

رویانزائی بدنی از قطعات ساقه *Hyoscyamus arachnoideus* Pojark. و بررسی کمی و کیفی پروتئین‌ها در مراحل مختلف آن

مهدیس ابراهیم‌زاده معبود^۱، مه‌لقا قربانلی^۲، حسن ابراهیم‌زاده معبود^۳

۱. گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

۳. گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم

چکیده

گیاهان سرده بنگ (*Hyoscyamus*) با داشتن خواص دارویی به واسطه وجود تروپان آلکالوئیدهای مختلف موجود در آنها همواره مورد توجه خاصی بوده‌اند. کاربرد روش‌های مهندسی ژنتیک برای تولید گیاهانی از این سرده با خواص دارویی ارزشمندتر و ازدیاد این گیاهان در زمان کوتاه و با صرف هزینه اندک یکی از جنبه‌های مورد توجه می‌باشد. رویانزائی بدنی و شناخت آن کمک شایانی در این زمینه خواهد بود. هدف از کار حاضر تلاش در جهت انجام رویانزائی بدنی و شناخت سازوکار آن از طریق بررسی پروتئینها در مراحل مختلف تشکیل رویان بود. در این پژوهش کشت قطعات ساقه در محیط کشت MS واجد BAP و IAA منجر به رویانزائی موفقیت آمیزی شد. بررسی کمی پروتئینهای محلول در مراحل مختلف نمو رویان تغییرات محتوای پروتئین را در مراحل مختلف تشکیل رویان نشان داد.

بررسی کیفی پروتئینها با استفاده از الکتروفورز بر روی دو نوع ژل پلی آکریل آمید در سیستم ناپوسته (PAGE و SDS PAGE) انجام شد. جرم مولکولی باندهای پروتئینی و پیتیدی تفکیک شده محاسبه گردید و معلوم شد در طی رویانزائی پروتئینها و پیتیدهای مختلف دچار پدیده‌های فراتنظیمی، فروتنظیمی و تعدیل می‌شوند. به علاوه پروتئینها و پیتیدهای نهادی و اصلی نیز شناسائی گردیدند.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز، بنگ، پروتئین، رویانزائی بدنی

مقدمه

اثرات درمانی سرده بنگ (*Hyoscyamus*) از زمان‌های قدیم برای انسان مشخص بوده است. ارزش دارویی این گیاهان بخاطر وجود تروپان آلکالوئیدهای موجود در آنها می‌باشد (Li et al., 2006).

کاربرد وسیع رویانزائی بدنی در تحقیقات پایه ای و نیز کاربردی، موجب سوق دادن مطالعات، بسوی مشخص نمودن شرایط در شیشه جهت القای رویانهای بدنی و تبدیل آنها به گیاه شده است (Gaj, 2004). پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک و بیوتکنولوژی مدیون کاربرد کشتهای در شیشه می‌باشد. لذا دستیابی به سیستم های مؤثر باززائی گیاهی که موجبات تولید سریع گیاهان زایا (fertile) و از نظر ژنتیکی با ثبات را فراهم می‌آورد در بیوتکنولوژی گیاهی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد.

از سیستم های مورد استفاده در شیشه، رویانزائی بدنی (SE) دارای ارزش خاصی می‌باشد (Gaj, 2004). بسیاری از مقایسه‌ها، شباهت های ریخت شناختی، یاخته شناختی و مولکولی انجام شده بین رویانزائی تخمی و بدنی، پیشنهاد کننده سازوکارهای (mechanism) تنظیمی مشابه بکار گرفته شده در هر دو شکل رویانزائی می‌باشند (Mordhorst et al., 1997). بنابراین رویانزائی بدنی یک سیستم ارزشمند برای واکاوی تأثیر عوامل مختلف بر رویان در حال نمو بوده (Mordhorst et al., 1997) و این به خاطر سهولت دستیابی به مقادیر بالائی از رویانهای جدا شده حتی در مراحل اولیه نمو می‌باشد (Luo et al., 2001). به این ترتیب این سیستم فرصتهائی را برای تولید در شیشه گیاهانی شبیه تیپ اصلی بکمک ازدیاد تاگی و همچنین باززائی گیاهان تغییر داده شده از طریق تراسختی ژنتیکی، و دو رگه سازی بدنی و القای جهش یافته در شیشه و انتخاب، را فراهم می‌آورد (Gaj, 2004).

افزایش پروتئین‌های ۲۲ و ۶۵ کیلودالتونی که احتمالاً پروتئینهای ذخیره ای می‌باشند همزمان با تشکیل رویانهای بدنی و در طی مراحل بعدی بلوغ محورهای رویانی، انجام می‌شود (Roja Rani et al., 2005). نمو کالوس رویانزا نیز با آمایش پلی پپتیدهای مخصوص رویانزایی (۳۵kD) همراه می‌شود (Kairong et al., 1999). همزمانی بالایی بین مراحل رویانزائی و رویداد مولکولی مربوط به زیست آمائی و انباشتگی پروتئین وجود دارد (Novozilova et al., 2004). در حالیکه پروتئین‌های ذخیره‌ای همراه با کاهش رویانزائی نیز مشاهده شده است (Roberts et al., 1989; Dahmer et al., 1992).

پروتئینهای فراوان در مراحل پایانی رویانزائی (LEA) در پاسخ به تنشهای خشکی (Liang et al., 2004; Tan and Kamada, 2000)، اسمزی و دمای پائین دارای عملکرد محافظتی هستند (Liang et al., 2004). در طی رویانزائی بدنی و تخمی اغلب از طریق ABA و بیان ژن القا شده بوسیله تنش آبی تنظیم می‌شود (Reinbothe et al., 1994; Campalans et al., 1999; Dodeman et al., 1997). پروتئین‌های کوچک تنش گرما (sHSPs) نیز در مراحل نموی خاص نظیر رویانزائی بیان می‌شوند (Lubaretz and Nieden, 2002).

