Archive of SID

بیان فراوان ژن Δ^{1}- پرولین- ۵-کربوکسیلات سنتتاز (*p5cs*)، با هدف افزایش مقاومت به تنش‌های اسموتیک در گیاه تراریخت توتون(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)

احد یامچی[۱]، فردوس رستگار جزی[۲]، سیروس قبادی[۱]، امیر موسوی[۳] و علی اصغر کارخانه‌ای [٤]

چکیده

پرولین به عنوان یک اسمولایت مهم، در تعدیل فشار اسمزی سلول تحت تنش کم آبی نقش اساسی دارد. در سلول‌های گیاهی، آنزیم دلتا-۱- پرولین- ۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) وجود دارد که تحت شرایط خشکی، فعالیت این آنزیم تشدید شده و مقدار پرولین را در داخل سلول به حدی بالا می‌برد که از خسارت زیاد کم آبی به گیاه جلوگیری می‌کند. در این پژوهش، ژن کد کننده آنزیم P5CS که تحت کنترل پروموتور 35S ویروس موزاییک گل کلم قرارداشت در ناقل دوگانه pBI121 حاوی ژن‌های gus و nptII کلون شد و سپس این ناقل به باکتری Agrobacterium tumefaciens سویه C58(pGV3101) انتقال یافت. باکتری اخیر برای تولید گیاهان توتون تراریخته حاوی ژن p5cs به کار گرفته شد. با تکثیر قطعه ۷٦۵ جفت بازی توالی داخل ژن p5cs از گیاهان تراریخته و نیز تشکیل رنگ آبی در بافت این گیاهان، انتقال موفقیت آمیز کلون حاوی ژن p5cs به داخل گیاهان توتون به روش انتقال با آگروباکتریوم تأیید شد.

میزان پرولین تولید شده در این گیاهان تحت آبیاری معمولی و نیز تنش ۵ روزه کم آبی اندازه‌گیری شد و نتایج آزمایش نشان داد که در مقایسه با گیاهان شاهد، توتون‌های تراریخته مقدار زیادی پرولین در حد ۹٦/۹۱ تا ۱۳۳۰/۸۹۱ میلی‌گرم پرولین در هر گرم برگ در شرایط آبیاری طبیعی تولید کرده‌اند. این غلظت پرولین در شرایط تنش ۵ روزه کم آبی بیشتر بوده و در حدود ۲۰٤/٤٥٤ تا ۲۰۳۹/۷۷ تخمین زده شد. تفاوت تولید سطح پرولین در گیاهان شاهد و نیز گیاهان تراریخته، تحت آبیاری معمولی و کم آبی، نشان داد که بیان ژن p5cs در گیاهان تراریخت باعث افزایش تحمل به تنش خشکی در این گیاهان می‌شود که این یافته‌ها شاید بتواند برای یافتن راه حلی برای مقابله با تنش کم آبی در محصولات مهم کشاورزی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: *p5cs ، پروموتور 35S ، ناقل دوگانه pBI121 ، ژن gus ، ژن nptII ، آگروباکتریوم*

۱. به ترتیب کارشناس ارشد و مربی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. استادیار بیوشیمی، مرکز ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۳. استادیار بیوتکنولوژی گیاهی، مرکز ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ، تهران

٤. مربی ایمونولوژی، مرکز ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ، تهران

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

مقدمه

یکی از پاسخ‌های عمومی سلول به تغییرات فشار اسمزی خارجی، تجمع متابولیت‌هایی است که قابلیت انحلال داشته ولی متابولیسم طبیعی گیاه را مختل نمی‌کنند(۱۳). این مواد که عموماً به اسمولایت‌ها معروف هستند شامل قندهایی مثل سوکروز و فروکتوز، قندهای الکلی مثل گلیسرول و اینوزیتول متیله شده، قندهای کمپلکس مثل ترهالوز، رافینوز و فروکتان، یون‌هایی مانند پتاسیم (K^+) یا متابولیت‌های دارای بار الکتریکی مثل گلایسین بتائین، دی متیل سولفونیوم پروپیونات (DMSP) و اسیدهایی آمینه‌ای چون پرولین واکتوین هستند (۱۴). تجمع اسمولایت‌ها در سیتوزول امکان تعدیل فشار اسمزی را در سلول فراهم می‌آورد که در این شرایط، از تجمع یون‌های سمی مثل سدیم (Na^+) در سیتوزول، که برای پروتئین‌ها و غشاها سمی است، جلوگیری به عمل می‌آید. اسمولایت‌ها هم چنین باعث پایداری آنزیم‌ها در حضور یون‌ها، تنش آبی و نیز تأثیر ترکیبات شیمیایی دناتوره کننده می‌شوند. پرولین به عنوان یکی از این ترکیبات است که تأثیر فعالیت کند کنندگی یون‌ها را روی آنزیم‌ها کاهش می‌دهد و باعث افزایش و پایداری آنزیم‌ها در دمای بالا می‌شود (۲۱).

