

تغییرات پروتئینی گیاه تراریخت توتون *Nicotiana tabacum* L. حامل Ri T-DNA

## در پاسخ به تیمار جبرلین در مقایسه با شاهد

جلیل عباس پور<sup>۱</sup>، علی اکبر احسانپور<sup>۱\*</sup>، فریبا امینی<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

۲- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ehsanpou@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۱۸

## چکیده

**هدف:** تنظیم کنندگان رشد گیاهی می‌توانند تغییراتی در فرآیندهای فیزیولوژیک اعمال نمایند. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر جبریلین ( $GA_3$ ) بر پروتئین های محلول و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ریشه و برگ گیاهان تراریخت حامل Ri T-DNA دارای ساقه کوتاه توتون در مقایسه با شاهد می باشد.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا تراریخت بودن گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) رقم Wisconsin با روش PCR مورد تایید قرار گرفت. سپس گیاهان غیر تراریخت و تراریخت به مدت ۴ هفته درون محیط کشت MS حاوی  $GA_3$  با غلظت های ۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم در لیتر در شرایط درون شیشه کشت داده شدند. پروتئین محلول کل ریشه و برگ گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تحت تیمار  $GA_3$  استخراج و اندازه گیری شد. همچنین الگوی الکتروفورزی پروتئین های ریشه و برگ این گیاهان با روش SDS-PAGE بررسی گردید. **نتایج:** تراریخت بودن گیاهان مورد آزمایش با استفاده از پرایمر ژن آنزیم بتاگلوکورونیداز (GUS) اثبات گردید. بررسی پروتئینی ریشه و برگ گیاهان غیر تراریخت و تراریخت تیمار شده با غلظت‌های مختلف جبریلین نشان داد که تیمار خارجی تاثیر معنی داری در افزایش پروتئین‌های محلول کل ریشه و برگ گیاهان غیر تراریخت و تراریخت دارد. همچنین جبریلین موجب افزایش بیان باندهای پروتئینی در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها گردید.

**نتیجه گیری:** تصور می شود جبریلین خارجی، بیوسنتز پروتئین در ریشه و برگ‌ها را از طریق تاثیر بر فرآیند های نسخه برداری و ترجمه القا می کند. جبریلین همچنین از فعالیت آنزیم های تجزیه کننده پروتئین ممانعت می نماید.

**واژگان کلیدی:** الگوی پروتئینی، توتون، تراریخت، جبریلین

## مقدمه

یکی از پیشرفت‌های اخیر در زمینه کشاورزی افزایش تولید محصولات زراعی با استفاده از تنظیم‌کنندگان رشد است. مطالعات بر روی گیاهان زراعی مختلف نشان داده است که بکارگیری جیبرلیک اسید می‌تواند بهره‌وری را در فرآیندهای فیزیولوژیک حیاتی افزایش دهد. محصول بیشتر و محتوای پروتئینی بیشتر تحت اثر تنظیم‌کنندگان رشد ممکن است باعث فعال‌سازی مکانیسم‌های متعدد مرتبط با رشد گیاه و متابولیسم آن باشد (۱). نتایج بسیاری در مورد نقش جیبرلین و یا ترکیبات بازدارنده سنتز جیبرلین به ترتیب در افزایش و کاهش محتوای پروتئینی گیاهان وجود دارد. تیمار گیاه ذرت با جیبرلیک‌اسید باعث افزایش کمی پروتئین‌ها بویژه پروتئین‌های پرولامین و گولوتلین می‌شود (۲). جیبرلیک اسید در بیشتر غلات باعث ساخته شدن آنزیم‌های هیدرولیز کننده در آندوسپرم دانه‌ها می‌شود (۱). تغییر در پلی‌پپتیدهای میوه نخود با وزن مولکولی بین ۲۰ کیلو دالتون و ۶۰ کیلو دالتون بدنبال تیمار جیبرلین نیز مشاهده شده است (۳).

پروتئین‌های آنزیمی مختلفی با تیمار جیبرلین در گیاهان مختلف افزایش محتوا و فعالیت را نشان داده‌اند. از جمله سنتز پروتئین‌های DNA پلیمراز و RNA پلیمراز تحت اثر ترکیب هورمون‌ها افزایش می‌یابد (۴). به علاوه گزارش‌های متفاوتی در دست است که نشان می‌دهند جیبرلین اثر تحریک یا ممانعت‌کنندگی بر روی فعالیت روبیسکو دارد. جیبرلین سنتز پروتئین روبیسکو را در سطح ترجمه بیش از سطح نسخه‌برداری تحریک می‌کند. فعالیت روبیسکو با مقدار آن مرتبط است. از طرفی فعالیت و مقدار آن به‌طور مستقیم با غلظت جیبرلیک‌اسید ارتباط دارد. بنابراین فعال‌سازی و القای روبیسکو احتمالاً باعث جیبرلیک اسید است زیرا که افزایش فعالیت یک آنزیم بدنبال افزایش سطح mRNA آن حاصل می‌شود (۵). همچنین گیاهانی که با نیتروژن کافی تغذیه شده و با جیبرلیک اسید تیمار شده بودند فعالیت بیشتری در آنزیم‌های کربنیک انهدراز (CA) و نیترات رودکتاز (NR) نشان دادند (۶). افزایش سنتز رنگیزه آنتوسیانین بوسیله جیبرلیک اسید در خلال نمو جام گل در اطلسی با افزایش سنتز و فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیاکاز، کالکون سنتاز، کالکون ایزومراز، فلاوانون ۳-هیدروکسیلاز و UDP-گلوسوز:۳-O-فلاونوئید گلوکوزیل ترانسفراز مرتبط است (۷). همچنین فعالیت تعدادی از آنزیم‌های هیدرولیتیک به دنبال تیمار با جیبرلین افزایش می‌یابد این