آندوکیتیناز اسیدی گلیکوزیلی شده، یکی از پروتئینهای ترشح شده به محیط رشد کشتهای تعلیقی می‌باشد (de Jong et al., 1992)، که نقش آن در رویانزائی بدنی جدا کردن مولکول یا مولکول‌های علامتی از یک ماده شناخته نشده می‌باشد (Arnold et al., 2002). وجود پروتئین برون یاخته‌ای ۹ کیلو دالتونی نیز در محیط کشت رویانزا مشاهده شده است (Blanckaert et al., 2002). پروتئین‌های آرابینوگالاکتانانی (AGPs) که برای نمو رویان بدنی و افزایش تعداد رویانها (Vroemen et al., 1999; ajewska-Sawka and Nothnagel, 2000; van Hengel, 001) مهم هستند، در دیواره‌های

(and Nieden, 2002) موجب اين اميدواري مي‌شود كه نتايج حاصل از بررسي رويانزائي بدني قابل تعميم براي رويانزائي تخمي هم مي‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گياهي

در اين پژوهش يك گونه سرده بنگ (*Hyoscyamus*) به نام *H. arachnoideus* Pojark. مورد ارزيابي قرار گرفت. بذرهای *H. arachnoideus* از منطقه شهر تبريز مشتمل بر پارک ائل گلي، جاده وادي رحمت، ابتداي جاده باسمانج جمع آوري شدند.

خفتگي بذرها با خيساندن آنها به مدت ۱۲ ساعت در ژبيرليک اسيد (35mg l^{-1}) برطرف گرديد. بذرهای *H. arachnoideus* به علت داشتن پوسته سخت قادر به جوانه زني نيستند. جهت برطرف کردن اين مانع، بذرهای به مدت ۳۰-۱۵ ثانيه در سولفوريك اسيد غليظ قرار داده سپس چندين بار آبكشي گرديدند.

پس از سترون کردن بذرها، در محيط كشت MS فاقد تنظيم كننده رشد كشت داده شدند. دانه رست‌های سترون ۱۲-۱۰ روزه حاصله جهت كشت بافت مورد استفاده قرار گرفتند. قطعات ساقه بدست آمده از دانه رست سترون در محيط كشت MS واجد $1/5\text{ mg l}^{-1}$ بنزيل آمينو پورين (BAP) و $0/2\text{ mg l}^{-1}$ اندول استيك اسيد (IAA) كشت شدند. نمونه برداري در طی رويانزائي انجام گرديد. به اين صورت كه ساقه (زمان صفر)، كالوس و كالوس رويانزا جمع آوري شدند. نمونه‌های جمع شده ابتدا در ازت مایع تثبيت شده و بعد در فریزر 70°C - نگهداري شدند تا بعداً براي آزمايشهای بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

جهت بررسي تغييرات پروتئين‌ها در مراحل مختلف رويانزائي ابتدا عمل استخراج (Bollage and Edelstein, 1991) عصاره‌های پروتئيني انجام گرفت. بافر فسفات $0/2$

ياخته‌ای و شامه‌های پلاسمایی وجود دارند و در محيط‌های كشت نيز يافت مي‌شوند (apman et al., 2000; Thompson and Knox, 1998). افزودن AGP‌ها به كشت‌های رويانزا، رويانزائي بدني را براه مي‌اندازد (Kreuger and van Holst, 1993) و تشكيل رويان‌های بدني نمو يافته‌تر را در دودمان‌های ياخته‌ای با رويانزائي پائين در نوتل (*Picea abies*) باعث مي‌شود (Egertsdotter & VanArnold, 1995). ليپوكتو اوليگوساكاريدها (LCOs) مولكول‌های علامتي در رويانزائي بدني هستند كه در تنظيم نمو رويان بدني دخيل مي‌باشند (Arnold et al., 2002) و به عنوان محرک رويان‌های بدني جهت پيشبرد مرحله آخر كروي شدن (de Jong et al., 1993) و راه‌اندازي نمو توده‌های پيش روياني از توده‌های ياخته‌ای كوچك بكار مي‌روند (Egertsdotter and van Arnold, 1998; Dyachok et al., 2000). مشابه‌های LCO‌های دروني، در ساختار عوامل گرهكي شدن ريزوبیومی، از AGP‌ها بوسيله عمل آندوكيتينازها آزاد شده و بعنوان مولكول‌های علامتي نمو تشكيل رويان‌های بدني را تحريك مي‌نمايند (Arnold et al., 2002). پروتئين كيناز I گيرنده رويانزائي بدني در آرابيدوپسيس تاليانا در يك مسير علامت‌دهی دارای عملكرد مي‌باشد (Kwaaitaal et al., 2005).

H_2O_2 بعنوان يك پيك ثانوي ياخته‌ای (Bauerl, 1991; Cui et al., 1999) و يك علامت بين ياخته‌ای متحرک براي فعال سازي انتخابی ژن‌های محافظتي ياخته‌ای (Chappell et al., 1997) قادر به القای بيان ژن و آمایش پروتئين (احتمالاً پروتئين‌های اسیدی با وزن مولكولي پائين) (Cui et al., 2002) است (Wilekens et al., 1994) و به اين ترتيب رويانزائي بدني را براه مي‌اندازد (Cui et al., 1999).

شبهات بين رويان‌های بدني و دانه سويا (Schmidt et al., 2005) و شباهت پروتئين‌های موجود در گياهان ذرت با رويانزائي شده از طريق رويانزائي بدني و رويانزائي تخمي (Lubaretz

تجزیه و تحلیل مخلوط پروتئینها و تعیین خلوص اجزای پروتئینی با استفاده از دو روش الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید در سیستم ناپیوسته انجام شد:

۱- بر روی ژل غیر احیا کننده (PAGE).

۲- بر روی ژل احیا کننده حاوی سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE).

پس از خاتمه عمل الکتروفورز رنگ آمیزی ژلها انجام شد (کوماسی بریلینت بلو R-250: ۰/۲۵ گرم؛ متانل: ۱۲۵ میلی لیتر؛ استیک اسید گلاسیال: ۲۵ میلی لیتر؛ آب مقطر: ۱۰۰ میلی لیتر)

از آنجا که علاوه بر پروتئینها بخشهای دیگر ژل نیز رنگ می گیرند پس از رنگ آمیزی رنگبری ژلها برای حذف رنگهای اضافی، روشن شدن زمینه ژل و وضوح بیشتر نوارهای پروتئینی با استفاده از محلول رنگ بر انجام شد. این محلول شامل ۷۰ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال، ۳۰۰ میلی لیتر اتانول مطلق (۱۰۰٪) و ۶۳۰ میلی لیتر آب مقطر می باشد. تعیین میزان تحرک نسبی (Rm) (Hames and Richwood, 1999) نوارهای پروتئین مشاهده شده بر روی ژل با استفاده از رابطه زیر انجام شد:

مولار با $pH = 7/8$ برای استخراج مورد استفاده قرار گرفت می توان برای جلوگیری از اکسایش ترکیبات فنلی و اثر سوء آنها در سنجش پروتئین در ۱٪ PVPP استفاده کرد. نسبت استخراج ۱:۱/۵ w/v مناسب تشخیص داده شد. کلیه مراحل استخراج در دمای $4^{\circ}C$ انجام شد. روش بکار رفته برای اندازه گیری کمی پروتئینهای محلول در عصاره پروتئینی روش برادفورد بود (Bradford, 1976).

ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از پروتئینهای استاندارد انجام شد. برای اندازه گیری کمی پروتئینهای محلول در عصاره های مورد نظر با احتساب سه تکرار برای هر نمونه، لوله های آزمایش مورد نیاز را برداشته و داخل هر کدام ۵ میلی لیتر معرف برادفورد ریخته شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از عصاره پروتئین مربوط را به آن اضافه کرده و سریعاً با کمک ورتکس عمل مخلوط شدن انجام گرفت. در مورد لوله شاهد ۰/۱ میلی لیتر آب مقطر یا بافر استخراج به ۵ میلی لیتر معرف برادفورد اضافه کرده و پس از گذشت ۲۰ دقیقه خواندن جذب غلظت های مربوطه آغاز شد. آزمون آماری Kuskal-Wallis جهت بررسی نتایج انجام شد.

$$Rm = \frac{\text{مسافت پیموده شده توسط هر نوار پروتئینی در ژل زیرین یا فاصله نوار پروتئینی از ابتدای ژل زیرین}}{\text{مسافت پیموده شده توسط هر رنگ در ژل زیرین یا فاصله خط پیشروی رنگ از ابتدای ژل زیرین}}$$

بررسی کمی پروتئین‌های محلول در مراحل مختلف نمو

رویان

با استفاده از روش برادفورد مقدار پروتئین‌های موجود در عصاره های پروتئینی تهیه شده از نمونه ها در مراحل مختلف تشکیل رویان (از ساقه تا کالوس رویانزا بر حسب میلی گرم پروتئین در هر گرم بافت تر بدست آمد (جدول ۱).

منحنی تغییرات مقدار پروتئینها در طی تشکیل رویان رسم گردید (شکل ۱). با توجه به جدول ۱ و شکل ۱ مشخص گردید که در *H.arachnoideus* محتوای پروتئین در ساقه بالا بوده، در کالوس و کالوس رویانزا کاهش می‌یابد. استفاده از آزمون آماری کروسکال والیس مشخص نمود که اختلاف محتوای پروتئینها در طی تشکیل رویان از بخش جداگشت ساقه‌ای معنی دار نیست [Chi-square(p): ۰/۴۸۰(۰/۸۲۷)].

بررسی کیفی پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورزدرژل

پلی‌آکريل آميد

الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکريل آميد در سیستم ناپيوسته انجام شد. از دونوع ژل پلی‌آکريل آميد جهت این آزمون استفاده گردید:

الکتروفورز بر روی ژل غیر احیا کننده (PAGE)

الکتروفورز در سیستم ناپيوسته ژل غیر احیا کننده (PAGE) ۱۰ پروتئین مختلف را در طی تشکیل رویان از جداگشت ساقه‌ای *H.arachnoideus* نشان داد (شکل ۲). Rm (Relativ mobility)، جرم مولکولی و تغییرات پروتئینها در مراحل مختلف تشکیل رویان در جدول ۲ نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد که در طی رویانزائی پروتئین ۲ با جرم مولکولی ۱۱۷/۴ کیلودالتون کاهش، پروتئین‌های ۷، ۸ و ۱۰ با جرم مولکولی بترتیب ۴۶/۵، ۴۸/۸ و ۳۲/۵ کیلو دالتون افزایش و پروتئین‌های ۱، ۳، ۵، ۶ و ۹ با جرم مولکولی ۱۲۰/۵، ۶۹، ۵۶/۸، ۵۱/۶ و ۳۵/۸ کیلودالتون در طول رویانزائی تقریباً یکسان ظاهر شدند.

برای تعیین جرم مولکولی پروتئینها ابتدا باید منحنی استاندارد بر اساس میزان تحرک نسبی (Rm) پروتئین‌های استاندارد با جرم مولکولی مشخص در ژلهای PAGE رسم گردد. محور افقی Rm و محور عمودی لگاریتم جرم مولکولی می‌باشد. با کمک منحنی استاندارد، از روی Rm محاسبه شده برای هر باند پروتئینی جرم مولکولی آن باند بدست آمد.

الکتروفورز در ژل پلی‌آکريل آميد در سیستم ناپيوسته ژل کاهنده محتوی سدیم دو دسیل سولفات SDS-PAGE انجام شد. الکتروفورز ژلهای صفحه‌ای پلی‌آکريل آميد به روش لاملی بطور گسترده ای برای تعیین وزن مولکولی و تفکیک زیر واحدهای پروتئینی بکار می‌رود (Laemmeli, 1970). پس از انجام الکتروفورز رنگ آمیزی، رنگ بری، محاسبه Rm و جرم مولکولی همانطور که قبلاً توضیح داده شد انجام گرفت.

نتایج

کشت

پس از گذشت حدود دو هفته از کشت بذرها در محیط کشت MS فاقد هورمون‌های رشد دانه رسته‌های سترون به اندازه مناسب جهت انتخاب جداگشت مورد نظر رسیدند. قطعات ساقه در محیط کشت MS واجد هورمون‌های BAP (۱/۵ میلی گرم در لیتر) و IAA (۰/۲ میلی گرم در لیتر) کشت داده شدند.

پس از کشت ساقه‌ها در محیط کشت MS واجد هورمون‌های BAP (۱/۵ میلی گرم در لیتر) و IAA (۰/۲ میلی گرم در لیتر) ساقه‌ها ابتدا باد کرده شروع به کالوسی شدن کردند و بالاخره کالوس تشکیل شده. کالوسها به تدریج به کالوس رویانزا تبدیل شده و بعد از مدتی بر روی کالوس رویانها نمایان شدند. رویانها بر روی کالوس مراحل تمایزی خود را طی کرده و بلوغ یافتند.

