تاثیر کودهای فسفره بر بیان پرولین۵–کربوکسیلات ردوکتازدر زعفران

(*Crocua sativus* L.)

زهره افضلی باغ عباس [۱*]، زهره علیزاده [۲]، مجید جامی‌الاحمدی [۳]، محمدعلی بهدانی [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۳- دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

Email: z_afzali@birjand.ac.ir

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثر کودهای فسفره بر بیان ژن پرولین۵- کربوکسیلات ردوکتاز در زعفران، به‌صورت طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند اجرا شد. تیمارهای کودی شامل شاهد، شیمیایی، زیستی و شیمیایی + زیستی بود. توالی ژن پرولین۵- کربوکسیلات ردوکتاز در زعفران شناسایی و سپس بیان رونوشت آن تحت تیمارهای کودی فسفره مورد بررسی قرار گرفت. برای جداسازی این ژن آغازگرهایی اختصاصی از گیاه گندم طراحی و سنتز شد. بیان ژن با استفاده از واکنش RT-PCR بررسی شد. همچنین فسفر قابل جذب خاک و فسفر معدنی گیاه نیز در برگ و کورم زعفران اندازه‌گیری شد. توالی جدا شده توسط این آغازگرها دارای ۲۸۰ جفت باز طول بود. فسفر خاک در سطح ۵ درصد در تیمار شیمیایی+زیستی بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد. در سطح ۱ درصد فسفر معدنی برگ بیشترین مقدار را در تیمار شیمیایی+ زیستی داشت و در کورم تیمارهای کودی تاثیری بر فسفر معدنی نداشتند. بیان ژن پرولین۵- کربوکسیلات ردوکتاز در برگ در تیمار کو زیستی در سطح احتمال ۱ درصد بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد و در کورم تیمارهای کودی بر بیان ژن بی اثر بود.

کلمات کلیدی: بیان ژن، کود فسفات آمونیوم، کود زیستی بارور۲،واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی

۱. مقدمه و هدف

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. متعلق به خانواده زنبق یک گیاه زراعی با ارزش است که اغلب در مناطقی که اقلیم خشک دارند، کشت می شود(۴). این محصول، ادویه ای گران قیمت (۱۰) و از با ارزش ترین گونه های گیاهان زراعی در دنیاست (۱۲).

فسفر یکی از عناصر معدنی کلیدی و ضروری برای رشد و نمو گیاه است. همچنین جزء ساختاری اسیدهای نوکلوئیک و فسفولیپید ها بوده و نقش مهمی در انتقال انرژی، انتقال سیگنالی، فتوسنتز و تنفس ایفا می کند (۱۴). فسفر اغلب به صورت فسفات های معدنی کم محلول و یا نامحلول و یا به صورت فسفر آلی در خاک وجود دارد که به سهولت برای گیاهان قابل استفاده نیست. کمبود غلظت فسفات های قابل جذب خاک های زراعی در کشور باعث شده است که از سال ها پیش تا کنون برای رفع کمبود فسفر مورد نیاز گیاهان، این عنصر را به صورت کودهای شیمیایی فسفر دار به خاک اضافه کنند (۱۳). در چند دهه اخیر مصرف نهاده‌های شیمیایی در اراضی کشاورزی موجب معضلات زیست محیطی زیادی از جمله آلودگی

منابع آب، افت کیفیت محصولات کشاورزی و کاهش میزان حاصلخیزی خاک‌ها گردیده است (۱۶). برای غلبه بر این مشکلات، راهکار بیولوژیکی از استراتژی‌های اساسی است که باید مورد توجه قرار گیرد. در این بین می‌توان به استفاده از کودهای زیستی اشاره کرد.

پرولین به‌عنوان یک اسمولیت سازگار کننده نقش مهمی در تنظیم اسمزی درون سلول، پایدار کردن ساختار پروتئین‌ها و غشاء سلولی، جاروب کردن گونه‌های اکسیژن رادیکال (ROS)، تنظیم pH سلولی و واکنش‌های اکسیداسیون و احیا، ایفا می‌کند (۹،۱۸). در گیاهان پرولین عمدتا از گلوتامات ساخته می شود، که توسط آنزیم پرولین۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) به گلوتامات سمی آلدئید تجزیه شده و خود به خود به پرولین۵-کربوکسیلات (P5C) تبدیل می‌شود. آنزیم پرولین۵- کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR)، P5C را به پرولین تجزیه می‌کند.