پرولین به عنوان یک اسمولایت مهم در تعدیل فشار اسمزی سلول تحت تنش‌هایی مانند دمای پایین، کمبود مواد غذایی، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین و اسیدیته بالا نقش اساسی دارد. افزایش این ماده در شرایط استرس اسمزی، علاوه بر گیاهان در دامنه وسیعی از موجودات دیگر مثل باکتری‌ها، مخمرها، بی مهرگان دریایی و جلبک‌ها مشاهده شده است (۳، ۸ و ۱۰). در واقع پرولین به عنوان یک چپرون شیمیایی (chemical chaperone) باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از به هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می‌کند (۱۴ و ۱۹). هم چنین تولید زیاد پرولین با افزایش فشار اسمز داخل سلول از تأثیر اختلالات شوری در فرایند طبیعی سلولی ممانعت به عمل می‌آورد. این افزایش سطح پرولین، حتی پس از حذف شرایط تنش تا مدتی حدود یک ماه باقی می‌ماند. در واقع تجمع افزایشی پرولین در سلول به دلیل القاء فعالیت آنزیم‌های دلتا-۱-پرولین ۵- کربوکسیلات سنتتاز(P5CS) و پرولین ۵- کربوکسیلات ردوکتاز(P5CR) در چرخه تولید این ماده و نیز ممانعت از فعالیت آنزیم‌های اکسید کننده پرولین مانند پرولین دهیدروژناز(ProDH) و پرولین ۵- کربوکسیلات دهیدروژناز(P5CDH) در سلول است. نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی نسبت به شوری و خشکی توسط محققین در گیاهان مختلف مانند ذرت (۱۵) یونجه (۵) و آرابیدوپسیس (۷) گزارش شده است.

در شرایط غیر تنش، پرولین از مسیر اورنتین در گیاه تولید می‌شود (۳) ولی درگیاهان تحت شرایط خشکی و شوری، پرولین از L- گلوتامیک اسید توسط آنزیم دلتا - ۱ - پرولین ۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و با مصرف یک ATP و احیا شدن NADPH تبدیل به گلوتامیک - ۵- سمی آلدئید می‌شود که بدون واسطه و به صورت خودبه خود تبدیل به دلتا - ۱- پرولین ۵- کربوکسیلات می‌شود. در ادامه فرایند، ماده اخیر به کمک آنزیم P5CR و احیا شدن NADPH به L- پرولین تبدیل شود(۱۳).

آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان P5CS است. در واقع P5CS یک آنزیم دوعملکردی است که دو واکنش ابتدایی را در مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان کاتالیز می‌کند (۳ و ۱۳). در باکتری‌ها این واکنش‌ها توسط دو آنزیم مختلف یعنی گاماگلوتامیل کیناز(GK) و گلوتامیک- سمی- آلدئید دهیدروژناز (GSA) کاتالیز می‌گردند(۳ و ۱۳). جالب توجه است که توالی اسیدهای آمینه آنزیم P5CS جداشده از *Vigna aconitifolia* با توالی اسید آمینه‌های بخش انتهای آمینی آنزیم GK و نیز بخش انتهای کربوکسیلیک GSA در *E. coli* مشابهت دارد(۳). کلونینگ ژن *p5cs* در گیاهان ثابت کرد که مسیر بیوسنتز پرولین از اسید آمینه گلوتامیک در گیاهان مشابه باکتری‌هاست(۳). تهیه کتابخانه cDNA گیاه *V. aconitifolia* منجر به شناسایی آنزیم P5CS شد که فعالیت هر دو آنزیم GK وGSA را انجام می‌دهد(۱۶). ژن *p5cs* در گیاه *Arabidopsis thaliana* و به روش cDNA شناسایی شد که۲/۸ کیلو باز طول داشته و

