مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۶۵ تا ۶۸

Original Article

بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر تغییرات پروتئین القا شده در کشت بافت گیاه میخک *Dianthus caryophyllus L.*

دکتر فاطمه نوری کوتنایی[۱]، دکتر فرانسواز برنارد[۲]، دکتر حسین شاکر[۲]، دکتر حمید فهیمی[۳]

[۱] هیئت علمی ، مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی
[۲] استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی
[۳] استادیارگروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

چکیده

سابقه و هدف: *این پژوهش با هدف دستیابی به پروتئین‌های دفاعی میخک که برخی دارای خواص بالای دارویی نیز می‌باشند و با توجه به نقش تنظیمی سالیسیلیک اسید (SA) در سیستمهای مقاومتی گیاهان، میزان تأثیر SA بر چگونگی سنتز و تغییرات احتمالی در سطوح پروتئینی صورت گرفت.*

روش بررسی: *ابتدا قطعات جداشده میخک رقم cv. Cerise Royallette روی محیط OM حاوی ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و غلظت‌های متفاوت ۰، ۱۰، ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار SA کشت شدند. در پایان هفته چهارم و پس از تهیه عصاره پروتئینی از نمونه‌ها، میزان غلظت پروتئین موجود در عصاره با استفاده از آزمون بردفورد تعیین گردید و به منظور بررسی الگوی پلی‌پپتیدی و یافتن تغییرات کیفی در پروتئین‌ها ژل الکتروفورز به روش SDS-PAGE انجام شد.*

یافته‌ها: *تیمار با SA سبب افزایش قابل توجه در میزان پروتئین موجود در عصاره گیاهچه‌ها شد. تحلیلهای پلی‌پپتیدی که متعاقب ژل الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین‌ها انجام شد نشان داد همه غلظتهای مورد آزمایش SA موجب تغییرات در میزان انباشتگی برخی پلی‌پپتیدها به‌ویژه در ناحیه ۳۸ و ۳۹ کیلودالتونی شده بودند.*

نتیجه‌گیری: *یافته‌ها نشان می‌دهد قرار دادن گیاه میخک در برابر غلظتهای مختلف SA در سنتز پروتئین‌های آن تأثیر دارد.*

واژگان کلیدی: *کشت بافت، پلی‌پپتیدها، ژل الکتروفورز، سالیسیلیک اسید، گیاه میخک Carnation.*

مقدمه

از دیرباز بومیان آمریکای شمالی از برگهای میخک *Dianthus caryophyllus L.* به‌عنوان دارو در درمان جراحات و بیماریهای عفونی استفاده می‌کردند. امروزه با شناسایی بسیاری از ترکیبات با خواص بالای دارویی، از برگها، ساقه و گل میخک در درمان بسیاری از بیماریها استفاده می‌شود (۱). به‌علاوه وجود برخی از دسته‌های پروتئینی شاخص در این گیاه که بخشی از آنها دارای خواص ضد قارچ، ضد ویروس، ضد تومور و کشنده جنین بوده و شماری دیگر نیز در پدیده‌های مهم زیستی، متابولیکی و رشد و نمو نقش دارند، زمینه را برای انجام تحقیقات بیشتر از این دست فراهم می‌سازد (۲). به واسطه فعالیتهای بیولوژیکی مؤثر این پروتئین‌ها می‌توان از آنها در تهیه داروهای سمی ایمونولوژیکی استفاده کرد (۳).

به‌رغم مطالعات مختلف انجام شده بر روی گونه‌های مختلف میخک، کار تحقیقی در زمینه بررسی عوامل مختلف مؤثر بر سنتز پروتئین‌های موجود در این گیاه صورت نگرفته است.

از یک سو به واسطه مشکلات ناشی از حساس بودن نسبی این گیاه به ویژه نسبت به سرما و امکان آلودگی‌های نسبتاً بالای آنها در مقابل عوامل بیماریزای ویروسی و قارچی که تا حدی لاینحل باقی مانده است، افزایش مقاومت از طریق

آدرس نویسنده مسئول: تهران، پونک، حصارک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، مجتمع آزمایشگاهی، دکتر فاطمه نوری کوتنایی (**email**: noori.f@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱/۲۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۵/۱۰

Archive of SID
www.SID.ir

مکانیسم‌های دفاعی و سنتز پروتئین‌های دفاعی به عنوان یک راه‌کار مورد توجه قرار گرفته است.