در تحقیق حاضر اثر کودهای فسفره بر بیان ژن پرولین۵- کربوکسیلات ردوکتاز، که یکی از آنزیم‌های بیوسنتزی این اسید آمینه می‌باشد مورد بررسی قرار گرفت.

۲. تئوری و پیشینه تحقیق

با توجه به نتایج تحقیق اکبری و همکاران (۲) که بر روی تاثیر کود فسفره و محلول پاشی کلات آهن در میزان جذب عناصر کم‌مصرف، میزان پرولین و کربوهیدارت‌های محلول در گندم نان و تعدادی از گونه‌های اجدادی گندم در شرایط دیم انجام شد، اثر کود فسفره بر میزان پرولین در اندام‌های هوایی گندم بسیار معنی‌دار گردید. همچنین علومی و همکاران در سال ۹۴ در تحقیقی که بر روی تاثیر خاک فسفات بر گیاه آفتابگردان داشتند بیان کردند که غلظت پرولین در ساقه این گیاه تحت تاثیر این نوع فسفر نسبت به ریشه افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (۷).

۳. مواد و روش‌ها

این تحقیق در دو فاز مزرعه ای و آزمایشگاهی در دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند انجام شد. طرح آزمایشی در قالب بلوک کامل تصادفی و تیمارهای کودی شامل: p_1 (شاهد یا عدم مصرف کود فسفره شیمیایی و زیستی)، p_2 (کود شیمیایی فسفات‌آمونیوم به میزان ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار)، p_3 (کود زیستی فسفره بارور۲ به میزان ۱۰۰ گرم در هکتار) و p_4 (ترکیب کود شیمیایی فسفات‌آمونیوم به مقدار ۷۵ کیلوگرم در هکتار و کود زیستی بارور۲ به مقدار ۵۰ گرم در هکتار) بود. کشت در شهریورماه صورت گرفت و نمونه‌برداری اسفندماه در اواخر رشد سبزینه‌ای زعفران انجام و برگ و کورم از هر کرت جمع‌آوری و به‌صورت فریز شده در ازت مایع به آزمایشگاه منتقل گردید.

فاز آزمایشگاهی این تحقیق با آزمایشات خاکشناسی و تجزیه های فیزیکی و شیمیایی آن شروع شد(جدول۱). پس از آن فسفر قابل جذب خاک به روش اولسن برای هر کرت آزمایشی و فسفر غیر آلی (معدنی) کورم و برگ زعفران نیز اندازه گیری شد.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

بافت خاک	سیلت	شن	رس	فسفر قابل جذب (ppm)	کربن آلی (٪)	شوری (ds/m)	اسیدیته (pH)
لوم رسی	40.7	33.3	26	33	0.04	2.85	8.3

طراحی و سنتز آغازگر برای ژن P5CR

از آن‌جایی‌که توالی ژن P5CR در زعفران هنوز شناسایی نشده بود، با استفاده از گیاه گندم اقدام به طراحی آغازگر برای ژن مورد نظر صورت گرفت توالی ژن P5CR گندم با شماره دسترسی به طول جفت‌باز از بانک ژن استخراج گردید و با BLAST آن در پایگاه nr/nt تارنمای NCBI، توالی‌های همولوگ از گیاهان دیگر که دارای قرابت با زعفران بودند، شناسایی و جمع‌آوری گردید. در ابتدا توالی‌های به دست آمده با برنامه MegAlign نرم‌افزار DNASTAR هم‌ردیف شدند. در این هم‌ردیفی مناطق حفاظت‌شده این ژن مشخص گردید. در مناطق حفاظت‌شده با نرم‌افزار Oligo 7 آغازگر مستقیم با توالی 5´- CTG GCT TGA GTG GTA GTG G-3´ و آغازگر برگشتی دارای توالی 5´-TGT GGC AGC AAC AAC GGC A -3´ طراحی و برای سنتز به شرکت دنازیست آسیا ارسال شد.