آنزیم‌ها شامل آلفا-آمیلاز، پروتاز، بتا-گلوکناز و ایزوزیم‌های مختلف آلفا-آمیلاز هستند (۵). به علاوه جیبرلین باعث افزایش بیان برخی از آنزیم‌های دیواره سلولی می‌شود. طویل‌سازی سلول‌ها توسط جیبرلین از طریق القای آنزیم‌های گزیلوگلوکان اندوترانس گلیکوزیلاز (XET)، گزیلوگلوکان اندوترانس هیدرولاز (XTH)، اکسپانسیون‌ها و پکتین متیل استراز (PME) است که باعث شل شدن دیواره سلولی و توسعه آن می‌شود (۸). جیبرلیک اسید بیان ژن‌های فلاونوئید ایزومراز و تریوز فسفات را در جام گل اطلسی تنظیم می‌کند (۵).

گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گیاهی علفی و یکساله تا چند ساله، به دلیل رشد سریع، خودگشن بودن، تولید بذر فراوان و عدم نیاز به هزینه و تیمارهای خاص برای رشد گیاه مدل خوبی جهت مطالعات زیست‌فناوری و فیزیولوژی گیاهی می‌باشد. همچنین در سال‌های اخیر از این گیاه برای بررسی انتقال و بیان ژن‌ها و مطالعه عوامل موثر در انتقال ژن استفاده شده است (۹). ژن‌های iaah و iaam توسط T-DNA به گیاه تراریخت توتون منتقل شده‌اند. ژن iaam تریپتوفان منواکسیژناز را کد می‌کند که این آنزیم سبب تبدیل تریپتوفان به ایندول استامید می‌شود و ژن iaah کد کننده ایندول استامید هیدرولاز است که ایندول استامید را به ایندول استیک اسید تبدیل می‌نماید. همچنین گزارش شده که پلاسمید Ri در اگروباکتریوم ریزوژنز حامل دو ژن aux1 و aux2 می‌باشد که هر دو مسئول بیوسنتز اکسین در گیاهان تراریخت می‌باشد (۱۰). از آنجا که از یک سو مکانیزم عمل جیبرلیک اسید در گیاهان از طریق بیوسنتز طیف وسیعی از آنزیم‌ها و پروتئین‌های مختلف صورت می‌گیرد (۱۱) و از طرف دیگر عکس‌العمل فیزیولوژیکی گیاه نسبت به جیبرلیک اسید وابسته به سنتز و فعالیت پروتئین‌های مختلف از جمله پروتئین DELLA و طیف وسیعی از فاکتورهای کپی برداری و سنتز پروتئین می‌باشد (۱۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حداقل بخش مهمی از کوتاهی ساقه گیاه توتون مورد استفاده در این تحقیق (۱۳) می‌تواند مربوط به پروتئین‌ها باشد. بنابراین انتظار می‌رود که ارتباط نزدیکی بین الگوی پروتئین‌ها و بکارگیری جیبرلیک اسید وجود داشته باشد. این تحقیق با هدف بررسی اثر جیبرلیک اسید بر پروتئین‌های محلول و الگوی پروتئینی ریشه و برگ گیاه غیر تراریخت و تراریخت توتون حاوی Ri T-DNA جهت درک بهتر نقش پروتئین‌ها در چگونگی عمل جیبرلیک اسید طراحی و انجام گرفت.