الکتروفورز بر روی ژل احیا کننده (SDS PAGE)

با الکتروفورز در سیستم نا پیوسته ژل احیا کننده (SDS PAGE) در *H.arachnoideus* ۱۴ پپتید مختلف در طی تشکیل رویان از جداگشت ساقه ای شناسایی شد (شکل ۳). Rm، جرم مولکولی و تغییرات پپتیدها در مراحل مختلف تشکیل رویان در جدول ۳ نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد که در طی رویانهائی پپتیدهای ۱، ۵، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ با جرم‌های مولکولی ۵۸/۷، ۴۰/۲، ۳۲/۴، ۲۴/۹، ۲۱/۱، ۱۸/۷ و ۱۴/۸ کیلودالتون افزایش و پپتیدهای ۲، ۳ و ۶ بترتیب با جرم‌های مولکولی ۵۴/۶، ۴۹/۷ و ۳۶/۶ کیلودالتون ابتدا افزایش و سپس کاهش و پپتیدهای ۷، ۹ و ۱۱ با جرم‌های مولکولی ۳۴، ۲۶/۸ و ۲۲/۷ به تدریج کاهش می‌یابند.

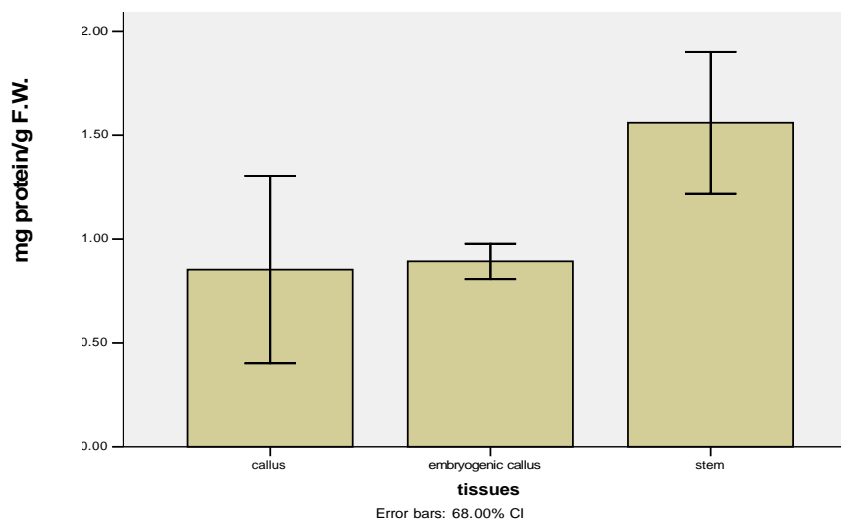
حضور یا عدم حضور پپتیدها و پروتئینها در مراحل مختلف رویانهائی نشان دهنده نقش آنها در این پدیده تمایزی می‌باشد. آنهایی که در برخی مراحل موجود بوده و در برخی دیگر از مراحل مشاهده نشده اند نقش اصلی را در تمایز دارا می‌باشند. اما آنهایی که در تمام مراحل وجود دارند ولی مقدارشان تغییر می‌نماید پروتئینها یا پپتیدهای نهادی (conservative) هستند که در فعالیت‌های عمومی تمایز نقش خود را ایفا می‌نمایند. بنابر این با توجه به جدول ۲ (PAGE) می‌توان گفت پروتئین ۲ با جرم مولکولی ۱۱۷/۴ جزء پروتئینهای اصلی دخیل در تمایز می‌باشد. پروتئینهای ۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ بترتیب با جرم‌های مولکولی ۱۲۰/۵، ۶۹، ۶۱، ۵۶/۸، ۵۱/۶، ۴۶/۵، ۴۴/۸، ۳۵/۸ و ۳۲/۵ پروتئین‌های نهادی دخیل در فعالیت‌های عمومی تمایز می‌باشند. توجه به جدول ۳ (SDS PAGE) نیز نشان می‌دهد که پپتیدهای ۱، ۲، ۴، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ به ترتیب با جرم‌های مولکولی ۵۸/۷، ۵۴/۶، ۴۳/۱، ۳۴، ۳۲/۴، ۲۶/۸، ۲۴/۹ و ۲۲/۷ پپتیدهای اصلی دخیل در تمایز هستند. پپتیدهای ۳، ۵، ۶، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ بترتیب با جرم‌های مولکولی ۵۴/۶، ۴۹/۷، ۴۰/۲، ۳۶/۶، ۲۱/۱،

۱۸/۷ و ۱۴/۸ پپتیدهای نهادی دخیل در فعالیت‌های عمومی تمایز می‌باشند.

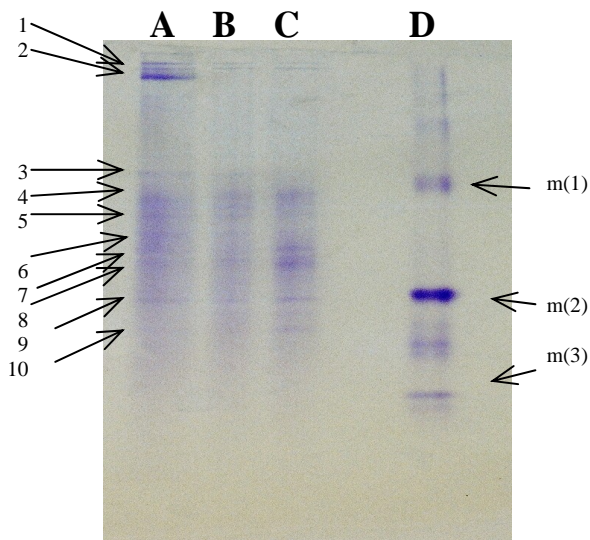
همچنین توجه به فراتنظیمی (up-regulation)، فروتنظیمی (down-regulation) و تعدیل (modulation) پروتئین‌ها و پپتیدها در طی نمو رویان نظر مارا به برداشت مطالب زیر از جدول‌های ۲ و ۳ و شکل‌های ۲ و ۳ جلب می‌نماید: می‌توان از شکل ۲ و جدول ۲ که در آنها تفکیک پروتئینها (PAGE) در مراحل مختلف تشکیل رویان از بخش جداگشت ساقه‌ای نشان داده شده است، دریافت که در طی رویانهائی پروتئین ۲ با جرم ۱۱۷/۴ کیلودالتون دچار فروتنظیمی و پروتئین‌های ۳، ۷، ۸ و ۱۰ بترتیب با جرم‌های مولکولی ۶۹، ۴۶/۵، ۴۴/۸ و ۳۲/۵ کیلودالتون دچار فراتنظیمی شده‌اند. پروتئین‌های ۱، ۴، ۵، ۶ و ۹ به ترتیب به جرم‌های مولکولی ۱۲۰/۵، ۶۱، ۵۶/۸، ۵۱/۶ و ۳۵/۸ در طی تشکیل رویان تقریباً به طور یکسان بیان شده‌اند. توجه به شکل ۳ و جدول ۳ که در آنها تفکیک پپتیدها (SDS PAGE) در مراحل مختلف تشکیل رویان از بخش جداگشت ساقه‌ای نشان داده شده است نیز فروتنظیمی پپتیدهای ۷، ۹ و ۱۱ با جرم‌های مولکولی ۳۴، ۲۶/۸ و ۲۲/۷ کیلودالتون و فراتنظیمی پپتیدهای ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ بترتیب با جرم‌های مولکولی ۵۸/۷، ۴۹/۷، ۴۳/۱، ۳۴، ۳۲/۴، ۲۴/۹، ۲۱/۱، ۱۸/۷ و ۱۴/۸ کیلودالتون قابل توجه می‌باشد.

