افزایش بیان ژن *P5CS* در گیاهچه زیتون تحت تنش شوری

مریم فرزانه بهلگردی[۱]، نسرین معتمد[۱*]، فردوس رستگار جزی[۲] و حسن ابراهیم زاده[۱]

[۱] **تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی**

[۲] **پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری**

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۲

چکیده

تنشهای اسمزی که از تأثیر یک عامل محیطی ایجاد می شوند از اهمیت ویژه ای برخوردارند. از پاسخهای رایجی که در مواجهه با تنش اسمزی در انواع مختلف گیاهان صورت می گیرد، تولید ترکیبات اسمولیتی مثل پرولین می باشد. آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز پرولین، P5CS (Δ^1 – پرولین-5- کربوکسیلات سنتتاز) می باشد. دراین مطالعه برای بررسی میزان بیان ژن *P5CS* در شرایط تنش شوری، رویانهای رقم زرد زیتون *Olea europaea c.v zard* بر روی محیط MS با غلظت ۱/۲ کشت داده شدند. پس از گذشت حدود ۴ هفته، نیمی از گیاهچه ها به محیط MS با غلظت ۱/۲ حاوی ۲۰۰ میلی مولار NaCl (شرایط تنش) انتقال و به مدت ۲ هفته واکشت شدند. نیمی دیگر از گیاهچه ها به عنوان شاهد در محیط MS با غلظت ۱/۲ (شرایط بدون تنش) واکشت شدند. پس از استخراج پروتئین تام از گیاهچه تحت تنش شوری و گیاهچه شاهد، الکتروفورز SDS-PAGE انجام گرفت وسپس انتقال الکتروفورتیک بر روی غشاء نیتروسلولزی انجام شد و در نهایت با به کارگیری آنتی بادی پلی کلنال تکوین یافته در خرگوش با استفاده از پلی پپتید طراحی شده که توسط شرکت سیگما به صورت مصنوعی سنتز گردید، به جستجوی اختصاصی میزان بیان ژن *P5CS* در شرایط تنش پرداخته شد. نتایج به دست آمده از ایمونوبلاتینگ نشان داد که سطح بیان پرولین در گیاه زیتون تحت تنش، به مراتب از گیاه زیتون شاهد در شرایط غیر تنش بالاتر می باشد و این نتایج دلالت بر نقش مهم و کلیدی پرولین در رابطه با تحمل تنش دارد.

واژه های کلیدی: زیتون، تنش شوری، *P5CS*، آنتی بادی پلی کلنال

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۱۱۱۲۴۷۲ ، پست الکترونیکی: motamed2@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

یکی از مشکلات موجودات زنده در محیطهای شور و خشک، حفظ مقدار آب درونی است. گیاهان برای مقابله با این مشکل درسیتوپلاسم خود ترکیباتی به نام اسمولیتها را انباشته می کنند. این ترکیبات باید سمی نبوده و در فرآیندهای متابولیکی مداخله ننمایند و در غلظتهای بالا ساختار و عملکرد پروتئینها را تغییر ندهند. اسمولیتها شامل قندهایی مثل سوکروز و فروکتوز، قندهای الکلی مثل گلیسرول و اینوزیتول متیله شده، قندهای کمپلکس مثل ترهالوز، رافینوز و فروکتان، آمینواسیدهای خاص یا مشتقات آنها مثل پرولین و اکتوین، متابولیتهای دارای بار الکتریکی مثل گلیسین، بتائین و دی متیل سولفونیوم پروپیونات (DMSP) می باشند (۶ و ۱۳). تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش، نتیجه تنظیم متقابل در دو مسیر است که روی هم رفته چرخه پرولین را تشکیل می دهد: ۱- افزایش بیان آنزیمهای مسیر سنتز پرولین (P5CS ، P5CR) ۲- کاهش فعالیت تجزیه ای پرولین (۷). P5CS، آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان می باشد و یک آنزیم دو عملکردی است که دو گام ابتدایی در مسیر بیوسنتز پرولین را کاتالیز می کند (۳ و ۱۲). در این مطالعه با بررسی و شناسایی اپیتوپهای سطحی آنزیم P5CS و

تولید پلی پپتید بر مبنای مطالعه اپیتوپها و تزریق آن در یک حیوان مناسب و در نهایت با استفاده از آنتی بادیهای پلی کلنال بر علیه ژن *P5CS* به بررسی میزان بیان ژن *P5CS* از طریق ایمونولوژیکی در گیاهچه زیتون در دو شرایط تنش وعدم تنش پرداخته شد.