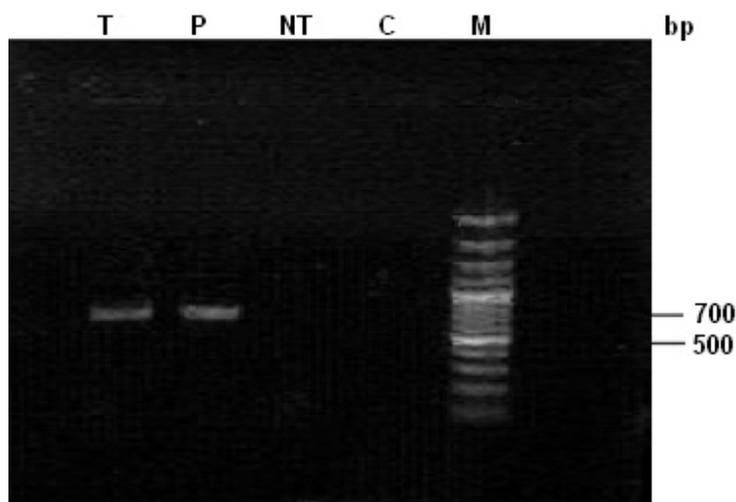
## مواد و روش‌ها

سپس پروتئین‌های محلول برگ و ریشه گیاهان تیمار و شاهد به طور جداگانه استخراج شد (۱۶). اندازه‌گیری پروتئین محلول کل طبق روش برادفورد با اندکی تغییر انجام گرفت (۱۷). الکتروفورز پروتئین‌ها نیز به روش SDS-PAGE با استفاده از ژل اکریلامید ۱۲ درصد انجام گرفت (۱۸) و در نهایت ژل حاصل با روش نیترات نقره رنگ آمیزی گردید (۱۹). کلیه آزمایشات بر اساس طرح کامل تصادفی با حد اقل ۳ تکرار انجام گردید. داده‌های بدست آمده مورد آنالیز واریانس (ANOVA) قرار گرفت و میانگین‌ها بر اساس آزمون Tukey در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم افزار Sigmapstat version 2 مقایسه گردیدند.

## نتایج

باتوجه به اینکه از پرایمر ژن آنزیم بتاگلوکورونیداز (GUS) جهت انجام PCR استفاده گردید باند مربوط به این ژن در 700bp تشکیل شد. لذا این گیاه به عنوان گیاه تراریخت تایید و جهت ادامه آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

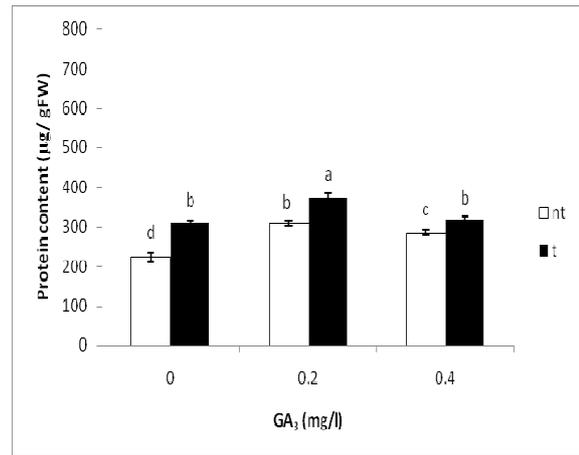
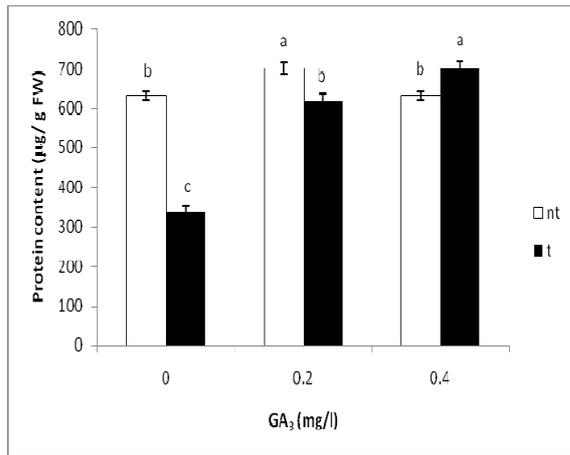
در این تحقیق از گیاهان تراریخت و غیر تراریخت توتون که در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه اصفهان تولید گردیده بودند استفاده گردید. ابتدا جهت اثبات تراریخت بودن گیاهان، استخراج DNA ژنومی از گیاهان تراریخت و غیر تراریخت به روش CTAB با اندکی تغییر انجام گرفت (۱۴). سپس DNA استخراج شده با استفاده از پرایمر ژن آنزیم بتاگلوکورونیداز (GUS)، PCR گردید و محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و باندهای حاصل توسط دستگاه Gel Documentation مشاهده و عکس تهیه گردید. در مرحله بعد، گیاه تراریخت و غیر تراریخت توتون به مدت ۴ هفته در محیط کشت MS (۱۵) حاوی غلظت های ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی گرم در لیتر جیبرلیک اسید و در pH معادل ۵/۸ درون شیشه کشت گردیدند و گیاهان در اطاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور ۹۰ مول بر مترمربع ثانیه رشد داده شد.



شکل ۱: تایید انتقال T-DNA به گیاهان تراریخت (لاین ۴) از طریق آزمایش PCR با پرایمر GUS  
M: مارکر، C: کنترل منفی، NT: گیاه غیرتراریخت، P: پلاسمید، T: گیاه تراریخت

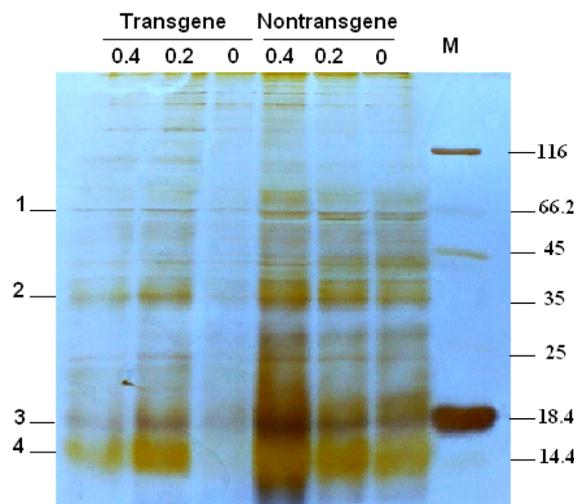
شد. مقایسه دو گیاه بدون تیمار  $GA_3$  نشان داد پروتئین برگ گیاه غیرتراریخت با مقدار معنی دار ۴۶ درصد بیشتر از گیاه تراریخت بود. در غلظت ۰/۲ جیبرلیک اسید نیز گیاه غیرتراریخت ۱۲ درصد پروتئین بیشتری داشت که این مقدار تفاوت معنی دار بود. اما در غلظت ۰/۴ جیبرلیک اسید گیاه تراریخت به میزان معنی داری پروتئین محلول بیشتری نسبت به گیاه غیر تراریخت داشت (شکل ۲ سمت چپ).