جداسازی و تعیین توالی ژن P5CR

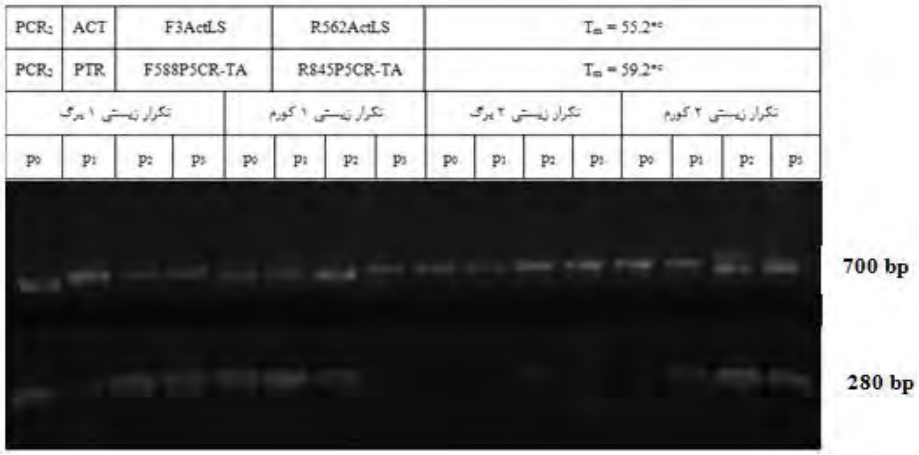
برای جداسازی ژن P5CR از Semi-quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction استفاده شد. بدین منظور با استفاده از آغازگرهای F588P5CR-TA و R845P5CR-TA طراحی شده و cDNA واکنش PCR انجام شد. برنامه واکنش به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، واسرشته شدن الگوها در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۹,۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۵ چرخه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. سپس محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد ران و نوارهای حاصل با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما از روی ژل خالص‌سازی گردید. DNA خالص شده برای تعیین توالی ژن مورد نظر به شرکت دنازیست آسیا ارسال گردید.

برای تایید صحت توالی تکثیر شده می‌توان از روش‌های زیست‌داده‌پردازی استفاده گردید. توالی خوانش شده برای این ژن با توالی ژن P5CR در بسیاری از گونه های گیاهی دیگر مشابه بود و همچنین واجد دمین پروتئینی این ژن نیز بود. از این رو توالی مورد نظر در بانک ژن به عنوان توالی ژن P5CR زعفران ثبت گردید.

بررسی بیان ژن P5CR

به منظور بررسی بیان ژن P5CR از نمونه های جمع‌آوری شده از هر کرت طرح آزمایشی، استخراج RNA به روش دستی با استفاده از CTAB انجام گرفت. سپس با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما ساخت cDNA انجام شد. برای حصول اطمینان از کیفیت cDNA های سنتز شده ابتدا با آغازگرهای F3ActLS و R562ActLS واکنش PCR انجام و نوارهای تشکیل شده بر روی ژل آگارز پس از الکتروفورز در دو نوبت ابتدا با ژن اکتین هم‌رقت شدند. با توجه به واکنش PCR اول و دوم برای ژن اکتین و مقدار ران کردن محصولات آن‌ها بر روی ژل آگارز واکنش اول و دوم PCR برای آغازگرهای P5CR نیز انجام شد(شکل ۲). مقدار cDNA مورد استفاده برای هر نمونه همانند واکنش‌های اکتین بود.

شکل ۱- الف) نتیجه محصول PCR1 برای آغازگرهای اکتین و P5CR پس از هم رقت سازی ران شده بر روی ژل آگارز ۱٪.



شکل ۱- ب) نتیجه محصول PCR2 برای آغازگرهای اکتین و P5CR پس از هم رقت سازی ران شده بر روی ژل آگارز ۱٪.