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

۲۰ اگزون را در بر می‌گیرد(۳ و ۱۶). این ژن از گیاهچه‌های ۱۴ روزه برنج نیز جداسازی شده است (۷ و ۲۱). به دلیل اهمیت شوری و خشکی در رشد گیاهان و توجه به تولید گیاهان تراریخته‌ای که در شرایط چنین تنش‌هایی به رشد مناسب خود ادامه دهند، باعث شده است که مسئله انتقال ژن *p5cs* به گیاهان مورد توجه قرار گیرد. نانجو و یوشیبا در سال ۱۹۹۹ (۱۲) به وسیله تراریختی گیاه آرابیدوپسیس با آنتی سنس cDNA ژن *p5cs* نشان دادند که نقش این آنزیم در بیوسنتز پرولین کلیدی است، زیرا در این روش با ممانعت از تولید آنزیم P5CS مقدار پرولین در این گیاهان در سطح معنی‌داری کاهش یافت. هم‌چنین ورما با تراریخت کردن گیاه توتون به وسیله ژن *p5cs* نشان داد که میزان پرولین در گیاه تراریخته افزایش می‌یابد (۱۲،۲۰ و ۲۱). با توجه به اهمیت تنش‌های شوری و خشکی در اقلیم‌های زراعی ایران ضروری است امکان انتقال ژن *p5cs* به گیاهان زراعی مهم ایران مورد توجه قرار گیرد. به همین منظور تشخیص داده شد که نخست بهینه‌سازی روش انتقال در گیاهان مدل مانند توتون بررسی شود تا از اطلاعات به دست آمده برای تراریخته کردن گیاهان مهم اقتصادی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

برای تهیه گیاهان تراریخت توتون از سویه C58(pGV3101) باکتری *Agrobacterium tumefaciens* که قبلاً دستواره pBI121-p5cs به آن منتقل شده است استفاده شد(۱). دستواره pBI121-p5cs حاوی قطعه ۲/۵ کیلوبازی کلون شده ژن *p5cs* می‌باشد که پروموتور CaMv 35S در ابتدای آن قرار گرفته است و این مجموعه در داخل ناقل دوگانه pBI121 (vector) واجد ژن‌های *gus* و *nptII* کلون شده بود. سویه میزبانی *A. tumefaciens* مورد استفاده دارای پلاسمید Helper واجد ژن‌های *vir* است (۱).

کشت ۲۴ ساعته سویه اگروباکتریوم در محیط LB محتوی ۱۰ گرم Bacto-peptone ، ۵ گرم Yeast- extract ، ۱۰ گرم NaCl و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد همراه با تکان خوردن(۱۸۰ دور در دقیقه) انجام گرفت. پس از این مدت میزان رشد باکتری با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که سوسپانسیون باکتری در حدود 10^9 واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر تخمین زده شد. سوسپانسیون به دست آمده تا حدود ۱۰ برابر رقیق شده و در آزمایش‌ها به کار رفت.

از برگ‌های جوان گیاه توتون *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi تعداد ۳۰ عدد ریزنمونه(قطعات leaf disk) در پتری استریل تهیه شده و پس از غوطه ور کردن در سوسپانسیون رقیق شده باکتری، ریزنمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی تکان داده شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده در محیط کشت MS جامد (۱۱) حاوی هورمون‌های بنزیل آمینوپورین(BAP) به میزان یک میلی‌گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید (NAA) به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در روی محیط کشت به نحوی قرار داده شدند که سطح برگ با محیط کشت تماس داشته باشد. ریز نمونه‌های توتون بدون آلوده شدن با اگروباکتریوم و یا آلوده شده به اگروباکتریوم میزبان سویه C58(pGV3101) فاقد دستواره حاوی ژن *p5cs* به عنوان شاهد منفی در این آزمایش‌ها به کار رفت. محیط‌های کشت حاوی نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط تاریک با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از این مدت ریزنمونه‌ها به محیط MS جامد قبلی که به آن آنتی بیوتیک‌های کانامایسین به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و سفاتوکسیم به میزان ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اضافه شده است منتقل شدند تا کالوس زایی ریزنمونه‌ها صورت گیرد. محیط‌های کشت به مدت دو تا چهار هفته در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس برای باززایی گیاهان نمونه، شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار هفته تأمین شد. بعد از باززایی نمونه‌ها، گیاهان به دست آمده به محیط MS فاقد هورمون منتقل شدند تا ریشه زایی صورت گیرد. چهار هفته بعد گیاهان ریشه دار شده به گلدان‌هایی با قطر ۱۸ سانتی‌متر حاوی ورمیکولیت و ماسه استریل (با نسبت ۲:۱)

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

انتقال یافتند و با رعایت شرایط مربوط به سازگاری گیاه با محیط، به مدت دو ماه در گلخانه نگه‌داری شدند. پس از رشد گیاهان تا مرحله ده برگی، نمونه‌برداری برای تأیید تراریخت بودن گیاهان به روش PCR و سنجش فعالیت آنزیم GUS انجام گرفت. برای انجام آزمایش سنجش و مقایسه میزان سطح پرولین تولید شده، از گیاهان آبیاری شده به صورت طبیعی و نیز تحت تنش پنج روزه خشکی استفاده شد.