مواد و روشها

گونه مورد مطالعه در این تحقیق رقم زرد زیتون با نام علمی *Olea europaea* می باشد که از منطقه گیلوان جمع آوری شده است.

کشت گیاه : پس از جدا کردن برون برهای گوشتی میوه ها، میان برهای سخت و چوبی بذرها به صورت مکانیکی شکسته شده و درون برها (رویان همراه با اندوسپرم) جهت استریل شدن در زیر هود به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵۰ در صد قرار داده شدند و در ادامه پنج بار شستشو با آب مقطر سترون انجام گرفت و دانه های سترون شده بر روی دو کاغذ صافی موجود در پتری سترون محتوی ۵ میلی لیتر آب مقطر سترون شده قرار گرفته و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد در تاریکی نگهداری شدند. سپس اندوسپرم ها توسط نوک اسکالپل از رویانها جدا شده و رویانهای کامل و بدون آسیب دیدگی بر روی محیط MS با غلظت ۱/۲ قرار داده شدند. این محیطهای کشت حاوی نمونه در اتاق کشت دمای ۲۵درجه سانتی گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ۲ تا ۳ هفته نیمی از رویانهای دارای جوانه به محیط MS با غلظت ۱/۲ حاوی ۲۰۰ میلی مولار نمک انتقال داده شدند و پس از گذشت ۳ هفته از تنش شوری گیاهچه های سبز بعد از قطع ریشه هایشان بلافاصله به ازت مایع منتقل شدند و برای بررسیهای بعدی در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج پروتئین: به روش Tsugita و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد (۱۶).

سنجش میزان پرولین : به میزان ۱۰۰ میلی گرم برگ تازه از گیاهچه های تحت تنش شوری تهیه و در حضور نیتروژن مایع به صورت پودر در آمدند سپس ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد به نمونه ها اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۰دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و ۲ میلی لیتر از محلول بالایی انتخاب شده و با ۲ میلی لیتر از اسیداستیک و۲ میلی لیتر محلول اسیدی نینهایدرین (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 در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانیده شد. پس از این مدت برای جلوگیری از ادامه واکنش، لوله ها در مخلوط آب و یخ قرار گرفتند. پس از رسیدن به دمای اطاق، ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه گردید و پس از به هم زدن با ورتکس شدت جذب نمونه ها در ۵۲۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتری اندازه گیری شد وبا استفاده از مقدار پرولینهای استاندارد وشدت جذب نوری آنها منحنی استاندارد رسم شد و میزان پرولین در گیاهچه های تحت تنش محاسبه گردید (۲).

تهیه آنتی بادی پلی کلنال: با توجه به نتایج حاصل از بررسی Nanjo و همکاران (۱۹۹۹)(۱۱)، ۱۵ اسید آمینه انتهای آمین AtP5CS [EELDRSRAFARDVKR] مربوط به آرابیدوپسیس تالیانا به عنوان اپیتوپ برای سنتز آنتی بادی تعیین شد وسپس سنتزپپتید توسط شرکت سیگما انجام گردید. در ادامه ۳۰۰ میکروگرم پپتید سنتز شده را در PBS (Phosphate buffer saline) حل کرده وهم حجم آن ادجوانت کامل فروند زده و به دو ناحیه از پشت خرگوش به طریقه زیر پوستی تزریق شد. تزریق دوم یک ماه بعد انجام شد (یادآوری اول) به این صورت که ۳۰۰ میکروگرم

پپتید سنتزشده در PBS حل شد و هم حجم آن ادجوانت ناقص فروند زده وتزریق انجام شد. یادآوری دوم نیز یک ماه بعد مشابه یادآوری اول انجام شد. دو هفته بعد خونگیری انجام و سرم (با رقت۱/۱۰۰۰) برای تأییدات ایمونولوژیکی تهیه گردید.