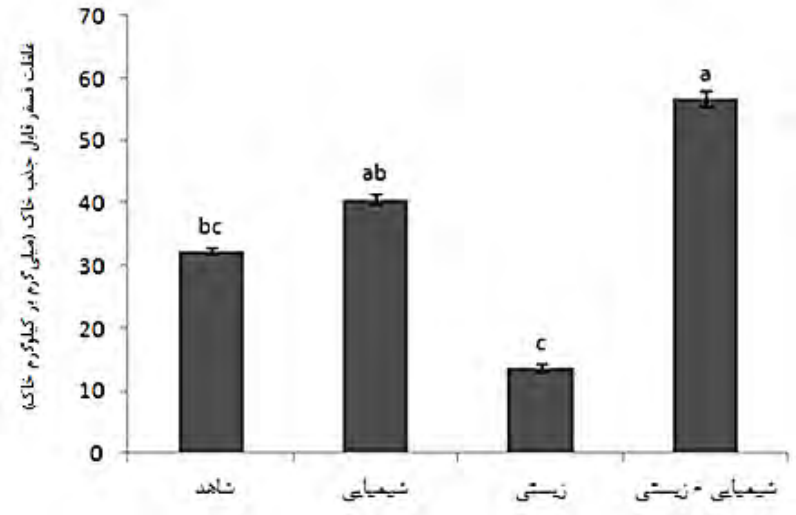
به منظور کمی نمودن نوارهای حاصل از تکثیر رونوشت ژن P5CR از نرم افزار EmageJ استفاده شد. بدین صورت که نوارهای حاصل از هر تیمار ابتدا برای ژن اکتین و سپس ژن P5CR کمی و در نهایت برای به دست آمدن میزان بیان نسبی رونوشت ژن P5CR، اعداد حاصل از این ژن بر اعداد حاصل از ژن اکتین تقسیم شدند.

۴. نتایج و بحث

اندازه گیری فسفر قابل جذب خاک

آنالیز داده‌های حاصل از سنجش فسفر خاک در سطح ۵ درصد معنی‌دار گردید. شکل۲ غلظت فسفر قابل جذب خاک را پس از کاشت زعفران نشان می‌دهد. با توجه به شکل مقدار فسفر قابل جذب در تیمار کودی ۷۵ کیلوگرم کود فسفات آمونیوم و ۵۰ گرم کود زیستی بارور ۲ در هکتار بیشترین مقدار فسفر را به خود اختصاص داده است. باکتری‌های حل‌کننده فسفات موجود در کود بارور ۲ با استفاده از سازوکار ترشح اسیدهای آلی و اسید فسفاتاز باعث تجزیه ترکیبات فسفره نامحلول و در نتیجه قابل جذب شدن آن می‌گردند (۳، ۸). از این رو می‌توان بیان داشت در تیمار تلفیق کود شیمیایی و زیستی، برهم‌کنش اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات و کود فسفات آمونیوم موجب افزایش فسفر قابل جذب در خاک گردیده است. تیمارهای شاهد (عدم مصرف کود فسفره) و کود شیمیایی از لحاظ آماری با هم تفاوت داشته اما این تفاوت چندان زیاد نیست.

قبادی و همکاران (۵) تاثیر کودهای زیستی فسفر بر عملکرد و جذب فسفر در سیب‌زمینی را بررسی کرده و بیان کردند بیشترین میزان فسفر قابل جذب در خاک مربوط به تیمار ترکیبی کود شیمیایی و بیوفسفات طلایی بود، که مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد.



شکل ۲: میزان فسفر قابل جذب خاک برای تیمارهای کود فسفره پس از کاشت.

همچنین احتشامی و همکاران (۱) در تحقیقی که بر روی تاثیر کودهای زیستی فسفاته در ذرت دانه‌ای داشتند، بیشترین میزان فسفر قابل جذب خاک را تیمار تلفیقی کودهای زیستی مخلوط باکتری‌های سودوموناس و میکوریزا معرفی کردند که مخالف نتایج این تحقیق می‌باشد.

