‌های بیشتر، از دستورزی در ژنوتیپ‌ها برای بهبود کیفیت پروتئین این گیاه اقدام نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اندازه‌گیری درصد پروتئین خام

نمونه‌های گیاهی، ۲۰ ژنوتیپ نخود زراعی بود که از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید (جدول۲) و سپس ارزیابی تخمین میزان پروتئین موجود در دانه‌ی این ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش کجلدال صورت گرفت.

کشت مواد گیاهی، استخراج RNA و بررسی کیفیت RNA استخراج شده

تعدادی بذر سالم و یکنواخت از چهار ژنوتیپ که دارای حداقل و حداکثر پروتئین بودند (ژنوتیپ‌های MCC373 و MCC291 به عنوان حداقل و ژنوتیپ‌های MCC458 و MCC053 به عنوان حداکثر) انتخاب و به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۵ درصد قرار داده شدند. سپس با قرار دادن آن‌ها بین دو لایه پارچه ضدعفونی شده‌ی مرطوب، تحت شرایط آزمایشگاه جوانه‌دار شدند. در مرحله بعد، بذرهای جوانه‌دار شده در گلدان‌هایی به ابعاد ۱۲×۱۲×۱۲ سانتی‌متر و حاوی مقادیر مساوی رُس، خاک‌برگ و شن، در عمق ۴-۳ سانتی‌متری خاک در گلخانه کشت شدند. گیاهان تا مرحله تکوین دانه در شرایط فوق نگهداری شدند.

به منظور بررسی و مطالعه اهمیت حضور ژن *pepck* در افزایش میزان پروتئین دانه از روش RT-PCR استفاده شد. به این منظور ابتدا RNA کل حاصل از دانه‌های در حال رسیدن نمونه‌های دارای حداقل (L) و حداکثر (H) پروتئین با استفاده از روش گوانیدین تیوسیانات استخراج گردید (Carnel, *et al.* 2003). سپس به منظور اطمینان از کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از دو روش استفاده گردید: روش اول، بررسی از طریق الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز و روش دوم، بررسی نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از طریق اسپکتروفتومتری صورت گرفت. پس از اطمینان از غلظت مناسب RNA، میزان لازم برای انجام واکنش RT-PCR تعیین گردید.

بررسی بیان ژن در سطح mRNA با استفاده از روش RT-PCR

جهت بررسی بیان ژن *pepck* در نمونه‌های نخود از آغازگرهای طراحی‌شده توسط نرم افزار[1] Primer premier 0.5 استفاده شد. برای این منظور یک جفت آغازگر مبتنی بر نواحی محافظت‌شده ترادف نوکلئوتیدهای ژن کُدکننده‌ی پروتئین PEPCK در گیاهان یونجه[2] (*Medicago truncatula*)، گوجه فرنگی[3] (*Solanum lycopersicum*) و فلاوریا[4] (*Flaveria trinervia*)، طراحی گردید و جفت آغازگر دیگر نیز بر اساس توالی گوجه‌فرنگی و یونجه با تأکید بر توالی یونجه به دلیل قرابت بیشتر با گیاه نخود طراحی گردید که جفت آغازگر اول با شماره ۱ و ۲ و جفت آغازگر دوم با شماره ۳ و ۴ در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است. کلیه آغازگرها با توجه به غلظت مورد نظر (۱۰ پیکومول در میکرولیتر) با آب مقطر استریل رقیق شدند.

[1] http://www.tucows.com/preview/205452
[2] [NCBI; http://.www.ncbi.nih.gov]; NCBI code AF212109.1
[3] NCBI code AF327432.1
[4] NCBI code AB050473.1

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی مربوط به *pepck*

Table 1. The sequence of *pepck* specific primers

آغازگر primer	جهت Point		توالی sequence
1	رفت	forward	´5 GAAATCGGCACCTTCTAC 3´
2	برگشت	reverse	´5 CCTCATCCCTAACAACACG 3´
3	رفت	forward	´5 GAAATCGGCACCCACTAC 3´
4	برگشت	reverse	´5 CCTTATCCTTAACCACACG 3´

ساخت cDNA طبق دستورالعمل شرکت Fermentas صورت گرفت. ابتدا ۰/۴ میکروگرم RNA الگو با ۱ میکرولیتر آغازگر اختصاصی برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر و ۸ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. به منظور واسرشت‌سازی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در دستگاه PCR قرار داده شد و بلافاصله بر روی یخ، سرد گردید. سپس به آن ۴ میکرولیتر بافر RT-PCR (۵X)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ میلی‌مولار) و بازدارنده RNase (۲۰ واحد) اضافه گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت به آن ۲۰۰ واحد (۱میکرولیتر) آنزیم M-MLV Reverse transcriptase، افزوده شد.

میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Biometra) با برنامه حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴ درجه سانتی‌گراد به منظور خنک شدن قرار داده شدند. cDNA حاصل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و ذخیره شد.

واکنش RT-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر تنظیم گردید. به این ترتیب، در هر واکنش، از ترکیب ۲ میکرولیتر محصول رشته اول cDNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۱/۲۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، و ۱۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استفاده شد. همچنین واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با ترکیب فوق و با ۱ میکرولیتر DNA الگو انجام گرفت. برنامه حرارتی نیز به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳ دقیقه برای چرخه اول و در چرخه‌های دوم به بعد بمدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱ دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱ دقیقه و در چرخه آخر بمدت ۶ دقیقه تنظیم گردید. محصولات PCR تکثیر اختصاصی قطعات DNA موردنظر در ژل آگارز ۱/۲٪ و بافر ۰/۵X TBE، با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند. قطعات DNAی تفکیک شده در ژل آگارز در محلول اتیدیوم بروماید ۵۰ میلی‌مولار رنگ‌آمیزی شده و در دستگاه UV Transilluminator مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه باندهای تکثیر شده، بر اساس نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی تخمین زده شد.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری پروتئین

نتایج آماری مربوط به درصد پروتئین موجود در ژنوتیپ‌های مورد بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بین ژنوتیپ‌ها از نظر درصد پروتئین، تنوع قابل ملاحظه‌ای وجود داشت. ژنوتیپ‌های MCC458 و MCC053 با میانگین حدود ۳۰/۵ درصد پروتئین از بیشترین مقدار پروتئین و ژنوتیپ‌های MCC291 وMCC373 با میانگین حدود ۲۱/۱ درصد از کمترین مقدار پروتئین برخوردار بودند و لذا می‌توان آنها را به عنوان ژنوتیپ‌های حداکثر و حداقل برای ادامه بررسی انتخاب نمود.

استخراج RNA و استخراج DNA

بر اساس نتایج استخراج RNAی کل ۵ نمونه گیاهی (چهار ژنوتیپ مورد نظر و یک نمونه یونجه) که در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد، حضور دو باند قوی RNAی ریبوزومی ۱۸ S و ۲۸ S یوکاریوتی مبین استخراج موفق RNA از نمونه‌های گیاهی مورد آزمایش می‌باشد (شکل ۱). همچنین از چهار ژنوتیپ مورد نظر، استخراج DNA هم صورت گرفت که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است.

Archive of SID

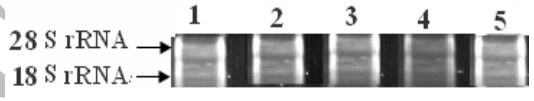
www.SID.ir

جدول ۲- مشخصات ژنوتیپ‌های نخود مورد مطالعه به همراه میانگین پروتئین دانه
Table 2. The protein content of different chickpea cultivars

ژنوتیپ Genotype	درصد پروتئین دانه Seed Protein (%)[1]	وزن ۱۰۰دانه (گرم) 100-seed weight (gr)	نوع Type	
MCC 067	23.50±0.18	33.2	Kabuli	کابلی
MCC 099	25.85±0.18	9.8	Desi	دسی
MCC 165	25.24±0.18	16. 8	Kabuli	کابلی
MCC 291	21.13±0.18	19.0	Dsei	دسی
MCC327	25.66±0.18	21.4	Kabuli	کابلی
MCC 333	24.72±0.18	30.8	Kabuli	کابلی
MCC 476	23.12±0.18	28.2	Kabuli	کابلی
MCC 495	26.12±0.18	27. 2	Kabuli	کابلی
MCC 510	24.68±0.18	32.0	Kabuli	کابلی
MCC 053	30.41±0.52	33. 2	Kabuli	کابلی
MCC 202	23.60 ±0.52	15.8	Kabuli	کابلی
MCC 258	25.90±0.52	31.4	Kabuli	کابلی
MCC 332	28.46±0.52	15.0	Desi	دسی
MCC 426	28.3122±0.52	33.2	Kabuli	کابلی
MCC 458	30.5795±0.52	25. 4	Kabuli	کابلی
MCC 477	25.4216±0.52	27.4	Kabuli	کابلی
MCC 496	24.80 ±0.52	25.6	Kabuli	کابلی
MCC 498	26.30 ±0.52	23.6	Kabuli	کابلی
MCC 207	27.40±0.52	17.6	Desi	دسی
MCC 373	20.92±0.52	17. 4	Desi	دسی