از سوی دیگر، سالیسیلیک اسید (Salicylic acid=SA) که یک ماده شبه‌هورمون و متعلق به گروهی از فنل‌های گیاهی است، امروزه به عنوان یک مولکول کلیدی مؤثر در القای بیان ژن‌های PR (Pathogenesis related) در طی پاسخهای دفاعی گیاه در نظر گرفته می‌شود (۴). همچنین نشان داده شد انباشتگی SA برای بیان همه جانبه مقاومت نسبت به بیماری در گیاهان ضروری است (۵). سایر مطالعات نشان می‌دهند این ترکیب سنتز پروتئین‌های HSP (Heat shock protein) و فعال‌سازی برخی از پروتئین‌های کینازی را در کشت‌های تعلیقی مایع در گیاه توتون، تحت شرایط تنش اسمزی، القا می‌نماید (۶،۷). با این حال مکانیسم‌های تنظیم نشانه‌ای مقاومت در گیاهان نسبت به عوامل محیطی که با واسطه SA القا می‌گردد، هنوز به خوبی روشن نیست (۸).

چنانچه SA به عنوان یک حد واسط در القای پاسخ و انباشتگی پروتئین‌های دفاعی میخک عمل نماید، ضمن افزایش مقاومت نسبی این گیاه در برابر عوامل محیطی، می‌تواند با تولید مقادیر بالاتری از پروتئین‌های کاربردی همراه باشد، از این رو در این پژوهش بر آن شدیم تا با استفاده از فنون کشت بافت، به مطالعه و بررسی چگونگی تأثیر SA در القای پاسخ و تغییرات پروتئین‌های دفاعی گیاه میخک بپردازیم.

مواد و روشها

این مطالعه تجربی طی سالهای ۸۳-۱۳۸۰ در مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات انجام شد.

کشت گیاه از بخشهای گره‌دار ساقه در محیط OM (Olive medium) دارای مقادیر ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (بنزیل آمینوپورین) و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (نفتالن استیک اسید)، مناسب برای تکثیر شاخه و رشد جوانه‌های جانبی انجام شد. به منظور بررسی اثر سالیسیلیک اسید، غلظت‌های مختلف ۱۰، ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار SA تهیه و به محیط کشت فوق افزوده شد. نمونه‌های کشت شده به مدت ۴ هفته در قفسه‌های مناسب با شرایط کاملاً کنترل شده‌ای از نظر دما (۲±۲۵ درجه سانتیگراد)، رطوبت، جریان هوا، کیفیت و طول مدت روشنایی (نور سفید و زرد، شدت ۳۶۰۰ لوکس و فتوپریود ۸±۱۶ ساعت) قرار داده شدند (۹).برای تهیه عصاره ۳ گرم ساقه و برگهای بخش هوایی گیاهچه‌ها با استفاده از یک هاون از قبل سرد شده و ازت مایع به خوبی ساییده شدند. ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (حاوی ۱ میلی‌مول PMSF، ۲ میلی‌مول DTT و ۲۰ میلی‌مول Tris HCl) و به نمونه اضافه و در ظروف پلاستیکی دردار (Eppendorf tube) برای مدت ۳۰ دقیقه در دور g ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. بخش مایع حاوی عصاره پروتئینی پس از عبور از فیلتر میلی‌پور (۰/۵ میکرون) دیالیز شد و تعویض محلول بافر در فواصل زمانی معین تا ۲۴ ساعت ادامه یافت (۱۰). سنجش میزان غلظت پروتئین در هر نمونه با به‌کارگیری آزمون بردفورد انجام شد (۱۱).

خشک کردن عصاره پروتئینی با استفاده از روش انجماد در خلاء با دستگاه Freeze dryer در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۰۸ تا ۰/۰۱۱ اتمسفر به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت و نمونه‌ها تا زمان مصرف در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۰).

بررسی باندهای پروتئینی برای این منظور با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد و با تعیین وزن مولکولی، تغییرات مربوط به هر یک به طور دقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت (۱۰).

روشهای آماری با نمونه‌گیری تصادفی و به صورت ۴ تکرار از ۴ نمونه انجام شد. داده‌ها پس از جمع‌آوری و دسته‌بندی، توسط نرم افزار SPSS (Version 11.0) تجزیه و تحلیل شدند. برای این کار از روشهای آماری آنالیز واریانس یک طرفه و همبستگی درسطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

یافته‌ها

در این بخش، پس از ۸ ماه مراحل مقدماتی کشت، تغییرات پروتئینی ایجاد شده در گیاهچه‌های ۲۸ روزه تیمار شده با غلظتهای مختلف ۰، ۱۰، ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار SA، از جنبه‌های زیر مورد بررسی واقع شد.