آزمون گیاهان تراریخت با استفاده از تکنیک PCR

برای تأیید حضور ژن *p5cs* در گیاهان تراریخت شده، از تکنیک PCR استفاده شد. برای نیل به این منظور با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن *p5cs* ذخیره شده در بانک ژنNCBI (Accession no. D32138) که از cDNA آرابیدوپسیس *A. thaliana* var. columbia به دست آمده بود، آغازگرهای پیش برنده (Forward-R-6-F) از ناحیه پروموتور و معکوس (Reverse-R-2-R) از قسمت درونی ژن*p5cs* با توانایی تکثیر قطعه ۷۵۶ جفت بازی از ژن مزبور، و دو پرایمر دیگر جهت تکثیر قسمت انتهای ژن (R-3-F,R-4-R) با استفاده از نرم‌افزارهای primer3 و نرم افزارOligo ver.5 طراحی و توسط شرکت TIB MOLBIOL سنتز شدند.

R-6-F,Forward:
5'-GGATTGATGTGATATCTCCACTGACG-3'

R-2-R, Reverse :
5'-CCTTCAACATCGCTCAGAAGAATCAG-3'

R-3-F, Forward:
5'- CCAAGGGCAAGTAAGATACTGAACAT-3'

R-4-R, Reverse:
5'- GCAAGACTAAGTGGTAAAGTGGATCT-3'

هر واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۵۰ نانوگرم DNA نمونه استخراج شده به روش Murry and Tompson، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مولار کلرور منیزیم، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط dNTP و ۱ U آنزیم *Taq* DNA polymerase تنظیم شده و در ترموسایکلر Techne مدل Genus قرار گرفت. با توجه به بزرگی و پیچیدگی DNA ژنومی جهت انجام واسرشت سازی(denaturing) مناسب و نیز فراهم آوردن امکان اتصال مناسب (فراهم نمودن شرایط و زمان کافی برای اتصال و واکنش مناسب بین پرایمرها و ژن هدف که در چند سیکل اول خصوصاً حیاتی است)، بنابراین شرایط PCR برای تکثیر قطعه DNA مورد نظر در گیاهان تراریخت به صورت یک سیکل و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای واسرشت سازی و سپس شروع PCR بر مبنای Hot start PCR ، یک سیکل و دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای افزایش میزان اتصال آغازگرها به قطعه هدف و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط آنزیم به مدت ۱ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برنامه ریزی و اجرا شد و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت پذیرفت. در این آزمایش‌ها، چهار نمونه برگ جوان متفاوت از هر گیاه مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری میزان فعالیت ژن *gus*

برای رنگ آمیزی بافت‌های تراریخته شده گیاهی، از گیاهچه‌های تراریخت، رشد کرده در محیط MS، استفاده شد. به این منظور قطعات خرد شده گیاهچه به صورت غوطه ور در محلول حاوی X-Glue در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از چند ساعت و متعاقب آبی رنگ شدن بافت‌های گیاهان تراریخت، برای از بین بردن رنگ سبز کلروفیل نمونه‌های بافت‌های گیاهی مورد آزمایش به اتانل ۱۰۰ درصد منتقل گردیدند و سپس به مدت چند ساعت برای از بین رفتن کلروفیل که رنگ سبز آن با رنگ آبی متمایل به سبز نمونه‌های تراریخت گیاهی تداخل دارد در آن شرایط نگه‌داری شدند (۴).

اندازه‌گیری میزان پرولین

از هر گیاه تراریخت شده توتون که به مدت دو ماه در شرایط گلخانه نگه‌داری شده بودند، مقدار ۱۰۰ میلی گرم برگ تازه نمونه‌برداری شده و در حضور نیتروژن مایع به صورت پودر درآمدند. سپس ۱۰ میلی لیتر از اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ به نمونه‌ها اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

دور در دقیقه سانتریفوژ شد و ۲ میلی لیتر از محلول بالایی انتخاب شده و با ۲ میلی لیتر از اسید استیک و ۲ میلی لیتر محلول اسیدی نینهایدرین Ninhydrin acid (شامل ۱/۲۵ گرم نینهایدرین در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک که پس از حل شدن با حرارت، ۲۰ میلی لیتر اسید اورتوفسفوریک به آن اضافه شده بود) مخلوط گردیده و به مدت یک ساعت جوشانیده شد. پس از این مدت برای جلوگیری از ادامه واکنش، لوله‌ها در مخلوط آب و یخ قرار گرفتند. به نمونه‌های موجود در شرایط آزمایشگاه ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه گردید و پس از به هم زدن با ورتکس (Vortex) شدت جذب نمونه‌ها در ۵۲۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۲). برای محاسبه میزان پرولین در نمونه‌ها، نخست میزان شدت جذب نوری (OD) غلظت‌های ۱ تا ۱۶۰ میکرو مولار پرولین خالص تهیه شده از کمپانی Merck(پرولین استاندارد) در ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و بر اساس معادله خط رگرسیون بین مقدار پرولین‌های استاندارد و شدت جذب نوری آنها، مقدار پرولین موجود در بافت گیاهان ترایخت محاسبه شد.

