

بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر تغییرات پروتئین القا شده در *Dianthus caryophyllus L.*

دکتر فاطمه نوری کوتنایی^۱، دکتر فرانسواز برنارد^۲، دکتر حسین شاکر^۳، 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 استادیار گروه 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 جداسده میخک رقم cv. Cerise Royallette را روی محیط OM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و غلظت‌های متفاوت ۰، 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 برذفورود تعیین گردید و به منظور بررسی الگوی پلی‌پتیدی و یافتن تغییرات کیفی در پروتئین‌ها ژل الکتروforez به روش SDS-PAGE انجام شد.

یافته‌ها: تیمار با SA سبب افزایش قابل توجه در میزان پروتئین موجود در عصاره گیاه‌چه‌ها شد. تحلیلهای پلی‌پتیدی که متعاقب ژل الکتروforez SDS-PAGE پروتئین‌ها انجام شد نشان داد همه غلظت‌های مورد آزمایش SA موجب تغییرات در میزان انباستگی برخی پلی‌پتیدها به ویژه در ناحیه ۳۱ 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، پلی‌پتیدها، ژل الکتروforez، سالیسیلیک اسید، گیاه میخک Carnation

مقدمه

پدیده‌های مهم زیستی، متابولیکی و رشد و نمو نقش دارند، زمینه را برای انجام تحقیقات بیشتر از این دست فراهم می‌سازد (۱). به واسطه فعالیتهای بیولوژیکی مؤثر این پروتئین‌ها می‌توان از آنها در تهیه داروهای سمی ایمونولوژیکی استفاده کرد (۲).

به رغم 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 لاينحل باقی مانده است، افزایش مقاومت از طریق

از دیرباز بومیان آمریکای شمالی از برگهای میخک *Dianthus caryophyllus L.* به عنوان دارو در درمان جراحات و بیماریهای عفونی استفاده می‌گردد. امروزه با شناسایی بسیاری از ترکیبات با خواص بالای دارویی، از برگها، ساقه و گل میخک در درمان بسیاری از بیماریها استفاده می‌شود (۱). به علاوه 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

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

تأثیر سالیسیلیک اسید بر تغییرات پروتئین

یک هاون از قبل سرد شده و ازت مایع به خوبی ساییده شدند. ۳ میلی لیتر بافر استخراج (حاوی ۱ میلی مول PMSF، ۲ میلی مول DTT و ۲۰ میلی مول HCl) برای مدت ۳۰ دقیقه در دور 13000 درجه سانتی گراد سانتریفیوز گردیدند. بخش مایع حاوی عصاره پروتئینی پس از عبور از فیلتر میلی پور (0.05 میکرون) دیالیز شد و تعویض محلول بافر در فواصل زمانی معین تا 24 ساعت ادامه یافت (۱۰). سنجش میزان غلظت پروتئین در هر نمونه با به کار گیری آزمون بردفورد انجام شد (۱۱).

خشک گردن عصاره پروتئینی با استفاده از روش انجماد در خلاء با دستگاه Freeze dryer در دمای -50 - درجه سانتی گراد و فشار 0.011 تا 0.010 اتمسفر به مدت 24 ساعت صورت گرفت و نمونه ها تا زمان مصرف در فریزر -70 - درجه سانتی گراد 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 نمونه گیری تصادفی و به صورت 4 تکرار از 4 نمونه انجام شد. داده ها پس از جمع آوری و دسته بندی، توسط نرم افزار SPSS (Version 11.0) تجزیه و تحلیل شدند. برای این کار از روشهای آماری آنالیز واریانس یک طرفه و همبستگی درسطح معنی داری 0.05 استفاده گردید.

یافته ها

در این بخش، پس از 8 ماه مراحل مقدماتی کشت، تغییرات پروتئینی ایجاد شده در گیاهچه های 28 روزه تیمار شده با غلظت های مختلف 10 ، 50 و 200 میکرومولار SA از جنبه های زیر مورد بررسی واقع شد.