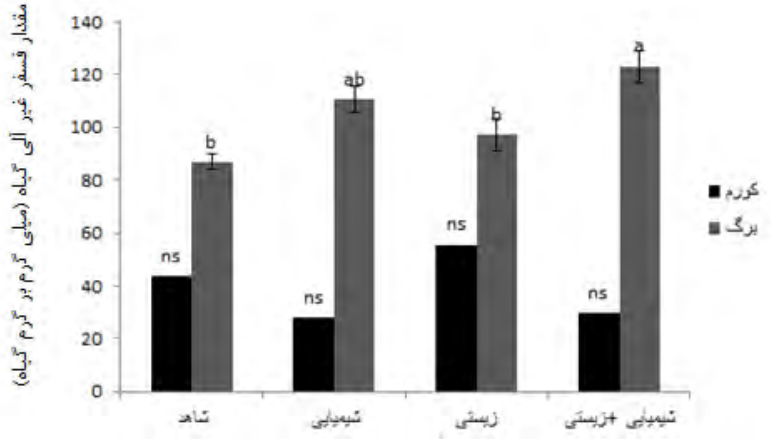
نتایج اندازه گیری فسفر گیاه

آنالیز داده‌های مربوط به سنجش فسفر غیر آلی گیاه در سطح احتمال ۱٪ برای فسفر بافت برگ معنی‌دار و برای فسفر کورم معنی‌دار نشد.

بیشترین مقدار فسفر برگ را تیمار کودی شیمیایی + زیستی به خود اختصاص داده‌است که با توجه به شکل ۳ که فسفر قابل جذب خاک را در ابتدای فصل رشد نشان می‌دهد و در این تیمار بیشترین فسفر قابل جذب را دارد، قابل توجیه است. پس از آن تیمار کود شیمیایی بیشترین مقدار فسفر در برگ را دارا است.

مختاری و بشارتی (۶) گزارش کردند که تلقیح جدایه‌های منسوب به سودوموناس پوتیدا و پانتوآ آگلومرانس همراه با کود شیمیایی در بذر ذرت، تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر مقدار غلظت فسفر در مقایسه با تیمار شاهد داشته است. همچنین بیان داشتند که تلقیح جدایه‌های سودوموناس بدون استفاده از کود شیمیایی از لحاظ آماری تفاوتی با تیمار شاهد نداشته است، که نتایج آن‌ها مطابق نتایج این تحقیق می‌باشد.

در مورد غلظت فسفر در کورم این‌گونه می‌توان برداشت کرد که در انتهای فصل رشد جذب فسفر متوقف شده و به دلیل فعالیت گیاه در قسمت سبزینه‌ای قسمت اعظم مواد در برگ تجمع می‌یابد.

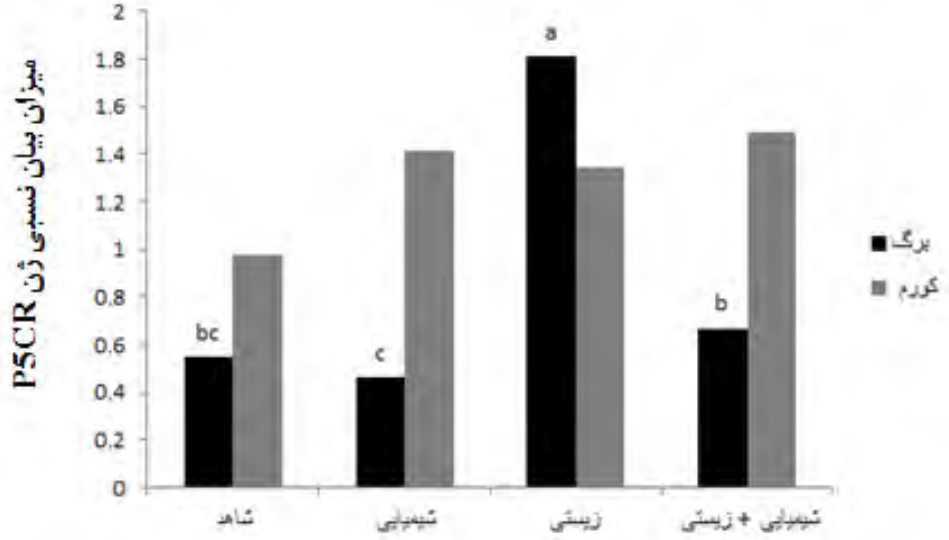


شکل۳- مقدار فسفر غیر آلی بافت گیاه در تیمارهای فسفره.