جدول ۱: مقدار پروتئین‌ها (mg protein/g F.W.) در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت ساقه‌ای *H.arachnoideus*. Chi-square(p) ۵/۹۵۶(۰/۰۵۱)

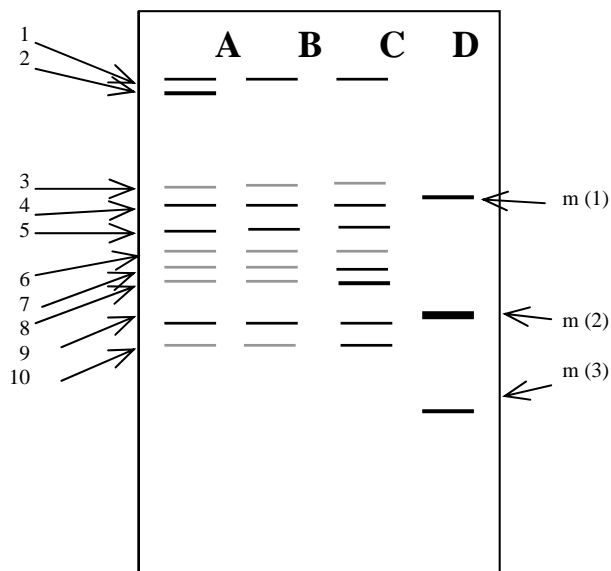
tissue	Protein cocentration mg protein/g F.W.
Stem	1.56
Callus	0.856
Embryogenic callus	0.859



شکل ۱: نمودار تغییرات پروتئین در طی مراحل مختلف تشکیل رویان از بخش جداگشت ساقه‌ای *H.arachnoideus*



(الف)



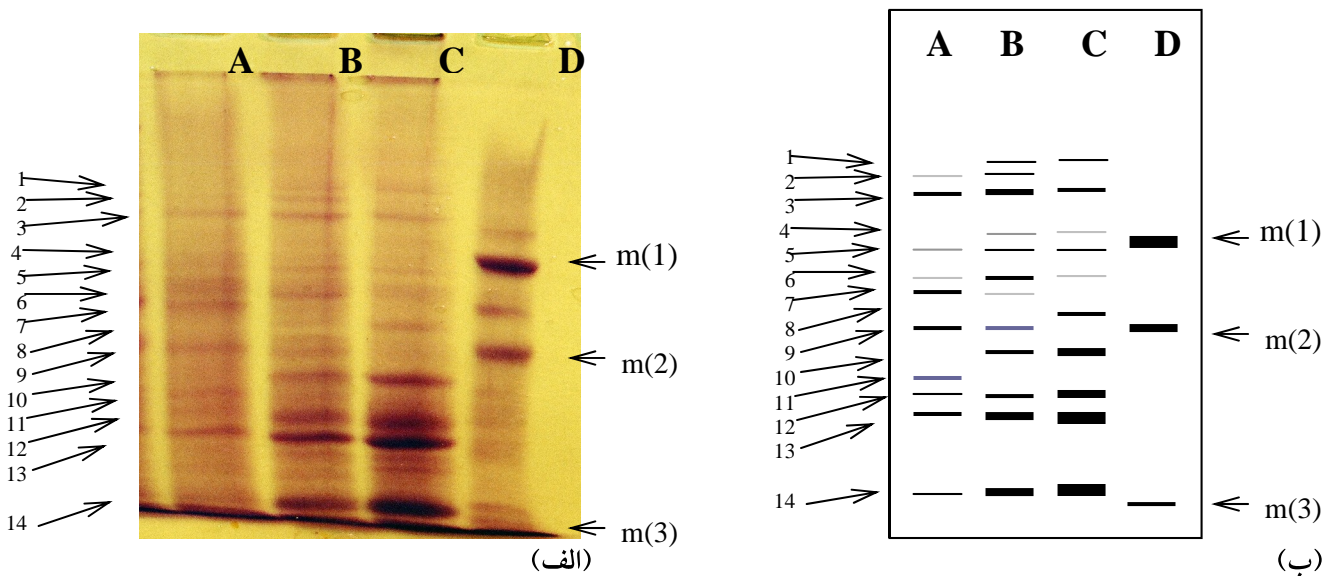
(ب)

شکل ۲: تفکیک پروتئین‌های ساقه (A)، کالوس (B)، کالوس رویانزا (C) به روش PAGE در *H.arachnoideus*. (الف) عکس طبیعی.

(ب) نمایش شماتیک باندها. شماره‌های ۱ تا ۱۰ شماره باندهای پروتئینی تفکیک شده می‌باشد. m(1)، m(2) و m(3): پروتئینهای استاندارد با جرمهای مولکولی به ترتیب ۶۰، ۴۵ و ۲۰ هزار دالتون (G).