[1] means of two replications ± standard error

[1] میانگین دو نمونه± انحراف معیار

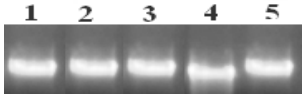


شکل۱- استخراج RNAی کل از پنج نمونه گیاهی

(چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵، به‌ترتیب نمونه‌های RNA مربوط به ژنوتیپ‌های MCC053، MCC485، MCC291، MCC373 و یونجه می‌باشند)

Fig. 1. RNA extraction of 5 plant samples

(Lanes 1-5 are loaded correspond to MCC053, MCC485, MCC291, MCC373 and alfalfa , respectively)



شکل۲- کیفیت DNA استخراج شده

(چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵، به‌ترتیب نمونه‌های DNA مربوط به ژنوتیپ‌های MCC053، MCC485، MCC291، MCC373 و یونجه می‌باشند)

Fig. 1. DNA extraction of chickpea and alfalfa plants

(Lanes 1-5 are loaded correspond to MCC053, MCC485, MCC291, MCC373 and alfalfa , respectively)

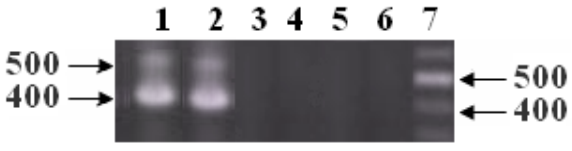
Archive of SID
www.SID.ir

انجام واکنش RT-PCR

پس از استخراج RNA نمونه مورد نظر از واکنش RT-PCR استفاده گردید. لذا با استفاده از آغازگرهای مورد نظر تفاوت در مقایسه بیان ژن *pepck* در ژنوتیپ‌های دارای حداکثر و حداقل پروتئین مشاهده شد. به‌طوری‌که در ژنوتیپ‌های حداکثر پروتئین دو باند در توالی ۴۰۰ و ۵۰۰ جفت باز مشاهده گردید در حالی‌که در ژنوتیپ‌های حداقل باندی مشاهده نشد. نتایج آزمایش‌های انجام شده بر روی دانه‌های رسیده نخودفرنگی و یونجه، نشان می‌دهد که این ژن در ذخیره نیتروژن، پُرشدن دانه و افزایش میزان اسیدهای آمینه و در نتیجه ساخت پروتئین‌های ذخیره‌ای در دانه‌ی رسیده نقش دارد (Aivalakis *et al.*, 2004 & Delgado *et al.*, 2007). لذا با توجه به ظهور باند مورد نظر در ژنوتیپ‌های دارای حداکثر پروتئین، انتظار می‌رود بیان ژن *pepck* در دانه‌های رسیده نخود نیز با متابولیسم ترکیبات نیتروژنه و افزایش میزان پروتئین دانه مرتبط باشد. همچنین در بررسی‌های صورت گرفته در آرابیدوپسیس ثابت شده است که ژنوم این گیاه حاوی دو ژن *pck1* و *pck2* بوده که میزان بیان ژن *pck1* بیشتر از *pck2* می‌باشد. لذا با توجه به نتایج به‌دست آمده احتمال می‌رود ظهور دو باند ۴۰۰ و ۵۰۰ جفت بازی در این آزمایش مربوط به بیان دو ژن *pck1* و *pck2* باشد که در این آزمایش با توجه به این‌که باند ۵۰۰ جفت بازی ضعیف‌تر از ۴۰۰ جفت بازی می‌باشد، احتمال می‌رود که در نخود نیز ژن *pck1* نسبت به ژن *pck2* غالب بوده و بسیار بیشتر بیان می‌شود.