اندازه‌گیری پروتئین محلول کل برگ‌ها نشان داد که تیمار  $GA_3$  در گیاه غیر تراریخت در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید در مقایسه با غلظت صفر باعث افزایش ۱۰ درصد پروتئین شده و در غلظت ۰/۴ با کاهش معنی دار ۱۰ درصد، مقدار پروتئین مجدداً به سطحی که گیاه غیر تراریخت فاقد تیمار  $GA_3$  بود رسید. در برگ گیاه تراریخت تیمار  $GA_3$  در غلظت های ۰/۲ و ۰/۴ در قیاس با غلظت صفر به ترتیب موجب افزایش معنی‌دار ۴۵ درصد و ۵۲ درصد پروتئین محلول برگ‌ها



شکل ۲: اثر جیبرلیک اسید ( $GA_3$ ) بر محتوای پروتئین محلول کل برگ (سمت چپ) و ریشه (سمت راست) گیاهان غیرتراریخت (ستون سفید) و تراریخت (ستون سیاه). داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm SD$  و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) بر اساس تست توکی می‌باشد.

میلی‌گرم در لیتر بود در حالی که در گیاه تراریخت در غلظت ۰/۲ نسبت به غلظت ۰/۴ افزایش بیان بیشتری داشت (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳: الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) پروتئین‌های محلول برگ گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تنباکو در غلظت‌های مختلف جیبرلیک اسید ( $GA_3$ ). M: پروتئین مارکر، ۰، ۰/۲ و ۰/۴ غلظت جیبرلیک اسید ۴، ۳، ۲، ۱ میلی‌گرم در لیتر شماره باندهای شاخص تغییر یافته.

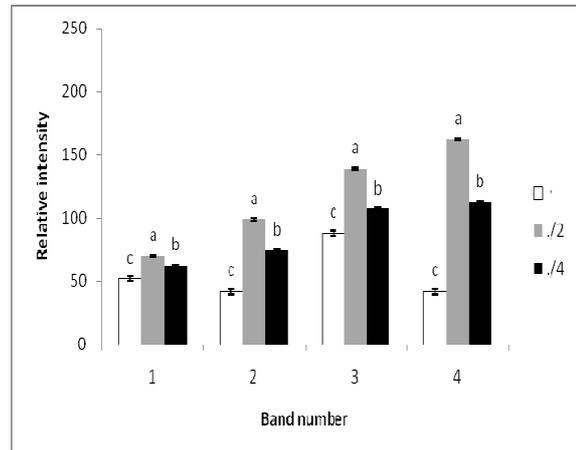
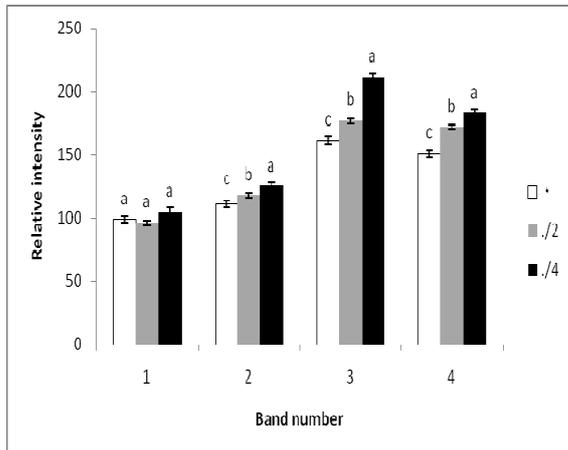
در الگوی پروتئینی ریشه نیز ۴ باند پروتئینی شاخص مشاهده گردید. باند ۱ در ریشه غیر تراریخت بر اثر تیمار ۰/۲ و ۰/۴ افزایش بیان نسبتاً یکسانی را نسبت به تیمار صفر نشان داد اما بیان این باند پروتئینی در ریشه تراریخت در غلظت ۰/۲ افزایش و در غلظت ۰/۴ تغییر معنی‌داری نسبت به غلظت صفر پیدا نکرد. تیمار  $GA_3$  بیان باند پروتئینی ۲ را در گیاه غیر تراریخت تغییر چندانی نداد در حالی که در گیاه تراریخت غلظت ۰/۲