نتایج و بحث

ژن *p5cs* که همراه ژن گزارشگر *gus* در ناقل pBI121 وارد شده است(pBI121-p5cs) از طریق شوک حرارتی به اگروباکتریوم منتقل شده (۱) و برای تراریخت کردن گیاهان توتون به کار رفت. چهار هفته پس از انجام آزمایش‌های انتقال، نشانه‌های کالوس زایی در بافت تمام ریز نمونه‌ها دیده شد(شکل ۱) که همراه با تولید گیاهچه‌های ریشه دار بودند(شکل ۲). در این مدت ریزنمونه‌های شاهد منفی بدون رشد، دچار زردی و نکروزه شده و از بین رفتند. پس از رشد و گل‌دهی گیاهان تراریخت، بذر T_0 آنها جمع آوری شده و برای ادامه آزمایش‌ها نگه‌داری شد.

واکنش PCR برای گیاهان تراریخت شده منجر به تولید قطعه ۷۶۵ جفت بازی از قسمت پروموتور 35S و از داخل ژن *p5cs* شد که به دلیل مطابقت اندازه با توالی بین دو آغازگر مورد استفاده در ژن اصلی(*p5cs*)، تراریخته بودن گیاهان مورد آزمایش تأیید شد(شکل۳). چون توالی ژن*p5cs* به صورت عمومی در گیاهان وجود دارد (۱۳)، انتخاب آغازگر پیش برنده از قسمت پروموتور 35S که در گیاهان غیر تراریخت وجود ندارد، امکان اشتباه در نتایج را از بین می‌برد و به همین علت در گیاهان شاهد غیر تراریخت هیچ گونه محصول PCR مشاهده نشد(شکل ۳). در طی این آزمایش‌ها بعضی از نمونه‌های برگی تهیه شده از یک گیاه که تحت تیمار تراریختگی قرار گرفته بودند تولید قطعه ۷۶۵ جفت بازی را ننمودند که نشانه عدم انتقال ژن *p5cs* به این نمونه‌هاست. این پدیده را می‌توان به علت تولید گیاهان موزائیک تراریخت حاصل از جوانه‌ها ربط داد. چون جوانه مجموعه‌ای از سلول‌های کالوس است، بنابراین احتمال دارد تعدادی از سلول‌ها در بافت کالوس تراریخت شده و عده‌ای دیگر از این تراریختگی فرار کرده‌اند. بدین دلیل احتمالاً گیاهان کامل به دست آمده از این بافت‌ها در قسمت‌هایی از اندام‌های خود فاقد سلول‌های تراریخته هستند (۱۷,٦). در چنین مواردی کشت بذرهای T_0 در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین و گیاهان به دست آمده از این بذور می‌تواند اطمینان از تراریختگی گیاه را تکمیل نماید. بنابراین برای تأیید تراریختگی، بذور T_0 این گیاهان روی محیط MS حاوی آنتی بیوتیک کشت داده شدند و گیاهچه‌های رشد کرده در این محیط به عنوان تراریخته‌هایی تلقی شدند که در تمام سلول های خود حاوی ژن *p5cs* هستند.

نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی بافت گیاهان تراریخت شده نشان داد که بافت های مورد بررسی به اندازه کافی رنگ آبی به خود گرفتند ولی قسمت‌هایی از نمونه‌ها بدون تظاهر رنگ آبی، زرد باقی مانده بودند (شکل ۴). گرچه این مشاهدات تأیید کرد که انتقال دستواره pBI121-p5cs با موفقیت انجام شده است ولی تولید حالت شیمری در نمونه‌های مورد بررسی احتمال حضور دستواره در تمام سلول‌های بافت نمونه‌ها را مورد تردید قرار داد. چنین پدیده‌ای در تراریخت کردن گیاهان گندم (۶) و گل داوودی (۱۷) نیز گزارش شده است. از طرف دیگر چون میزان تظاهر آنزنزیمGUS در تمام سلول‌ها یکسان نیست و

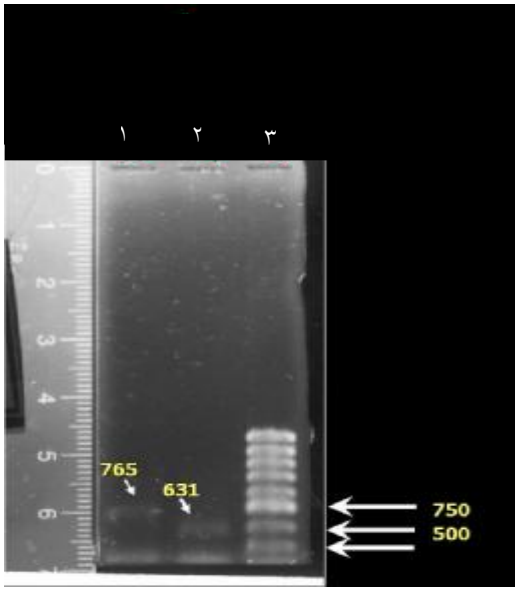
www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