همچنین به منظور اطمینان از عدم آلودگی RNAهای استخراج شده به DNA ژنومی در هر واکنش RT-PCR علاوه بر استفاده از cDNA، از RNA کل نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد (شکل ۳). همچنین بر روی DNA استخراج شده، واکنش PCR انجام گرفت که در نتیجه آن باند ۷۰۰ جفت بازی تکثیر شد. لذا با عدم مشاهده این باند در نمونه‌های RT-PCR و اطمینان از عدم آلودگی RNA استخراج‌شده به DNA ژنومی، می‌توان این طور فرض نمود که با توجه به حذف مناطق غیرکُدکننده (اینترون‌ها) در حین بیان ژن، cDNA ساخته شده از روی ژن مورد نظر فاقد اینترون بوده، لذا در ناحیه ۴۰۰ جفت بازی باند داده است، در حالی‌که قطعه ۷۰۰ جفت بازی تکثیرشده مربوط به DNA ژنومی می‌باشد که بیان ژن در آن صورت نگرفته، در نتیجه دارای مناطق غیرکُدکننده و کُدکننده می‌باشد. همچنین جهت تأئید نتایج آزمایش‌های انجام شده و صحت آغازگرهای ساخته شده بر اساس توالی محافظت‌شده گیاهان مذکور، از گیاه یونجه به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و ناحیه ۴۰۰ جفت بازی در واکنش RT-PCR و توالی ۱۲۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر DNA ژنومی در طی واکنش PCR مشاهده گردید (شکل ۴).

در ادامه بررسی به منظور اطمینان از صحت توالی‌های تکثیرشده نیاز به همسانه‌سازی قطعه موردنظر و تعیین توالی باندهای مذکور می‌باشد. همچنین بایستی از روش‌های دقیق‌تر بررسی بیان ژن، مانند روش‌های Realtime-PCR و وسترن بلات، برای اطمینان بیشتر بیان ژن در ژنوتیپ‌های حداکثر پروتئین استفاده نمود و در نهایت با توجه به نتایج به‌دست آمده، با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، میزان بیان این ژن را در ژنوتیپ‌های دارای حداقل پروتئین افزایش داده و گیاهان تراریختی با حداکثر پروتئین تولید نمود.



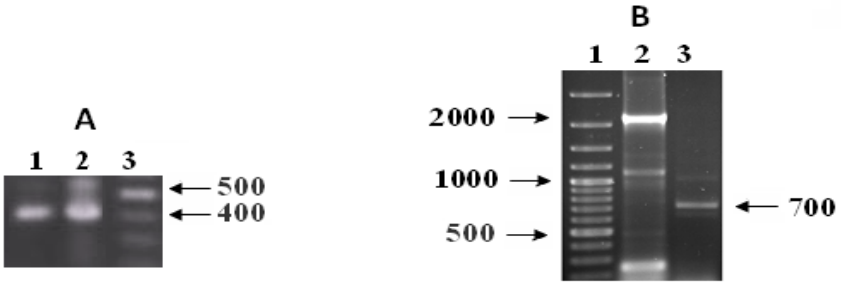
شکل ۳- باندهای حاصل از واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز به منظور مطالعه بیان ژن *pepck* در دانه‌های چهار ژنوتیپ نخود

(۱) MCC458، (۲) MCC053، (۳) MCC373 و (۴) MCC291؛ (۵ و ۶) به‌ترتیب کنترل منفی RNA و آب و (۷) سایزمارکر DNA 100bp Plus

Fig. 3. mRNA level of *pepck* gene in chickpea seeds in four different genotypes

Lanes 1-4 correspond to MCC458, MCC053, MCC373, MCC291 RT-PCR results, respectively; Lanes 5 & 6 are negative controls of RNA and water, respectively; Lane 7 is size marker

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تأیید حضور ژن *pepck*

A1) باند تکثیرشده از DNA مربوط به آنزیم PEPCK از گیاه یونجه در شرایط واکنش PCR یکسان، A2) سایزمارکر 100bp Plus DNA Ladder، A3) باند تکثیرشده مربوط به DNA ژنومی pepck، B1) سایزمارکر 100bp Plus DNA Ladder، B2) باند تکثیرشده cDNAی یونجه (کنترل مثبت)، B3) باند تکثیرشده مربوط به cDNAی PEPCK ژنوتیپ MCC458

Fig. 4. Polymerase chain reaction with *pepck* specific primers

A) Optimization of polymerase chain reaction with *pepck* specific primers. Lanes 1, 2 and 3 are alfalfa cDNA amplified band (as positive control), chickpea cDNA amplified band and DNA 100bp Plus size marker, respectively
B) Optimization of polymerase chain reaction with *pepck* specific primers. Lanes 1, 2 and 3 are DNA 100bp Plus size marker, alfalfa gDNA amplified band, and chickpea gDNA amplified band, respectively