برخلاف برگ، اندازه گیری پروتئین محلول کل ریشه در دو گیاه تراریخت و غیر تراریخت بدون تیمار  $GA_3$  افزایش معنی‌دار ۲۹ درصد پروتئین ریشه‌های تراریخت را نشان داد. در ریشه‌های غیر تراریخت در غلظت ۰/۲ و ۰/۴ نسبت به غلظت صفر به ترتیب افزایش معنی‌دار ۲۸ درصد و ۲۲ درصد در میزان پروتئین محلول کل مشاهده گردید. مقدار پروتئین ریشه گیاه غیرتراریخت در غلظت ۰/۴ جیبرلیک اسید مقدار معنی‌دار ۸ درصد کمتر از غلظت ۰/۲ بود. مقدار پروتئین محلول ریشه‌های تراریخت در غلظت ۰/۲ جیبرلیک اسید افزایش معنی‌دار ۱۷ درصد را در قیاس با غلظت صفر و ۱۵ درصد را در قیاس با غلظت ۰/۴ نشان داد. مقایسه میزان پروتئین محلول ریشه دو گیاه در غلظت ۰/۲ و ۰/۴ به ترتیب افزایش معنی‌دار ۱۸ درصد و ۱۰ درصد پروتئین محلول در ریشه تراریخت را نشان داد (شکل ۲ سمت راست).

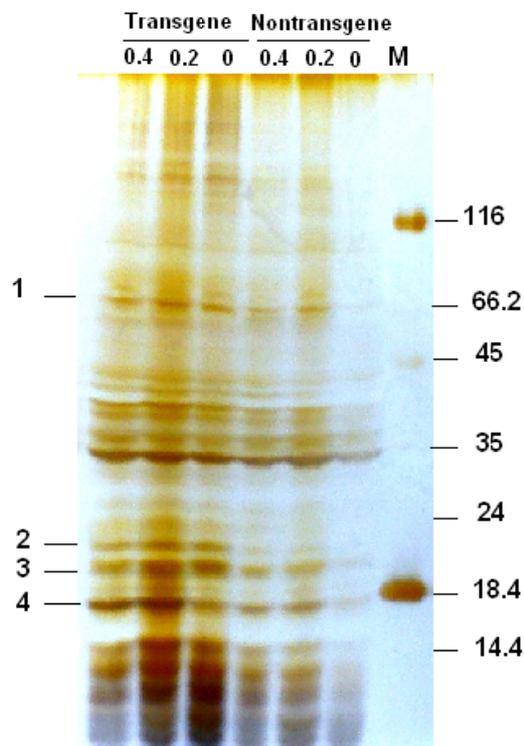
تیمار  $GA_3$  علاوه بر اینکه بر مقدار پروتئین محلول کل اثر گذاشت الگوی الکتروفورز پروتئین‌های برگ و ریشه را نیز در دو گیاه تراریخت و غیر تراریخت تغییر داد. در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ ۴ باند پروتئینی شاخص مشاهده گردید که تیمار  $GA_3$  بیان آن‌ها را به طور معنی‌داری تغییر داده است. باند شماره ۱ در گیاه غیر تراریخت در اثر تیمارهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید تغییر معنی‌داری نیافت اما در گیاه تراریخت تیمار جیبرلیک اسید، بیان این باند پروتئینی را به طور معنی‌داری به ویژه در غلظت ۰/۲ افزایش داد. باندهای ۲، ۳، و ۴ در هر ۲ گیاه بر اثر تیمار  $GA_3$  افزایش بیان نشان داد با این تفاوت که در گیاه غیرتراریخت بیان این باندهای پروتئین در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر  $GA_3$  بیشتر از غلظت ۰/۲

کاهش داد. باند شماره ۴ در ریشه ی غیر تراریخت در هر دو غلظت ۰/۲ و ۰/۴ جیبرلیک اسید افزایش بیان یکسانی را نشان داد در حالی که در گیاه غیر تراریخت اگرچه هر دو غلظت ۰/۲ و ۰/۴ جیبرلیک اسید موجب افزایش بیان این باند پروتئینی گردید اما این افزایش در غلظت ۰/۲ بیشتر بود (شکل ۵ و ۶).

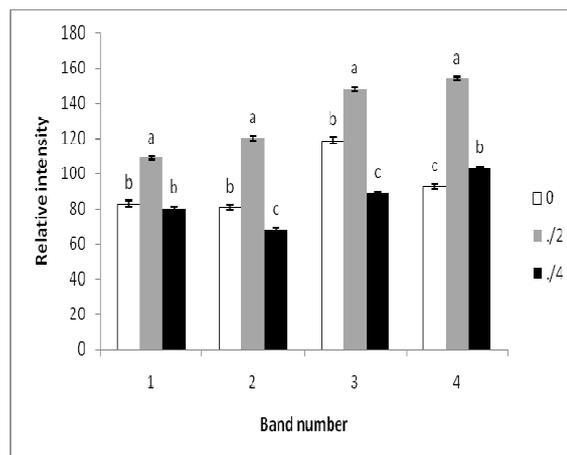
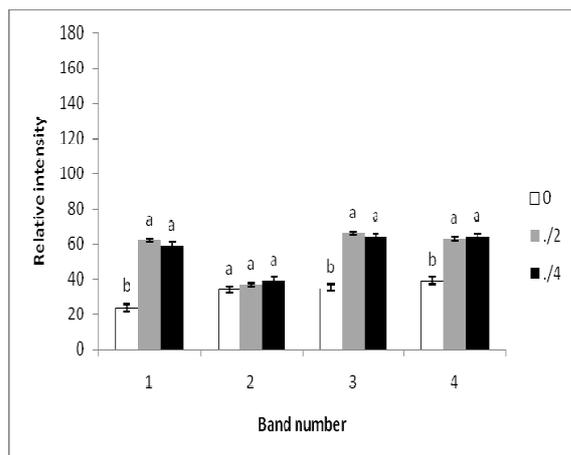
جیبرلیک اسید بیان این باند پروتئینی را افزایش و غلظت ۰/۴ کاهش داد. تیمارهای ۰/۲ و ۰/۴ جیبرلیک اسید بیان باند پروتئینی ۳ را در گیاه غیر تراریخت به میزان نسبتاً یکسانی افزایش دادند. در حالی که در گیاه تراریخت، غلظت ۰/۲ جیبرلیک اسید بیان این باند پروتئینی را افزایش و غلظت ۰/۴