تشخیص ایجاد پادتن از طریق دات بلاتینگ : پپتید سنتز شده حکم پادگن را دارد لذا به صورت لکه هایی روی کاغذ نیتروسلولز قرار داده شد پس از تثبیت پپتید بر روی کاغذ نیتروسلولز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، از طریق دات بلاتینگ، پادتن تولید شده با پادگن واکنش داده شد.

شناسایی پروتئین مربوط به P5CS توسط پادتن از طریق وسترن بلاتینگ : نمونه پروتئینی استخراج شده از گیاهچه تحت تنش و گیاهچه شاهد در شرایط غیر تنش بر روی ژل ۱۲/۵ در صد SDS-PAGE تزریق شد. پس از خاتمه عمل رانینگ، وسترن بلاتینگ برای شناسایی میزان بیان پروتئین مربوط به P5CS در گیاهچه زیتون در دو شرایط تنش وغیر تنش انجام گردید. آنالیز وسترن بلاتینگ به روش Nanjo و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد (۱۱).

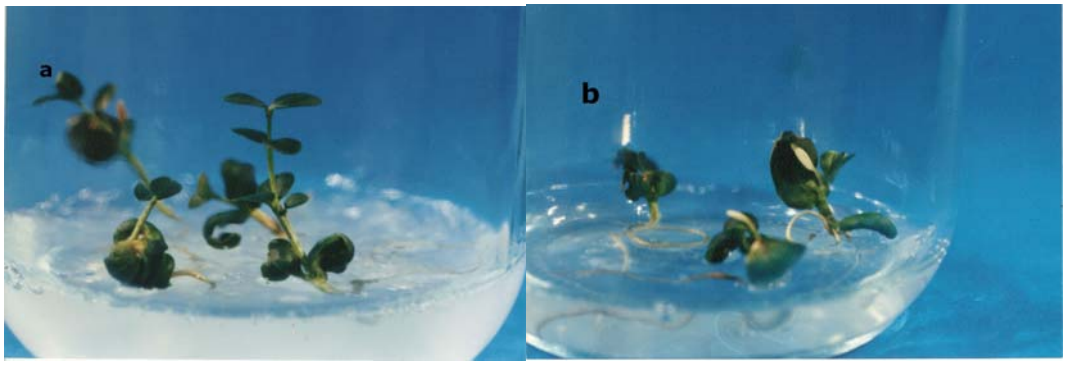
تجزیه و تحلیل آماری داده ها: داده ها با استفاده از تست آنووا وآزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج سنجش میزان مقاومت گیاه زیتون در محیط حاوی ۲۰۰mM نمک: گیاهچه های موجود در محیط MS با غلظت ۱/۲ حاوی ۲۰۰ میلی مولار نمک رشد کمتری را نسبت به گیاهچه های شاهد در محیط MS با غلظت ۱/۲ (شرایط غیر تنش) نشان دادند . شکل (۱a و ۱b).

سنجش میزان پرولین: سنجش پرولین نشان داد که میزان پرولین در گیاهچه زیتون طی تنش افزایش می یابد (شکل ۲ و جدول ۱).