مطابق با آنچه در شکل 1 نشان داده شده است افزایش نسبی در میزان انباستگی سایر باندهای پروتئینی نسبت به تیمار شاهد صورت می گیرد. در تیمار شاهد، باندهای پلی پپتیدی و پروتئینی مختلف بسته به وزن مولکولی در محدوده بین 19 تا $86/8$ کیلو دالتون تشکیل می شود که در بین آنها بیشترین تراکم در محدوده باندهای پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی 39 کیلو دالتون مشاهده می شود.

تغییرات غلظت کل پروتئین موجود در عصاره برگی در شکل 2 نشان داده شده است. با افزایش غلظت SA موجود در

مکانیسم های دفاعی و سنتز پروتئین های دفاعی به عنوان یک راه کار مورد توجه قرار گرفته است.

از سوی دیگر، سالیسیلیک اسید (Salicylic acid=SA) که یک ماده شبه هورمون و متعلق به گروهی از فل های گیاهی است، امروزه به عنوان یک مولکول کلیدی مؤثر در القای بیان ژن های PR (Pathogenesis related) در طی پاسخ های دفاعی گیاه در نظر گرفته می شود (۴). همچنین نشان داده شد انباستگی SA برای بیان همه جانبی مقاومت نسبت به بیماری در گیاهان ضروری است (۵). سایر مطالعات نشان می دهد این ترکیب سنتز پروتئین های Heat shock protein (HSP) و فعال سازی برخی از پروتئین های کیتوزی را در کشت های تعلیقی مایع در گیاه توتون، تحت شرایط تنفس اسمزی، القا می نماید (۶، ۷). با این حال مکانیسم های تنظیم نشانه ای مقاومت در گیاهان نسبت به عوامل محیطی که با واسطه SA القا می گردد، هنوز به خوبی روشن نیست (۸).

چنانچه SA به عنوان یک حد واسط در القای پاسخ و انباستگی پروتئین های دفاعی می خک عمل نماید، ضمن افزایش مقاومت نسبی این گیاه در برابر عوامل محیطی، می تواند با تولید مقادیر بالاتری از پروتئین های کاربردی همراه باشد، از این رو در این پژوهش بر آن شدیدم تا با استفاده از فنون کشت بافت، به مطالعه و بررسی چگونگی تأثیر SA در القای پاسخ و تغییرات پروتئین های دفاعی گیاه می خک پردازیم.

مواد و روشها

این مطالعه تجربی طی سالهای $1380-83$ در مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات انجام شد.

کشت گیاه از بخش های گره دار ساقه در محیط OM BAP (دارای مقادیر 0.5 میلی گرم در لیتر Olive medium) (بنزیل آمینو پورین) و 0.2 میلی گرم در لیتر NAA استیک اسید، مناسب برای تکثیر شاخه و رشد جوانه های جانبی انجام شد. به منظور بررسی اثر سالیسیلیک اسید، غلظت های مختلف 10 ، 50 و 200 میکرومولار SA تهیه و به محیط کشت فوق افزوده شد. نمونه های کشت شده به مدت 4 هفته در قفسه های مناسب با شرایط کاملاً کنترل شده ای از نظر دما (25 ± 2 درجه سانتی گراد)، رطوبت، جریان هوا، کیفیت و طول مدت روشنایی (نور سفید و زرد، شدت 3600 لوکس و فتو پریوود 16 ± 8 ساعت) قرار داده شدند (۹). برای تهیه عصاره 3 گرم ساقه و برگ های بخش هوایی گیاهچه ها با استفاده از

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.