شکل ۴: تراکم نسبی باندهای پروتئینی در غلظت‌های مختلف جیبرلیک اسید در برگ‌های گیاهان غیر تراریخت (سمت چپ) و تراریخت (سمت راست) توتون. داده‌ها میانگین سه تکرار  $\pm$  SD و حروف نا مشابه در هر باند به‌طور مستقل نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.



شکل ۵: الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) پروتئین‌های ریشه گیاهان تراریخت و غیر تراریخت توتون در غلظت‌های مختلف جیبرلیک اسید (*GA3*). پروتئین مارکر، ۰، ۰/۲، و ۰/۴: غلظت جیبرلیک اسید ۱، ۲، ۳، ۴ میلی گرم در لیتر شماره باندهای شاخص تغییر یافته.



شکل ۶: تراکم نسبی باندهای پروتئینی در غلظت‌های مختلف جیبرلیک اسید در ریشه گیاهان غیر تراریخت (سمت چپ) و تراریخت (سمت راست) توتون. داده‌ها میانگین سه تکرار  $\pm SD$  و حروف نامشابه در هر باند به‌طور مستقل نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) بین میانگین‌ها می‌باشد.

پروتئینی بیشتر تحت اثر تنظیم‌کنندگان رشد ممکن است به علت فعال‌سازی راه‌کارهای متعدد مرتبط با رشد گیاه و سوخت و ساز آن باشد (Al-Rumaih, ۱) و همکاران (۲۱) نشان دادند که تیمار گیاه *Vigna unguiculata* L. با جیبرلیک اسید و کادمیم به طور معنی‌داری مقدار پروتئین محلول و باندهای پروتئینی این گیاه را افزایش می‌دهد. آنها افزایش مقدار پروتئین را به افزایش سطح ریبوزوم‌ها بر اثر تیمار جیبرلیک اسید نسبت دادند. تیمار برگ گیاه لگوم *Parkia javanica* با ۱۰ ppm جیبرلیک اسید سبب افزایش پروتئین‌های محلول این گیاه می‌شود. تحریک چندین پروتئین از طریق بکارگیری جیبرلیک اسید ممکن است به نقش مستقیم این هورمون در افزایش سنتز پروتئین در سطح نسخه برداری و ترجمه مربوط باشد (۲۲). Robinson (۲۳) این فرض را تایید کرد که جیبرلیک اسید ممکن است تبدیل ATP به cAMP را از طریق آدنیل‌سیکلاز انجام دهد. آدنیل‌سیکلاز بافت‌های هدف را برای بیرون دادن پاسخ از طریق اثر بر روی افزایش فرآیند نسخه‌برداری القا می‌کند که منجر به تحریک سنتز پروتئین می‌شود. Roa و Khan (۲۴) که بر روی سازوکار عمل جیبرلیک اسید بر روی جنین جو مطالعه می‌کردند و تشکیل پلی‌زوم را بوسیله جیبرلیک اسید و cAMP مشاهده نمودند. آنها نتیجه گرفتند که cAMP حدواسط جیبرلیک اسید برای افزایش تشکیل پلی‌ریبوزوم‌ها است. همچنین افزایش محتوای پروتئین به وسیله تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی ممکن است به علت افزایش تشکیل شبکه آندوپلاسمی خشن که محیط مناسبی را برای افزایش پلی‌ریبوزوم mRNA فراهم می‌کند باشد. همچنین جیبرلیک اسید احتمالاً سطح پروتئین را در اندام هوایی و ریشه از طریق کاهش

## بحث

Ri T-DNA منتقل شده به گیاه توتون که موجب تراریخت شدن گیاه شده است حاوی ژن GUS به عنوان ژن گزارش‌گر متصل به ژن مقاومت به کانامایسین است. بیان این ژن در گیاه باعث تولید آنزیم بتاگلوکورونیداز می‌شود. همانگونه که در شکل ۱ مشخص است انجام PCR با استفاده از پرایمر GUS منجر به ایجاد باند 700bp گردید که تراریخت بودن گیاه و حضور این ژن را در گیاه تراریخت تایید می‌کند. انجام PCR با استفاده از ژن گزارش‌گر GUS جهت اثبات انتقال ژن توسط آگروباکتریوم به گیاه کلم (*Brassica juncea*) نیز مورد استفاده قرار گرفته و نتایج مشابه گزارش شده است (۲۰).