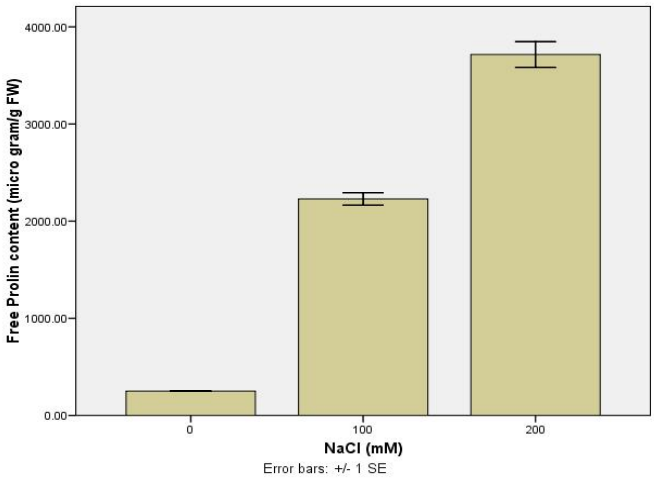
بر اساس آنالیز آنووا وتست دانکن میانگین میزان پرولین در غلظتهای نمکی صفر ، ۱۰۰ و ۲۰۰ با هم اختلاف معنی دار دارند .



شکل ۱ – (a) گیاهچه زیتون در محیط کشت MS با غلظت ۱/۲ (b) گیاهچه زیتون در محیط کشت MS با غلظت ۱/۲حاوی ۲۰۰ میلی مولار نمک

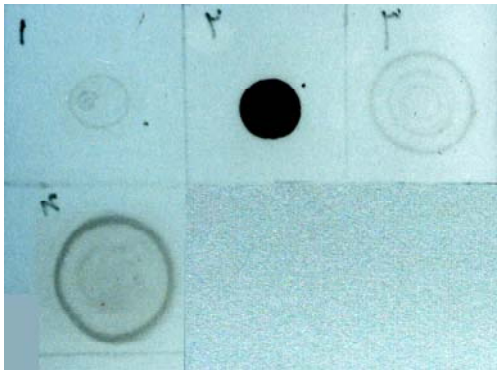
جدول ۱ – میزان پرولین درغلظتهای نمکی صفر ،۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولارنمک در گیاهچه زیتون

NaCl (mM)	۰	۱۰۰	۲۰۰
تست	۲۵۰/۷۷±۲/۰۳	۲۲۲۸/۴۱±۶۳/۷۷	۳۷۱۴/۴۶±۱۳۲/۸۷



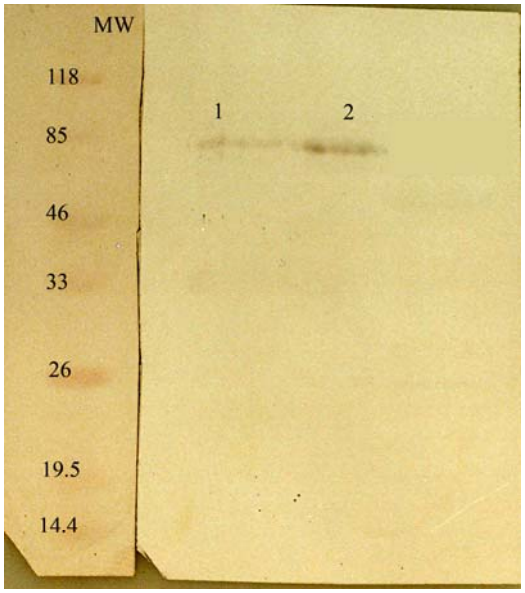
شکل ۲- میزان پرولین در گیاهچه شاهد و گیاهچه های تحت تنش شوری در غلظتهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک

نتایج حاصل از دات بلاتینگ : با استفاده از تکنیک دات بلاتینگ مشخص شد که پادتن ایجاد شده قدرت شناسایی پروتئین مربوط به P5CS را دارد. همان طور که در شکل ۳ مشخص است در کنار نمونه مربوط به پپتید سنتز شده، عصاره پروتئینی مربوط به گیاهچه های زیتون در شرایط تنش وعدم تنش نیزمورد آنالیز دات بلاتینگ قرار گرفتند. نتایج نشان می دهد که در گیاه تحت تنش زیتون، حلقه رسوبی تشکیل شده بسیار پررنگتر از حلقه رسوبی مربوط به گیاه شاهد در شرایط غیر تنش می باشد.