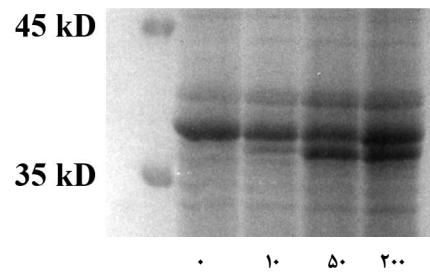
تغییراتی نیز در چگونگی وضعیت و میزان انباستگی باندهای پلی‌پپتیدی عصاره‌های پروتئینی مربوط به تیمارهای مختلف بسته به غلظت SA مورد استفاده صورت می‌گیرد که بیشتر در محدوده با وزن مولکولی تا ۴۵ کیلو Dalton قابل مشاهده است که این نتایج در جای خود تا حدی نشانگر تاثیر احتمالی SA بر بیوسنتز HSP پروتئین‌هاست. 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 کیلو Dalton 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 است که در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار SA افزایش انباستگی پروتئین‌های دفاعی ۱۶ کیلو Dalton 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 همسوی دارد. از سوی دیگر، با تشکیل باند نوپدید ۳۸ کیلو Dalton در نمونه‌های تیمار شده با ۱۰ میکرومولار SA، کاهش تراکم باند پروتئینی ۳۲ کیلو Dalton در شرایط تیمار با ۵۰ میکرومولار SA قبل مشاهده است و این در حالیست که انباستگی 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 انباستگی پروتئین‌های دفاعی می‌گردد که از این طریق علاوه بر افزایش مقاومت نسبی این گیاه در برابر عوامل محیطی می‌توان به مقادیر بالایی از

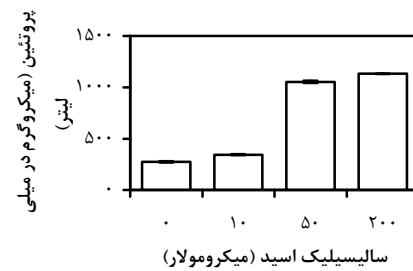
محیط کشد، میزان پروتئین‌های موجود در عصاره‌ها نیز به طور نسبی افزایش پیدا می‌کند و از نظر آماری بین غلظتهای پروتئینی استخراج شده از گیاهچه‌های مربوط به تیمارهای SA200، SA50، SA10، SA0 در تمام موارد تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ وجود دارد.

غلظت ۱۰ میکرومولار SA منجر به تشکیل یک باند باریک پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۳۸ کیلو Dalton در بخش زیرین باند ۳۹ کیلو Dalton می‌گردد. باندهای پروتئینی در محدوده‌های ۳۲ و ۲۷ کیلو Dalton نیز انباستگی 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 کیلو Dalton نسبت به تیمار SA10 افزایش نشان می‌دهد در صورتی که تراکم باند پروتئینی ۳۲ کیلو Dalton کاهش می‌یابد.

در تیمار دارای غلظت ۲۰۰ میکرومولار SA، افزایش میزان انباستگی به باندهای پروتئینی ۳۸ و ۳۹ کیلو Dalton 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 برگ دار 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

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دست اندر کاران 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.

بروتئین‌های 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 سنتر پروتئین‌های دفاعی که در طی پاسخ به عوامل مختلف محیطی در گیاه میخک القا می‌شوند، نیاز به تحقیقات وسیعتری می‌باشد.

REFERENCES

- Sobotka JJ. Clinical study of the efficacy and safety of carnation slender for weight reduction. *Curr Ther Res (VSA)* 1971;13:636-7.
- Mayak S, Tirosh T, Thompson JE, Ghosh S. The fate of ribulose 1, 5 bisphosphate carboxylase subunits during development of carnation petal. *Plant Physiol Biochem* 1998;36(11):835-41.
- 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.
- Metraux JP. Systemic acquired and salicylic acid: current state of knowledge. *Eur J Plant Pathol* 2001;107:13-18.
- Kang G, Wang C, Sun G, Wang Z. Salicylic acid changes activities of H₂O₂-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedling. *Environmental and Experimental Botany* 2003;50(1):9-15.
- Burkhanova EA, Fedina AB, Kulæva 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.
- 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.
- 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.
- Schnapp SR, Preece JE. In vitro growth reduction of tomato and carnation microplants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1986;6:3-8.
- Jiang WB, Mayak S, Weiss D, Halevy AH. Regulation of petal-specific ethylene induced 70-kDa protein from *Dianthus caryophyllum*. *Physiologia Plantarum* 1994;92(2):219-26.
- 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.
- 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.