جدول ۲: تجزیه و تحلیل الکتروفورز پروتئینها در مراحل مختلف تشکیل رویان (بخش جداگشت:ساقه) به روش PAGE در *H. arachnoideus*. + ← +++++ مقادیر نسبی باندهای پروتئینی. شماره های ۱-۱۰ شماره باندهای پتیدی نشان داده شده در شکل ۲ می باشد.

number	R _m	Molecular weight	stem	callus	Embryogenic Callus
1	0.03	120.5	+++	+++	+++
2	0.04	117.4	+++++		
3	0.26	69	+	+	+
4	0.31	61	+++	+++	+++
5	0.34	56.8	+++	+++	+++
6	0.38	51.6	+	+	+
7	0.42	46.5	+	+	+++
8	0.44	44.8	+	+	+++++
9	0.53	35.8	+++	+++	+++
10	0.57	32.5	+	+	+++



شکل ۳: تفکیک پپتیدهای ساقه (A)، کالوس (B)، کالوس رویانزا (C) به روش SDS PAGE در *H. arachnoideus*. (الف) عکس طبیعی. (ب) نمایش نمادین باندها. شماره های ۱ تا ۱۴ شماره باندهای پروتئینی تفکیک شده می باشد. m(1), m(2) و m(3) پروتئینهای استاندارد با جرمهای مولکولی بترتیب ۶۰، ۴۵ و ۲۰ هزار دالتون (D).

جدول ۳: تجزیه و تحلیل الکتروفورز پپتیدها در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت ساقه ای به روش SDS PAGE در *H. arachnoideus*. + ← +++++ مقادیر نسبی باندهای پتیدی. شماره های ۱-۱۴ شماره باندهای پتیدی نشان داده شده در شکل ۳ می باشد.

number	R _m	Molecular weight	stem	callus	Embryogenic Callus
1	0.258	58.7		++++	++++
2	0.294	54.6	+	++++	
3	0.341	49.7	+++++	+++++	+++++
4	0.411	43.1		++	+
5	0.447	40.2	++	++++	++++
6	0.492	36.6	+	+++++	+
7	0.529	34	+++++	+	
8	0.552	32.4			+++++
9	0.647	26.8	+++++	+++	
10	0.682	24.9		+++++	+++++
11	0.729	22.7	+++		
12	0.764	21.1	++++	+++++	+++++
13	0.823	18.7	+++++	+++++	+++++
14	0.941	14.8	++++	+++++	+++++

بحث

رویانزائی بدنی عبارتست از فرایندی که طی آن یک ساختار دو قطبی مشابه رویان تخمی از یک یاخته غیرتخمی بدون اتصال آوندی با بافت اصلی تشکیل می‌شود. رویانهای بدنی بمنظور مطالعه تنظیم نمو رویان مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما در عین حال ابزاری در جهت ازدیاد غیرجنسی در مقیاس بزرگ را نیز فراهم می‌آورند. رویانزائی بدنی برای ازدیاد گیاهانی که از نظر اقتصادی مهم هستند بکار می‌رود (Hagman et al., 2006; Silver et al., 2004; Arrigoni et al., 1992). کاربرد وسیع رویانزائی بدنی در تحقیقات پایه ای و نیز کاربردی، موجب سوق دادن مطالعات، بسوی مشخص نمودن شرایط در شیشه جهت القای رویانهای بدنی و تبدیل آنها به گیاه شده است (Gaj, 2004). پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک و بیوتکنولوژی مدیون کاربرد کشتهای در شیشه می‌باشد. لذا دستیابی به سیستم های مؤثر باززائی گیاهی که موجبات تولید سریع گیاهان زیبا و از نظر ژنتیکی با ثبات را فراهم می‌آورد در بیوتکنولوژی گیاهی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. از سیستم‌های مورد استفاده در شیشه، رویانزائی بدنی (SE) دارای ارزش خاصی می‌باشد (Gaj, 2004). بسیاری از مقایسه‌ها، شباهت های ریخت شناختی، یاخته شناختی و مولکولی انجام شده بین رویانزائی تخمی و بدنی پیشنهاد کننده سازوکارهای تنظیمی مشابه بکار گرفته شده در هر دو شکل رویانزائی می‌باشند (Mordhorst et al., 1997). بنابراین رویانزائی بدنی یک سیستم ارزشمند برای واکاوی تأثیر عوامل مختلف بر رویان در حال نمو می‌باشد (Mordhorst et al., 1998) و این به خاطر سهولت دستیابی به مقادیر بالائی از رویانهای جدا شده حتی در مراحل اولیه نمو می‌باشد (Luo et al., 2001). به این ترتیب این سیستم فرصتهائی را برای تولید در شیشه گیاهان شبیه تیپ اصلی بکمک ازدیاد تاگی و همچنین باززائی گیاهان

تغییر داده شده از طریق تراریختی ژنتیکی، و دو رگه‌سازی بدنی و القای جهش یافته در شیشه و انتخاب، را فراهم می‌آورد (Gaj, 2004).

در بررسی حاضر کشت قطعات برگ در محیط کشت MS واجد BAP ($1/5 \text{ mg l}^{-1}$) و IAA ($0/2 \text{ mg l}^{-1}$) منجر به رویانزائی موفقیت آمیزی شد.

بنابر مطالب گفته شده در بالا درباره اهمیت رویانزائی، شناخت سازوکار رویانزائی ما را در رسیدن به اهداف ذکر شده یاری خواهد کرد. یکی از راههای رسیدن به این شناخت بررسی تغییرات پروتئینها در طی مراحل مختلف تشکیل رویان می‌باشد.

افزایش پروتئین‌های ۲۲ و ۶۵ کیلودالتونی که احتمالاً پروتئینهای ذخیره ای می‌باشند همزمان با تشکیل رویان‌های بدنی و در طی مراحل بعدی بلوغ محورهای رویانی انجام می‌شود (Roja Rani et al., 2005). نمو کالوس رویانزا نیز با آمایش سنتز پلی پپتیدهای مخصوص رویانزایی (۳۵kD) همراه می‌شود (Kairong et al., 1999). همزمانی بالایی بین مراحل رویانزائی و رویداد مولکولی مربوط به زیست آمایی و انباشتگی پروتئین وجود دارد (Novozilova et al., 2004)، در حالی که پروتئین‌های ذخیره‌ای همراه با کاهش رویانزائی نیز مشاهده شده است (Roberts et al., 1989; Dahmer et al., 1992).