Archive of SID

منابع

1. Aivalakis, G., Dimou, M., Flemetakis, E., Plati, F., and Katinakis, P. 2004. Immunolocalization of carbonic anhydrase and phosphenolpyrovate carboxylase in developing seeds of *Medicago sativa*. Plant Physiology and Biochemistry 42: 181-186.
2. Bahrami, A.R., Chen, Z., Walker, R.P., Leegood, R.C., and Gray, J.E. 2001. Ripening-related occurrence of phosphoenolpyrovate carboxykinase in tomato fruit. Plant Molecular Biology 47: 499-506.
3. Bajaj, Y.P.S. 1990. Legumes and oilseed crops I. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry10. Springer, Berlin Heidelberg, New York, p. 3-37.
4. Carnel, N.M., Agstino, A., and Hatch, M.D. 1993. Photosynthesis in phosphoenolpyrovate carboxykinasea-type C4 plants: mechanism and regulation of C4 acid decarboxylation in bundle sheath cells. Archives of Biochemistry and Biophysics 306: 360-367.
5. Chomaczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanat-phenole choloreform extraction. Annual Biochemistry 162: 156-159.
6. Delgado, A., Walker, R.P., and Leegood, R.C. 2007. Phosphoenolpyrovate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in solute transport and is nitrogen-responsive. Plant Cell and Environment 30: 225-235.
7. FAOSTAT, Report. http://faostat.fao.org/2007/faostat/servelet.
8. http://www.icrisat.org/2005/chickpea/chickpea htm.
9. Leegood, R.C., and Walker, R.P. 1999. Phosphoenolpyrovat carboxykinase: its role and regulation. In: Bryant, M.M. Burrell and N.J. Kruger (Eds.). Plant Carbohydrate Biochemestry J. A. Bios Sientific Publishers, Oxford, p. 201-213.
10. Malone, S., Chen, Z.H., Bahrami, A.R., Walker, R.P., Gray, J.E., and Leegood, R.C. 2007. Phosphoenolpyrovate carboxykinase in *Arabidopsis thaliana*: changes in gene expretion, protein and activity during vegetative and reproductive development. Plant Cell Physiology 48: 441-450.
11. Ruffner, H.P. 1982. Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*. A review-Part A. Vitis 21: 247-259.

www.SID.ir

12. Ruffner, H.P., and Kliewer, W.M. 1975. Phosphoenolpyrovate carboxykinas activity in grap berries. Plant Physiology 56: 67-71.
13. Walker, R.P. 2001. Using immunohistochemistry to study plant metabolism: the example of its use in localization of amino acids in plant tissues, and of phosphorylation of phosphoenoilpyrovate carboxykinase and its possible role regulation. Experimental Botany 52: 565-567.

Archive of SID

www.SID.ir

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 1, No. 1, 2010, p. 57-64

The possible role of Phosphoenolpyrovate Carboxykinase (PEPCK) in protein content of chickpea seeds (*Cicer arietinum* L.)

Beihaghi[1*], M., Bagheri[2], A., Bahrami[3], A.R., Shahriari[4], F. & Nezami, A.[2]

1- MSc. in Agricultural Biotechnology
2- Contributions from College of Agriculture & Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
3- Contribution from College of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
4- Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Received: 31 January 2009
Accepted: 31 August 2009

Abstract

Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (*PEPCK*) has been shown to be present in plants and animals, playing different metabolic roles in different tissues. The basic role of this enzyme is its contribution in the gluconeogenesis pathway. Evidences have shown that PEPCK may play a role in metabolism of nitrogenous compounds in developing seeds of legumes. In this research, *pepck* gene expression and the occurrence of PEPCK protein and its activity in different genotypes of chickpea (*Cicer arietinume* L.) were determined. Two low protein genotypes (MCC291 & MCC373) and two high protein genotypes (MCC458 & MCC053) out of 20 chickpea genotypes were selected, from which the total RNA was extracted through different stages of seed development. The expression of chickpea *pepck* gene was estimated by semi-quantitative RT-PCR. The results of RT-PCR showed that two isoforms of this gene were expressed in high protein genotypes, whereas in the low protein genotypes were not expressed. The differential expression of *pepck* gene is perhaps related to the possible role of Phosphoenolpyrovate Carboxykinase in protein content of chickpea seeds.

Key words: Chickpea, Nitrogen metabolism, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, Seed development

Archive of SID

[*] **Corresponding Author:** E-mail: maria_beihaghi@yahoo.com

www.SID.ir