شکل ۳- آنالیز دات بلاتینگ شماره ۱:پپتید P5CS شماره ۲: پپتید کنجوگه با BSA (بووین سرم آلدئید) شماره ۳: گیاهچه زیتون در شرایط غیر تنش شماره ۴: گیاهچه زیتون تحت شرایط تنش

نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلاتینگ: برای اطمینان بیشتر از نتیجه به دست آمده تکنیک وسترن بلاتینگ انجام شد. همان طور که در شکل ۴ مشخص است باند مربوط به نمونه تحت تنش بسیار پررنگ می باشد در حالی که باند مربوط به نمونه ای که در شرایط غیر تنش قرار داشته به صورت نازک و کم رنگ نمایان شده است. تمام این نتایج بازگو کننده این مطلب است که در گیاه زیتون تحت تنش اسمزی، سطح بیان P5CS بالا می رود.



شکل ۴- آنالیز وسترن بلاتینگ. شماره ۱: گیاهچه شاهد شماره ۲: گیاهچه تحت تنش

بحث

خشکی و شوری زیاد از مهم ترین عوامل محیطی هستند که موجب تنش اسمزی شده و رشد گیاه را به شدت محدود می کنند (۱). یکی از پاسخهای عمومی و رایجی که گیاهان در ارتباط با تنش اسمزی از خود نشان می دهند تجمع اسیدآمینه پرولین به عنوان یک اسمولیت مهم وشناخته شده می باشد (۴، ۶، ۹، ۱۰،۱۳، ۱۴، ۱۷ و ۱۸). به نظر می رسد زمانی که سلولهای گیاهی تحت تنش شوری قرار می گیرند همزمان با افزایش غلظت پرولین، غلظت K^+ درون سلولی کاهش می یابد. درواقع کاهش K^+ درون سلولی به عنوان یک علامت حد واسط باعث تجمع بیشترپرولین در گیاهان عالی می شود (۵). در مطالعه ای که برروی گیاه بیابانی *Pancratium maritmum* صورت گرفت مشخص شد که با القای تنش شوری میزان رشد و محتوای پروتئینی گیاه کاهش می یابد ولی اگر مقداری پرولین خارجی به گیاه اضافه شود محتوای پروتئینی و میزان رشد بهبود می یابد. و این نشان می دهد که پرولین باعث افزایش تحمل گیاه به تنش شوری می شود (۸). در تحقیقی دیگر که بر روی نخود (*Cicer arietinum*) انجام شد مقدار پرولین در برگها در شرایط تنش وعادی بررسی شد . نتایج نشان داد که در حالت تنش مقدار پرولین در برگها حدود ۱۵۰ μgg^{-1} FW افزایش می یابد (۱۵). Nanjo در سال ۱۹۹۹ به منظور بررسی میزان بیان ژن P5CS در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا با استفاده از آنتی بادی پلی کلنال تکوین یافته در خرگوش بر علیه At P5CS و انجام آنالیز ایمونوبلاتینگ نشان داد که در نمونه های تحت شرایط تنش باند تشکیل شده بسیار پررنگتر و مشخص تر از باند مربوط به همین نمونه در شرایط عادی (غیر تنش) می باشد (۱۱). در مطالعه حاضر مشخص شد که گیاه زیتون تحت تنش شوری تولید پرولین را افزایش می دهد لذا با توجه به نقش مهم و کلیدی پرولین در رابطه با تحمل تنش، تولید گیاهان زیتون تراریخت مقاوم به تنش شوری که قادر به تولید میزان بالایی از پرولین می باشند توصیه می گردد.

منابع

1- Bajaj S., Targolli J., Liu L.F., Ho T.H.D., Wu, R. 1999. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. Mol. Breed. 5: 493-503.

2-Bates, L.1997. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39:205-207.

3- Delauney A.J.,Verma D.P.S.1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The plant J. 4:215-223.