شکل۱. کالوس زایی در محیط انتخابی MSحاوی آنتی بیوتیک (کانامایسین و سفاتوکسیم) و هورمون NAA(0.1mg/l) و BAP(1mg/l)

شکل۲. ریشه زایی جوانه ها در محیط MS انتخابی حاوی آنتی بیوتیک (کانامایسین و سفاتوکسیم) و بدون هورمون

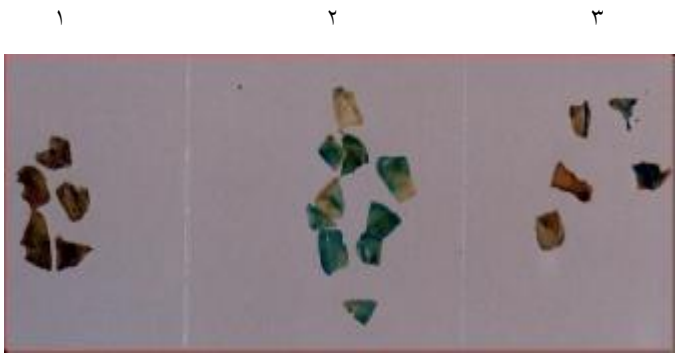


شکل۳. نتیجه واکنش PCR گیاهان تراریخت شده با آغازگرهای اختصاصی ژن *p5cs*،

۱- گیاه تراریخت شده با دستواره pBI-p5cs

۲- پلاسمید pBI-p5cs

۳- DNA size marker Gene Ruler 100bp(Roche)



شکل ۴. نتایج حاصل از رنگ آمیزی GUS در بافت برگ گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تحت اثر محلول X-Gluc (pH 7).

۱-گیاه غیر تراریخت که بعد از رنگبری با الکل ۱۰۰٪ بی‌رنگ شده است.

۲-گیاه تراریخت با دستواره pBI-p5cs که بعد از رنگبری با الکل ۱۰۰٪ ، رنگ آبی مربوط به فعالیت آنزیمGUS باقی مانده است.

۳-گیاه تراریخت با دستواره pBI-p5cs که بعد از رنگبری با الکل ۱۰۰٪ ، رنگ آبی مربوط به فعالیت آنزیم GUS باقی مانده است.

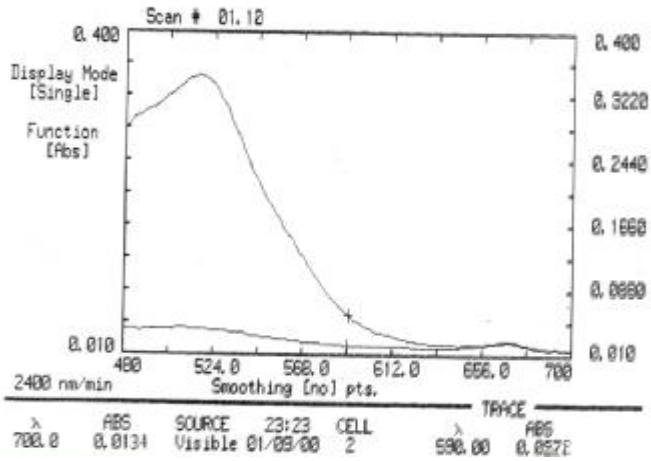
www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

جدول ۱. میزان ضریب جذب نوری در ۵۲۰ nm درگیاهان تراریختی که تحت آبیاری طبیعی و ۵ روز تنش خشکی قرار داشتند.

پرولین بر حسب میکروگرم در گرم برگ تازه در شرایط ۵ روز تنش خشکی	پرولین بر حسب میکروگرم در گرم برگ تازه در شرایط آبیاری طبیعی	نمونه‌گیاهی
۶	۰	گیاه غیر تراریخت
۲۰۴/۴۵۴	۹۶/۹۱	گیاه تراریخت۱
۳۷۲/۵۲۵	۲۰۰/۲۷۲	گیاه تراریخت۲
۵۸۳/۰۵	۲۸۲/٤۸۵	گیاه تراریخت۳
۲۰۳۹/۷۷	۱۳۳۰/۸۹۱	گیاه تراریخت٤



شکل۵. منحنی جذب ۵۲۰nm مربوط به گیاه تراریخت با دستواره pBI-p5cs و گیاه وحشی در شرایط آبیاری طبیعی