در پژوهش حاضر نیز تغییرات پروتئینهای در مراحل مختلف رویانزائی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی کمی پروتئین‌های محلول در مراحل مختلف نمو رویان نشان داد که در *H.arachnoideus* محتوای پروتئین در ساقه بالا بوده، در کالوس و کالوس رویانزا کاهش یافت.

بررسی کیفی پروتئینها با استفاده از الکتروفورزبر روی ژل پلی آکریل آمید در سیستم ناپیوسته انجام شد. از دونوع ژل پلی آکریل آمید جهت این آزمون استفاده گردید.

منابع

- Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. and Filonova L. (2002).** Developmental pathways of somatic embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 233-249.
- Arrigoni O., Gara L., Tommasi F., and Liso R. (1992).** Change in ascorbate system during seed development of *Vicia faba*. *Plant Physiol*. 99: 235-238.
- Bauerl P.A. (1991)** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1 EMBO J. 10: 2247-2258.
- Blanckaert A., Belingheri L., Sautiere P-E., Vasseur J. and Hilbert J-L. (2002).** 9-KDa acidic and basic nsLTP-like proteins are secreted in the culture-medium conditioned by somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol: 40. Issue 4. P: 339-345.
- Bollage D.M. and Edelstein S.J. (1991).** Protein Methods. third edition, Wiley-Liss, Inc. New York.
- Bradford M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254.
- Campalans A., Messeguer R., Goday A. and Pages M. (1999).** Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*. 37(5): 327-340.
- Chapman A., Blervacq A.S., Vasseur J. and Hilbert J-L. (2000).** Arabinogalactan proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localization during embryo development. *Planta* 211: 305-314.
- Chappell J., Levin A., Tenhaken R., Lusso M. and Lamb C. (1997).** Characterization of a diffusible signal capable of inducing defense gene expression in tobacco. *Plant Physiol*. 113: 621-629.
- Cui K.R., Xing G.S., Liu X.M., Xing G.M. and Wang Y.F. (1999).** Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci*. 146: 9-16.
- Cui K.R., Li J., Xing G.M., Wang L. and Wang Y.F. (2002).** Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 68: 187-193.
- Dahmer M.L., Hilderbrand D.F., Collins G.B. (1992).** Comparative protein accumulation patterns in soybean somatic and zygotic embryos. *In Vitro Cell. dev. Biol. Plant*. 28: 106-114.

الکتروفورز در سیستم ناپیوسته ژل غیراحیا کننده (PAGE) نشان داد که پروتئین واجد جرم مولکولی ۱۱۷/۴ جزء پروتئینهای اصلی دخیل در تمایز می باشد و پروتئین هایی با جرم های مولکولی ۱۲۰/۵، ۶۹، ۶۱، ۵۶/۸، ۵۱/۶، ۶۷/۵، ۴۴/۸، ۳۵/۸ و ۳۲/۵ پروتئینهای نهادی دخیل در فعالیت های عمومی تمایز می باشند. توجه به الکتروفورز دوم (SDS PAGE) نیز نشان می دهد که پپتیدهایی با جرم های مولکولی ۵۸/۷، ۵۴/۶، ۴۳/۱، ۳۴، ۳۲/۴، ۲۶/۸، ۲۴/۹ و ۲۲/۷ پپتیدهای اصلی دخیل در تمایز هستند. پپتیدهای واجد جرم های مولکولی ۱۴/۸، ۵۴/۶، ۴۹/۷، ۴۰/۲، ۳۶/۶، ۲۱/۱، ۱۸/۷ و ۱۴/۸ پپتیدهای نهادی دخیل در فعالیت های عمومی تمایز می باشند. همچنین توجه به فراتنظیمی، فروتنظیمی و تعدیل پروتئینها و پپتیدها در طی نمو رویان نظر مارا به برداشت این مطالب جلب نمود که در الکتروفورز اول (PAGE) در طی رویانزائی پروتئین واجد جرم مولکولی ۱۱۷/۴ کیلو دالتون دچار فروتنظیمی، و پروتئینهایی با جرم های مولکولی ۶۹، ۶۷/۵، ۴۴/۸ و ۳۲/۵ کیلو دالتون دچار فراتنظیمی شده اند. پروتئین هایی با جرم های مولکولی ۱۲۰/۵، ۶۱، ۵۶/۸، ۵۱/۶ و ۳۵/۸ در طی تشکیل رویان تقریباً به طور یکسان بیان شده اند. توجه به الکتروفورز دوم (SDS PAGE) نیز فروتنظیمی پپتیدهایی با جرم های مولکولی ۳۴، ۲۶/۸ و ۲۲/۷ کیلو دالتون و فراتنظیمی پپتیدهای واجد جرم های مولکولی ۵۸/۷، ۵۴/۶، ۴۹/۷، ۴۳/۱، ۴۰/۲، ۳۶/۶، ۳۲/۴، ۲۴/۹، ۲۱/۱، ۱۸/۷ و ۱۴/۸ کیلو دالتون را نشان می دهد.

شبهات بین رویان های بدنی و دانه (Schmidt et al., 2005) و تشابه پروتئینهای موجود در گیاهان باززائی شده از طریق رویانزائی بدنی و رویانزائی تخمی (Lubaretz and Nieden, 2002) موجب این امیدواری می شود که نتایج حاصل از بررسی رویانزائی بدنی قابل تعمیم برای رویانزائی تخمی هم می باشد.