مطابق با آنچه در شکل ۱ نشان داده شده است افزایش نسبی در میزان انباشتگی سایر باندهای پروتئینی نسبت به تیمار شاهد صورت می‌گیرد. در تیمار شاهد، باندهای پلی‌پپتیدی و پروتئینی مختلف بسته به وزن مولکولی در محدوده بین ۱۹ تا ۸۶/۸ کیلودالتون تشکیل می‌شود که در بین آنها بیشترین تراکم در محدوده باندهای پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۳۹ کیلودالتون مشاهده می‌شود.

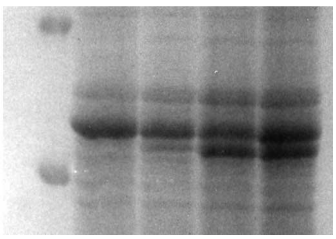
تغییرات غلظت کل پروتئین موجود در عصاره برگی در شکل ۲ نشان داده شده است. با افزایش غلظت SA موجود در

Archive of SID
www.SID.ir

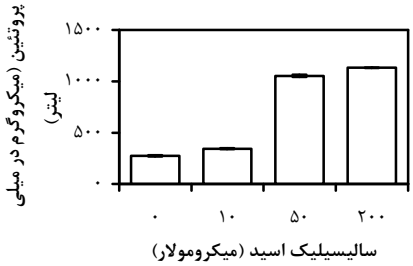
محیط کشت، میزان پروتئین‌های موجود در عصاره‌ها نیز به طور نسبی افزایش پیدا می‌کند و از نظر آماری بین غلظتهای پروتئینی استخراج شده از گیاهچه‌های مربوط به تیمارهای SA200, SA50, SA10, SA0 در تمام موارد تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ وجود دارد.

غلظت ۱۰ میکرومولار SA منجر به تشکیل یک باند باریک پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۳۸ کیلودالتون در بخش زیرین باند ۳۹ کیلودالتونی می‌گردد. باندهای پروتئینی در محدوده‌های ۳۲ و ۲۷ کیلودالتون نیز انباشتگی بیشتری پیدا می‌کند. با افزایش میزان غلظت SA موجود در محیط کشت تا حد ۵۰ میکرومولار، میزان تراکم باندهای پروتئینی به ویژه در ناحیه مربوط به باند پروتئینی نوپدید ۳۸ کیلودالتونی نسبت به تیمار SA10 افزایش نشان می‌دهد در صورتی که تراکم باند پروتئینی ۳۲ کیلودالتونی کاهش می‌یابد.

در تیمار دارای غلظت ۲۰۰ میکرومولار SA، افزایش میزان انباشتگی به باندهای پروتئینی ۳۸ و ۳۹ کیلودالتونی نسبت به تیمارهای SA0، SA10، و SA50 قابل مشاهده است.



شکل ۱- اثر غلظتهای مختلف SA بر الگوی پلی‌پپتیدی حاصل از ژل الکتروفورز SDS-PAGE (۱۲٪)



شکل ۲- اثر غلظتهای مختلف SA بر تغییرات پروتئین در عصاره‌های شاخه‌های برگ‌دار ۲۸ روزه میخک رشد یافته در محیط OM (هر ستون نشان‌دهنده میانگین ۴ نمونه به طور جداگانه ± خطای استاندارد است)

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد با افزایش غلظت SA به طور معنی‌داری بر میزان سطوح پروتئینی موجود در عصاره برگی افزوده می‌گردد و بررسی‌های آماری با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون نیز نشانگر وجود ارتباط مستقیم میان تغییرات غلظت سالیسیلیک اسید موجود در محیط کشت و میزان پروتئین استخراج شده از گیاهچه‌های تیمار شده با آن است.

تغییراتی نیز در چگونگی وضعیت و میزان انباشتگی باندهای پلی‌پپتیدی عصاره‌های پروتئینی مربوط به تیمارهای مختلف بسته به غلظت SA مورد استفاده صورت می‌گیرد که بیشتر در محدوده با وزن مولکولی تا ۴۵ کیلودالتون قابل مشاهده است که این نتایج در جای خود تا حدی نشانگر تاثیر احتمالی SA بر بیوسنتز HSP پروتئین‌هاست. لیکن بر خلاف ارتباط تکاملی پیشنهاد شده میان HSP و پروتئین‌های PR در رابطه با القای HSP به وسیله SA در گیاهان توجه کمی معطوف شده است.

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد غلظتهای پایین در حد ۱۰ میکرومولار SA موجب القای سنتز پروتئین ۳۸ کیلودالتونی شده و با افزایش غلظت SA تا حد ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار به طور نسبی بر تراکم این باند پروتئینی نوپدید افزوده می‌گردد. در مقایسه، یکی از پژوهشهای اخیر انجام شده توسط Przymusinski و همکاران او در سال ۲۰۰۴ (۱۲) نیز به خوبی نشان داده شده است که در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار SA افزایش انباشتگی پروتئینهای دفاعی ۱۶ کیلودالتونی در Lupine القا می‌گردد. به علاوه نتایج حاصل از پژوهشهای Burkhanova و همکاران (۶) بیانگر آن است که SA سنتز پروتئین‌های HSP را در برگهای توتون القا می‌نماید و به نوعی با نتایج این بخش از پژوهش حاضر هم‌سویی دارد.