در مطالعه حاضر مشخص شد که جیبرلیک اسید خارجی محتوای پروتئینی ریشه و برگ دو گیاه تنباکو را افزایش داده و بیان و تراکم باندهای پروتئینی را نیز در هر دو گیاه افزوده است. در حالتی که دو گیاه فاقد تیمار بوده‌اند در برگ، گیاه غیر تراریخت و در ریشه، گیاه تراریخت پروتئین بیشتری داشتند. شاید این مطلب نشان دهنده این موضوع باشد که ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بیوسنتزکننده اکسین به‌طور اختصاصی در ریشه گیاهان تراریخت بیان می‌شود. در برگ گیاه تراریخت در غلظت ۰/۴ جیبرلیک اسید میزان پروتئین‌های محلول نسبت به غلظت ۰/۲ بیشتر بوده در حالی که در ریشه و برگ غیر تراریخت و همچنین ریشه تراریخت غلظت بهینه جیبرلیک اسید برای افزایش پروتئین‌های محلول ۰/۲ میلی گرم در لیتر بدست آمد.

تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی از جمله جیبرلین‌ها افزایش محتوای پروتئینی گیاهان را القا می‌کنند. محصول بیشتر و محتوای

2. Stefanov LK, Iliev LK, Popova NT. Influence of GA3 and 4-PU-30 on leaf protein composition photosynthetic activity and growth of maize seedlings. *Biologia Plantarum*. 1998; 41(1): 54-63.
3. Huizen RV, Ozga JA, Reinecke DM. Influence of Auxin and Gibberellin *in Vivo* Protein Synthesis during Early Pea Fruit Growth. *Plant Physiol*. 1996; 112: 53-59.
4. Meershad RL, Raming DW. Effect of media on embryo enlargement, in germination and development in early-ripening genotypes of prunus grown in Vitro. *Plant cell Tiss. and Org. Cult*. 1994; 37: 55-61.
5. Roh KS, Im EJ, Yeo SE, Oh MJ, et al. Exogenous GA3 Increases Rubisco Activation in Soybean Leaves. *J. of Plant Biol*. 2001; 44(1): 53-60.
6. Khan NA. Effect of gibberellic acid on carbonic anhydrase, photosynthesis, growth and yield of mustard. *Biol. plant*. 1996; 38: 145-147.
7. Van weely S, Bleumer A., Spruyt R, Shram AW. Chalcone isomerase in flowers of mutant of *Petunia* hybrid. *Planta*. 1983; 59: 226-239.
8. Stephen GT, Ivo R, Camille MS. Gibberellin metabolism and signaling. *Vitamins and Hormones*. 2005; 72: 289-338.
9. Carl NMD. Rapid flowering *Nicotiana tabacum* L. *Sex Plant Reproduction*. 1999; 12: 123-124.
10. Hashem EA. Estimation of endogenous auxin and cytokinin in hairy roots incited on *Solanum dulcamara* plant by Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Aust. J. of Basic and Applied Sci*. 2009; 3(1): 142-147.
11. Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, et al. The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell*. 2004; 16: 1392-1405.
12. Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, et al. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J*. 2004; 37: 626-634.
13. Zamanzadeh Z, Ehsanpour AA. Assessment of salt tolerance of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Plants expressing AUX gene. *Progress in Biological Sci*. 2011; 1: 17-23.
14. Ehsanpour AA, Twell D. Analysis of SFL1 and SFL2 promoter region in *Arabidopsis thaliana* using gateway cloning system. *J. of Sci*. 2005; 16: 303-309.
15. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 1962; 15: 473-497.

فعالیت آنزیم های درگیر در کاتابولیسم mRNA مانند ریبونوکلئاز افزایش می دهد و منجر به افزایش سنتز پروتئین می شود (۲۱). از طرفی دیگر باید توجه داشت که مقدار پروتئین هایی که در برگ حضور دارند حاصل تعادل بین ساخته شدن و شکسته شدن واحد های پروتئینی است. جیبرلیک اسید فعالیت اندوپیتیدازها و دیگر آنزیم های هیدرولیتیک را برای برخی از پروتئین های برگ کاهش می دهد. در ذرت غلظت پروتئین و کلروفیل به موازات افزایش فعالیت اندوپیتیدازها کاهش می یابد (۲۵ و ۲۶).

تفاوت در باندهای پروتئینی ممکن است به علت تفاوت در ترکیب اسید آمینه های آنها باشد (۲) زیرا که حتی تغییر اندک در ترکیب آمینو اسیدی پلی پپتیدها ممکن است اثر معنی داری بر تراکم باندهای پروتئینی داشته باشد. در مورد باندهای پروتئینی به نظر می رسد در برگ گیاه تراریخت غلظت ۰/۲ میلی گرم جیبرلیک اسید اثر افزایشی بیشتری بر بیان باندهای پروتئینی داشته است حال آنکه در گیاه غیر تراریخت این اثر افزایشی در غلظت ۰/۴ بیشتر است. در ریشه تراریخت نیز غلظت ۰/۲ اثر افزایشی بر روی بیان باندهای پروتئینی داشته اما غلظت ۰/۴ چنین اثری را نداشت. در حالی که در ریشه غیر تراریخت هر دو غلظت جیبرلیک اسید اثر افزایشی تقریباً یکسانی بر بیان باندهای پروتئینی داشت.