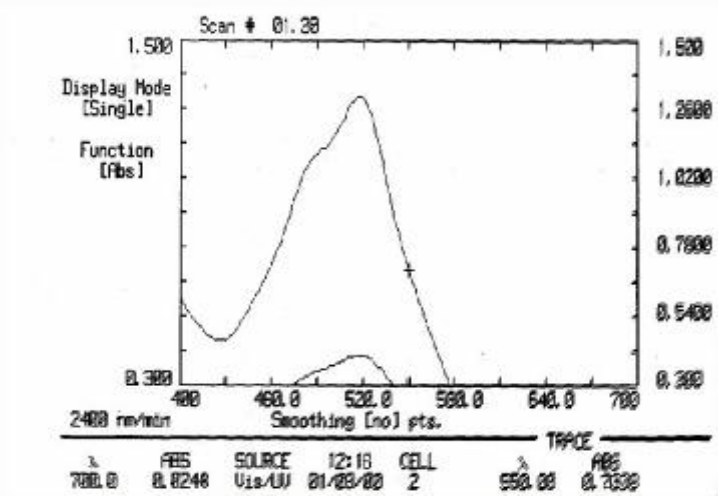
معمولاً در سلول‌های آوندی این ژن بیشتر بیان می‌شود(۴) بنابراین این احتمال وجود دارد که علی‌رغم تراریخت شدن سلول، به دلیل عدم تظاهر ژن *gus* رنگ آبی در این بافت‌ها دیده نشود.

مقایسه سنجش پرولین در گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد در شرایط طبیعی آبیاری نشان داد که گیاهان تراریخت حداقل ۹۶/۹۱ و حداکثر ۱۳۳۰/۸۹۱ میکروگرم پرولین در گرم برگ تازه تولید کرده‌اند (جدول ۱، شکل۵). این مقادیر محاسبه شده برای پرولین در گیاه تراریخت در مقایسه با گیاه شاهدی است که به دلیل اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر سولفوسالیسیلیک اسید (رجوع به مواد و روش‌ها) به دلیل رقت حاصله برای اسید آمینه پرولین در این گیاه (شاهد) مقادیر به دست آمده برای پرولین با توجه به منحنی استاندارد حاصله از دستگاه اسپکتروفتومتر که در حدود صفر محاسبه شده‌اند است. بنابراین چنانچه مسئله رقت حاصله در نمونه‌های گیاهان شاهد را تصحیح کنیم، مقادیر فوق الذکر مسلماً بیشتر خواهند شد. میزان پرولین در گیاهان تراریخت تحت تنش کم آبی ۵ روزه در مقایسه با شاهد و نیز شرایط طبیعی آبیاری روند افزایشی بیشتری را نشان دادند(جدول۱، شکل۶). به طوری‌که کمترین میزان تولید پرولین ۲۰۴/۴۵۴ و بیشترین مقدار تولید ۲۰۳۹/۷۷ در گیاهان تراریخت ارزیابی شدند. در چنین شرایطی از تنش، میزان تولید پرولین در گیاه شاهد ۶ میکروگرم در گرم برگ تازه محاسبه شد. اندازه‌گیری‌های پرولین نشان داد که حضور ژن *p5cs* در گیاهان تراریخت به طور مشخصی در افزایش میزان پرولین گیاه تراریخت مؤثر بوده است. چنین نتایجی کاملاً با نتایج محققین دیگر مطابقت دارد (۵ و ۲۰). از طرف دیگر مشخص شده است که گیاه به طور طبیعی تحت شرایط تنش

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID



شکل ۶. منحنی جذب در ۵۲۰ nm مربوط به گیاه تراریخت با دستواره pBI-p5cs و گیاه وحشی تحت ۵ روز تنش خشکی

شوری و یا خشکی تولید پرولین بیش از حد متعارف می‌کند (۲۰) و بنابراین نتایج تولید بیش از حد پرولین در گیاهان تحت تنش ۵ روزه کم آبی در این پژوهش نسبت به گیاهان تراریخت تحت اثر آبیاری طبیعی کاملاً مؤید این نظر است که بیان ژن *p5cs* در شرایط خشکی به مقدار بیشتر صورت گرفته است. باید یادآوری نمود که در شرایط طبیعی، افزایش بیش از حد پرولین عامل کند کننده‌ای برای فعالیت آنزیم P5CS است، در حالی‌که چون در شرایط تنش میزان پرولین به مصرف فعالیت‌های سلولی برای القای مقاومت به خشکی و یا شوری می‌شود، اثر کندکنندکی موثر نیست (۲۰).