از سوی دیگر، با تشکیل باند نوپدید ۳۸ کیلودالتونی در نمونه‌های تیمار شده با ۱۰ میکرومولار SA، کاهش تراکم باند پروتئینی ۳۲ کیلودالتون در شرایط تیمار با ۵۰ میکرومولار SA قابل مشاهده است و این در حالیست که انباشتگی سایر باندهای پروتئینی افزایش می‌یابد. این نتایج بر اثرات متقابل SA هم در القا و هم تا حدی در جلوگیری از سنتز برخی پروتئین‌های دفاعی در گیاه میخک اشاره دارد. در صورتی که پیش از این بیشتر مطالعات انجام شده تنها بر اثرات القایی SA در سنتز پروتئین‌های HSP و PR تأکید داشته است، لذا با یافته‌های حاصل از این پژوهش تا حدود زیادی مغایرت دارند.

به نظر می‌رسد مقادیر پایین در حد ۱۰ میکرومولار SA موجب القای پاسخ و افزایش انباشتگی پروتئین‌های دفاعی می‌گردد که از این طریق علاوه بر افزایش مقاومت نسبی این گیاه در برابر عوامل محیطی می‌توان به مقادیر بالایی از

Archive of SID

www.SID.ir

پروتئین‌های مهم کاربردی نیز دست یافت. با این همه برای تکمیل یافته‌های حاضر مطالعاتی در زمینه بررسی چگونگی ارتباط میان SA و هر یک از پروتئین‌های HSP و PR و نیز تحقیقات بالینی در زمینه شناسایی و اثر بخشی دارویی این پروتئین‌ها پیشنهاد می‌گردد.

در همین رابطه برای یافتن چگونگی عملکرد دقیق SA و سنتز پروتئین‌های دفاعی که در طی پاسخ به عوامل مختلف محیطی در گیاه میخک القا می‌شوند، نیاز به تحقیقات وسیعتری می‌باشد.

تشکر وقدردانی

بدین وسیله از دست‌اندرکاران و کارشناسان محترم مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات که با ارائه امکانات و تجهیزات تخصصی مورد نیاز انجام این پژوهش را تسهیل نمودند، سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از آقای بابک آریایی به خاطر انجام تحلیلهای آماری و ارائه نظرهای کلی روی نسخه نهایی تقدیر می‌شود.

REFERENCES

1. Sobotka JJ. Clinical study of the efficacy and safety of carnation slender for weight reduction. Curr Ther Res (VSA) 1971;13:636-7.
2. Mayak S, Tirosh T, Thompson JE, Ghosh S. The fate of ribolose 1, 5 bisphosphate carboxylase subunits during development of carnation petal. Plant Physiol Biochem 1998;36(11):835-41.
3. Huang B, Nig TB, Fong WP, Yeung H. Anti-HIV natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. Life Sciences 1997;61(10):933-49.
4. Metraux JP. Systemic acquired and salicylic acid: current state of knowledge. Eur J Plant Pathol 2001;107:13-18.
5. Kang G, Wang C, Sun G, Wang Z. Salicylic acid changes activities of H_2O_2-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedling. Environmental and Experimental Botany 2003;50(1):9-15.
6. Burkhanova EA, Fedina AB, Kulaeva ON. Effect of salicylic acid and 2,5-oligodenylates on protein synthesis in tobacco leaves under heat shock conditions: a comparative study. Russ J Plant Physiol 1999;46:16-22.
7. Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G. Osmotic stress induces rapid activation of salicylic acid-induced protein kinase and homolog of protein kinase ASK 1 in tobacco cell. Plant Cell 2000;12:165-78.
8. Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova MV, Fatkutdinova RA, Dilara F, Fatkhutdinova E. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Science 2003;164:317-22.
9. Schnapp SR, Preece JE. In vitro growth reduction of tomato and carnation microplants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 1986;6:3-8.
10. Jiang WB, Mayak S, Weiss D, Halevy AH. Regulation of petal-specific ethylene induced 70-kDa protein from Dianthus caryophyylus. Physiologia Plantarum 1994;92(2):219-26.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
12. Przymusinski R, Rucinska R, Gwozdz EA. Increased accumulation of pathogenesis-related proteins in response of lupine roots to various abiotic stresses. Environmental and Experimental Botany 2004;52:53-61.

Archive of SID

www.SID.ir