### نتیجه گیری

با توجه به توضیحات ذکر شده این چنین می توان نتیجه گرفت که جیبرلیک اسید از طریق مجموعه ای از راه کارهای برشمرده شامل افزایش ریپوزوم ها، افزایش نسخه برداری و ترجمه و کاهش فعالیت آنزیم های هیدرولیز کننده RNA و پروتئین ممکن است محتوای پروتئینی هر دو گیاه تراریخت و غیر تراریخت توتون را افزایش داده و همچنین بیان پروتئین های خاصی را بیشتر کرده است.

### تشکر و قدر دان

نویسندگان مقاله از دانشگاه اصفهان و همچنین قطب تنش های گیاهی به واسطه حمایت از این پژوهش قدردانی می نمایند.

### منابع

1. Bora RK, Sarma, CM. Effect of Gibberellic Acid and Cycocel on Growth, Yield and Protein Content of Pea. *Asian J. of Plant Sci*. 2006; 5(2): 324-330.

16. Amini F, Ehsanpour AA, Hoang QT, Shin JS. Protein pattern changes tomato under *in vitro* salt stress. Russian J. of Plant Physiol.. 2007; 54(4): 464-471.
17. Olson BJSC, Markwell J. Current Protocols in Protein Science Detection and Assay method. 2007; 48: 3.4.1-3.4.29.
18. Hames BD. One dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel electrophoresis of protein. (Eds. Hames, B. D. and Rickwood, D.) 2nd ED. Oxford university press. New York; 1990; pp. 382.
19. Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels, a general overview. Cellular and Molecular Biol.. 1994; 40: 57-75.
20. Paul S, Sikdar SR. Expression of NPTII marker and GUS reporter genes and their inheritance in subsequent generations of transgenic Brassica developed through *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Cult. sci.. 1999; 76: 1569-1573.
21. Al-Rumaih MM, Rushdy SS, Warsy AS. Alteration in the protein Electrophoretic patterns of Cowpea, (*Vigna unguiculata* L.) Treated with Cadmium in the Presence or Absence of Gibberellic Acid. Saudi J. of Biol. Sci. 2002; 9: 47-56.
22. Premabati RK, Srivastava RC. Effect of gibberellic acid on *in Vitro* nitrite reductase activity and soluble protein , tital free amino acids and amides in the leaves of a tree legume, *Parkia javanica*. Acta Botanica India. 1995; 23: 269-272.
23. Robinson GA, Butcher RW, Sutherland EW. Cycle AMP. New York, Academic press; 1971.
24. Roa VS, Khan A. Enhancement of Polyribosome formation by gibberellic acid and 3,5 adenosine monophosphate in barely embroyos. Biochem. and Biophysical Resereach Communications. 1975; 62: 25-30.
25. Feller U, Soong T, Hageman H. Leaf proteolytic activities and senescence during grain development of field grown corn (*Zea mays* L.). Plant Physiol.. 1977; 59: 290-294.
26. Shukry WM, El-Bassiouny HMS. Gibberellic acid effects on protein pattern, hydrolytic enzyme activities and ionic uptake during germination of *Vicia faba* in sea water. Acta Botanica Hungarica. 2002; 44 (1-2): 145-162.

## Protein Changes of Ri T-DNA Carrier Transgenic *Nicotiana tabacum* L. Plant in Response to GA<sub>3</sub> Treatment Comprising with Control

Abbaspour J<sup>1</sup>, Ehsanpour AA<sup>1\*</sup>, Amini F<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran

\* Email corresponding author: ehsanpou@yahoo.com

Received: 10 Oct. 2011

Accepted: 25 Dec. 2011

---

### Abstract

**Aim:** Plant growth regulators are able to change the physiological process. Aim of this study is studies of gibberellin (GA<sub>3</sub>) effects on soluble proteins and root and leaf protein banding profile of short stem Ri T-DNA carrier transgenic *Nicotiana tabacum* L. plant in comprising with control.

**Material and Methods:** First, transformation of tobacco plant cv. Wisconsin was confirmed using PCR technique. Then transgenic and non transgenic plants were treated with 0, .2 .4 mg/l GA<sub>3</sub> in MS media under *in vitro* culture for 4 weeks. Soluble proteins as well as SDS PAGE of root and leaves from transgenic and non transgenic plants treated with GA<sub>3</sub> were investigated.

**Results:** Transformation in transgenic plant was confirmed using GUS primers. Assessment of roots and leaves protein of transgenic and non transgenic treated with different concentrations of GA<sub>3</sub> revealed that exogenous GA<sub>3</sub> had significant impact on increasing of total root protein of root and leaf in both transgenic and non transgenic plants. Also GA<sub>3</sub> increased the number of protein bands in electrophoresis pattern.

**Conclusion:** It is believed that exogenous GA has an impact on root and leaf protein synthesis through transcription and translation processes and also inhibited the activity of protein degradation enzymes.

**Keywords:** Gibberellin, *Nicotiana tabacum*, Protein pattern, Transgene