- De Jong A.J., Cordewener J., Lo Shiuo F., Terzi M., Vande kerckhove J., van Kammen A. and de Vries S.C. (1992).** A *Daucus carota* somatic embryo mutant is rescued by chitinoise Plant Cell. 4: 425-433.
- De Jong A.J., Heidstra R., Spaink H.P., Hartog M.V. Meijer E.A., Hendriks T., Lo Shiavo F., Terzi M., Bisseling T., van Kammen A., and de Vries S.C. (1993).** *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a *Daucus carota* somatic embryo variant. Plant Cell. 5: 615-620.
- Dodeman V. L., Ducreux G. and Kreis M. (1997).** Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. J. Exp. Bot. 48: 1493-1509.
- Dyachok J.V., Tobin A.E., Price N.P.J. and von Arnold S. (2000).** Rhizobial nod factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. Plant Cell Rep. 19: 290-297.
- Egertsdotter U. and van Arnold S. (1998).** Development of somatic embryos in Norway spruce. J. Exp. Bot. 49: 155-162.
- Egertsdotter U. and van Arnold S. (1995).** Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). Physiol. Plant. 93: 334-345.
- Gaj M.D. (2004).** Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regulation. 43: 27-47.
- Haggman H., Vuosku J., Sarjala T., Jokela A. and Niemi K. (2006).** Somatic embryogenesis of pine species : from functional genomics to plantation forestry. Plant Cell Monographs. 2: 1861-1370.
- Hames B.D. and Richwood D. (1999).** Gel Electrophoresis of Proteins: A practical Approach second edition, Oxford university. Press, New York.
- Kairong C., Gengsheng X., Xinmin L., Gengmei X., Yafu W., (1999).** Effect of hydrogenperoxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L., Plant science. 149: 9-16.
- Kreuger M. and van Holst G.J. (1993).** Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Pacus carota* L. Planta 189: 243-248.
- Kwaaitaal M., Vries S. and Russinava E. (2005)** *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein is present in sporophytic and gametophytic cells and undergoes endocytosis. Plant and Fungal Endocytosis. 226(1-2) 55-65.
- Laemmeli U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227: 680-685.
- Li R., Reed D.W., Liu E., Nowak J., Pelcher L.E., Page J.E. and cevello P. S. (2006).** Functional genomic Analysis in *Hyoscyamus niger* Reveals a Cytochrome P450 Involved in Littorine Rearrangement. Chemistry and Biology. 13(5): 513-520.
- Liang C., Xi Y., Shu J., Li J., Yang J., Che K., Jin D., Liu X., Weng M., He Y. and Wang B. (2004).** Construction of a BAC library of physcomitrella patens and isolation of a *LEA* gene. Plant Science. 167(3): 491-498.
- Lubaretz O. and Nieden U. (2002)** Accumulation of plant small heat-stress proteins in storage organs. Planta. 215(2): 220-228.
- Luo J. P., Jiang S. T. and Pan L. J. (2001).** Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall. : relationship with H₂O₂ production and H₂O₂ –metabolizing enzyme activities. Plant Science. 161: 125-132.
- Majewska-Sawka A. and Nothnagel E.A. (2000).** The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. Plant Physiol. 122: 3-9.
- Mordhorst A.P., Toonen M. A.J. and de Vries S.C. (1997).** Plant embryogenesis. Crit. Rev. Plant Sci. Vol: 16. P: 535-576.
- Mordhorst A.P., Voerman K.J., Hartog M. V., Meijer E.A., van Went J., Koorneef M. and de Vries S.C. (1998).** Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutation in genes repressing meristematic cell divisions. Genetics. 149: 549-563.
- Novozhilova O.A., Grinash M.N., Arefeva L.P. and Semikhov V.F. (2004).** Protein biosynthesis in the embryo and endosperm during embryogenesis in *Pinus sylvestris* L. 35(2) 69-75.
- Reinbothe C., Tewes A., Lehmann J. Parthier B. and Reinbothe S. (1994).** Induction by methyl jasmonat of embryogenesis-related proteins and mRNA in *Nicotiana; plumbaginifolia*. Plant Science. 104(1): 59-70.
- Roberts D.R., Flinn B.S., Webb D.T., Webster F.B., Sutton B.C.S. (1989).** Characterization of immature embryos of interior spruce by SDS-PAGE and microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis. Plant.Cell. Rep. 8: 285-288.
- Roja Rani A., Reddy D., Prakash Babu P. and Padmaja G. (2005).** Changes in protein profiles associated with somatic embryogenesis in peanut. Biologia Plantarum. 49(3): 347-354.
- Schmidt M.A., Tucker D.M. and Cahoon E.B. (2005).** Towards normalization of soybean somatic embryo maturation. Plant Cell Rep. 24: 383-391.

- Silveira V., Floh E.S., Handro W. and Guerra M.P. (2004).** Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 76(1): 53-60.
- Tan S.K., Kamada H. (2000).** Initial identification of a phosphoprotein that appears to be involved in the induction of somatic embryogenesis in carrot. *Plant Cell Reports*. 19: 739-747.
- Thompson H.J.M. and Knox J.P. (1998).** stage-specific responses of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding B-glucosyl Yarin reagent. *Planta*. 205: 32-38.
- Van Hengel A.J., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., Van Kammen A., and de Vries S.C. (2001).** N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol*. 125: 1880-18X.
- Vroemen C., de Vries S. and Quatrano R. (1999)** Signalling in plants embryos during the establishment of the polar axis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 10(2): 157-164.
- Wilekens H., Langebartels C., Tire C., Montagu M.V. Inze D., Camp W.V. (1994).** Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 10450-10454.

Somatic embryogenesis from stem segment of *Hyoscyamus arachnoideus* Pojark. and qualitative and quantitative evaluation of proteins during different stages of it

Ebrahimzadeh, M¹; Ghorbanli, M²; Ebrahimzadeh, H³.

1. Department of biology, Faculty of Science Islamic, Azad University Branch, Science and Research
2. Department of biology, Faculty of Science Islamic, Azad University Branch, Gorgan
3. Department of biology, Faculty of Science Islamic, Tehran University, Tehran

Abstract

The *Hyoscyamus* genus has been always regarded because of the therapeutic effects and its contained tropan alkaloids. Utilizing genetic engineering methods for production of plants for production of plant belonging to this genus with higher medical values and propagation of this plant in a fast and cost-effective manner is very important. Somatic embryogenesis is a great help in this field. The aim of the current study is to gain knowledge about mechanism of somatic embryogenesis via protein changes' assessment in different stages of embryo formation. In this study stem culture on MS medium containing BAP and IAA lead to embryogenesis.

Quantitative protein evaluation in different stages of embryo development showed changes in protein content. The qualitative evaluation of protein was performed using electrophoresis of two types of polyacryl amide gel in discontinued system (PAGE and SDS-PAGE). Molecular mass of peptide as well as peptide separated bonds were calculated, and it cleared that during embryogenesis different proteins and peptides undergo up-regulation, down-regulation and modulation. In addition, main and fundamental proteins and peptides were known.

Key words: Electrophoresis, Embryogenesis, *Hyoscyamus arachnoideus*, Protein.