نتایج حاصل از بررسی تأثیر القایی ژن *p5cs* در افزایش پرولین در گیاه توتون در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که عملکرد این ژن در مشابهت با عمل ژن‌های سنتز کننده بتائین گلایسین مثل *codA* (۹)، ژن‌های سنتز کننده قندهای تری هالوزها مثل *otsA* and *otsB* (۱۸)، ژن‌های دخیل در Ion homeostasis مثل *ArNHX1* و *AtHKT1* و *AtSOS1* (۹) و ژن‌های سنتز کننده Polyols مثل *Stpd*1 (۲۲) که در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس، کلزا، توتون و سیب زمینی مقاومت به تنش را افزایش می‌دهند، است. این ژن نیز پتانسیل بالایی برای تولید گیاهان مقاوم به خشکی را دارد. گرچه نتایج این بررسی در گیاه مدل توتون امیدوارکننده بود ولی برای تولید گیاهان زراعی قادر به تحمل به شرایط خشکی و شوری لازم است بهینه سازی انتقال ژن *p5cs* به گیاهان مورد نظر و نیز مقاومت گیاهان تراریخت به تنش کم آبی مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان واجب می‌دانند که از زحمات آقای دکتر مسعود بهار به خاطر مطالعه و ویرایش متن تشکر و قدردانی کنند.

منابع مورد استفاده

۱. یامچی، ا. ۱۳۸۱. بیان فراوان ژن دلتا-۱- پرولین- ۵ - کربوکسیلات سنتتاز (*p5cs*)، با هدف افزایش مقاومت به تنش‌های اسموتیک در گیاه تراریخت توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

2. Bates, L.1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205- 207.

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

3. Delauney A.J. and D.P.S Verma.1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant J. 4: 215-223.
4. Gallagher, S.R. 1990. GUS Protocole:Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. Academic Press, New York.
5. Ginzberg, I., H. Stein and Y. Kapuling. 1998. Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ^1-pyrroline- carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. Plant Mol. Biol. 38: 755-764.
6. Hammond, J., P. Mc Garvey and V.Yusibov. 2000. Plant Biotechnology. Springer, Germany.
7. Kiyosue,T., Y.Yoshiba, K.Yamaguchi- Shinozald and K. Shinozaki. 1996 A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. Plant Cell. 8: 1323-1335.
8. McCue K.F. and A.D. Hanson.1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Trends Biotech. 8: 358-362.
9. Maris, P.A. and B. Eduardo. 2002. Engineering salt tolerance in plants. Curr. Op. Biotech.13: 146-150.
10. Measues, J.C. 1975. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. Nature. 257: 398-400.
11. Murashige T. and F. Skoog. 1962. Physiology Plantarum. 15: 473-497.
12. Nanjo T., M. Kobayashi, Y. Yoshiba, Y. Sanada, K. Wada, H. Tsukaya, Y. Kakubari, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 1990. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic transporters *Arabidopsis thaliana*.The Plant J.18: 185-193.
13. Orcutt,D.M. and E.T. Nilsen. 2000. The Physiology of Plants Under Stress, Soil and Biotic Factors. John Wiley, New York.
14. Paul, M. and A. Hasegava. 1996. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 463-499.
15. Rayapati, P.J. and C.R. Stewart. 1991. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize(*Zea mays* L.) mitochonderia. Plant Physiol. 95: 787-791.
16. Savoure A.S., X.J. Jaoua, W. Hua, M. Van Montagu Ardiles and N. Verbruggen. 1995. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the Δ^1- pyrroline- 5- carboxylate synthetase in Arabidopsis thaliana. FEBS Lett. 372: 13-19.
17. Sherman, J.M., W.M. James and E.D. Margaret. 1998. A regeneration and Agrobacterium- mediated transformation system for genetically diverse Chrysanthemum cultivars. J. Am. Soc. Hort. Sci. 123: 189-194.
18. Smirnoff, N.1998. Plant resistance to environmental stress. Curr. Op. Biotech. 9: 214-219.
19. Solomon, A. and S. Beer. 1994. Effect of NaCl on the carboxylating activity of rubisco and absence of proline related compatible solutes Plant. Physiol. 108: 1387-1394.
20. Verma, D.P.S. and Z. Hong. 2000. Removal of feedback inhibition of Delta^1 –Pyrroline-5- Carboxylate Synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol. 122: 1129-1136.
21. Wallace, D. M. 1987. Larg and Small Scall Phenol Extraction Methods in Enzymology Academic press, New York.
22. Williamson, J.D., D.B. Jennings and D.M. Pharr. 2002. Sugar Alcohols, Salt Stress and Fungal Resistance: Polyols-multifunctional Plant Protection. J. Am. Soc. Hort. Sci.127(4): 467-473.
23. Yoshiba, Y., T. Kiyosue, T. Katagiri, H. Ueda and T. Mizoguchi. 1995. Correlation between the induction of a gene for Δ^1- pyrroline- 5- carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress.The Plant J. 7: 751-760.

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com