4- Ghanti S.K.K., Sujata K.G., Vijay Kumar B.M., Nataraja Karba N., Janardhan Reddy K., Srinath Rao M., Kavi Kishor P.B. 2011. Heterologous expression of *P5CS* gene in chickpea enhances salt tolerance without affecting yield. Biol. Plant. 55(4): 634-640.

5-Greenway H., Munns R. 1980. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. Annu Rev Plant physiol. 31:149-190.

6- Hasegawa, P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 51:463-99.

7-Hong z., Lkkineni k., zhang z. 2000. Removal of feedback inhibition of delta 1- pyrrolin-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant physiology.122: 1129-1136.

8-khedr Abbed Hamid A., Abbas Mohammad A. 2003. Prolin induces the expression of salt stress responsive proteins and may improve the adaptation of pancratium maritimum L. to salt stress .Journal of experimental botan.54 (392): 2553-2562.

9-Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A., Verma D.P.S. 1995. Overexpression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol. 108: 1387–1394.

10-Molinari H.B.C., Marur C.J., Filho J.C.B., Kobayashi A.K.and Pileggi M. 2004. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock *Carrizo citrange* (*Citrus sinensis* Osb.

x*Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. Plant Sci. 167 : 1375–1381.

11-Nanjo T., Yoshiba Y. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana .plant Journal.18 (2):185-193.

12- Orcutt D.M., Nilsen E.T. 2000. The Physiology of plants under stress. Soil and Biotic Factors. John Wiley, NewYork.

13- Paul M., Hasegava A. 1996. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual review of plant physiology and plant molecular biology. 51:483-499.

14- Silva-Ortega C.O., Ochoa-Alfaro A.E., Reyes-Aguero J.A., Aguado-Santacruz G.A., Jimenez-Bremont J.F. 2008. Salt stress increases the expression of *P5CS* gene and induces proline accumulation in cactus pear. Plant Physiol. Bioch. 46: 82-92.

15- Sou Ssi M., ocana A., Liuch C. 1988. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick- pea (Cicer arietinum).Journal of Experimental Botany. 49 (325):1329-1337.

16- Tsugita A., kamo M., ohki Y. 1996. Two dimensional electrophoresis of plant protein standardization of gel patterns. Electrophoresis. (17): 855-865.

17- Vendruscolo E.C.G., Schuster I., Pileggi M., Scapim C.A., Molinari H.B.C., Marur C.J., Vieira, L.G.E. 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. J Plant Physiol. 164: 1367-1376.

18- Zhu B., Sua J., Changa M., Verma D.P.S., Fan Y.L., Wu R. 1998. Overexpression of a Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt-stress in transgenic rice. Plant Science. 139: 41-48.

Increase of *P5CS* gene expression in olive plantlets under salinity stress

Farzaneh Behelgardi M.[1], Motamed N.[1], Rastgar Jazzi F.[2] and Ebrahimzadeh H.[1]

[1] Biology College, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[2] National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Salinity and drought are the most important environmental factors causing osmotic stress and limit intensely plant growth. Production of osmolyts such as proline is a current response in many plants under osmotic tension. The key enzyme of proline biosynthesis pathway is P5CS (Δ^1-pyrroline- 5-carboxylate synthetase). In this study, embryos of the olive cv. Zard were cultured on solid ½ MS media, after 4 weeks, half of the plantlets were transferred to the solid ½ MS containing 200 mM NaCl and they were sub- cultured about 2 weeks, then total protein was extracted from fresh leaves of both plantlets under stress condition and non stress condition and measured using of brad ford to subject to SDS-PAGE gel electrophoresis. To probe the effect of P5CS overexpression on salinity stress tolerance, poly clonal antibody developed in rabbit against P5CS protein was used. The result of immunological methods for specific detection of *P5CS* gene, strongly indicated P5CS up – regulation in stressed plantlets versus non stressed plantlets and these results implicate the key role of proline in salinity stress toleration.

Key words: Olive, *P5CS*, osmotic stress, Poly clonal antibody