نتایج بیان ژن P5CR

آنالیز داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن P5CR تحت تیمارهای کود فسفره برای برگ در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار گردید و تیمارهای کودی بر بیان ژن در کورم تاثیر معنی داری نداشتند.

در برگ تیمار کود زیستی بیشترین میزان بیان ژن P5CR را داشته است و سایر تیمارها از لحاظ آماری تفاوت چندانی باهم ندارند. در کورم سطح بیان ژن در تمام تیمارها تقریبا ثابت بوده است که می‌تواند به این دلیل باشد که در انتهای فصل رشد جذب فسفر متوقف شده و ثابت است.



شکل ٤- میزان بیان نسبی ژن P5CR تحت تیمارهای کود فسفره.

۵– پیشنهادات

- استفاده از واکنش Real Time-PCR برای آنالیز بیان ژن به‌جای RT-PCR نیمه کمی
- آنالیز بیان ژن در زمان‌های مختلف دوره رشدی در ریشه و کورم و برگ
- همسانه‌سازی ژن P5CR برای تعیین دقیق توالی

۶- منابع

۱- احتشامی، س.م.ر.، آقا علیخانی، م.، چائی چی، م.ر. و خاوازی، ک. مجله علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۰(۱): ۲۷-۱۵. ۱۳۸۸.

۲- اکبری، م.، زارع، م.ج.، محرابی، ا.ع. و نصراله نژاد، ا.ع. مجله تولید گیاهان زراعی. ۶(۱): ۱۷-۱. ۱۳۹۱.

۳- امیدی، ح.، نقدی بادی، ح.ع.، گلزاد، ع.، ترابی، ح. و فتوکیان، م.ح. فصلنامه گیاهان دارویی. ۸(۲): ۱۰۹-۹۸. ۱۳۸۸.

۴- عبدولاوی، ف. مجموعه مقالات دومین کنفرانس بین المللی زیست شناسی و فناوری زعفران. ایران، مشهد. صفحات ۳۴۵-۳۳۹. ۱۳۸۵.

۵- قبادی، م.، جهانبین، ش.، اولیایی، ح.ر.، مطلبی فرد، ر. و پرویزی، خ. نشریه دانش آب و خاک. ۲۳(۲): ۱۳۸-۱۲۶. ۱۳۹۲.

۶- مختاری، م. و بشارتی، ح. مجله پژوهش های خاک (علوم خاک و آب). ۲۷(۴): ۶۲۸-۶۱۹. ۱۳۹۲.

7-Elloumi, N., Zouari, M., Chaari, L., Ben Abdallah, F., Woodward, S. and Kallel, M. Environ Sci Pollut Res. 2015.

8-Glick BR. *Can. J. Microbiol*. 41: 17-109. 1995.

9-Kavi Kishor, P.B.et al. *Curr. Sci*. 88: 424–438. 2005.

10-Molina R.V., Valero M., Navarro Y., Garcia-luis A., Guardiola J.L. *Scientia Horticulturae*. 103: 79.91. 2004.

11-Muchhal, U.S., Pardo, J.M., and Raghothama, K.G. *Proceeding National Academy of Sciences of USA*. 93: 10519–10523. 1996.

12-Munshi A.M. *Indian Arecant and Spices Journal*. 18: 24-44. 1994.

13-Pant, H.K. and Reddy, K.R. *water research* .37: 965-972. 2003.

14-Plaxton, W.C. and Carswell, M.C. Marcel Dekker, New York, pp 349-372. 1999.

15-Schachtman, D.P., Reid, R.J., Ayling, S.M. Cell. *Plant Physiology Journal*. 116: 447–453. 1998.

16-Sharma, A. K. A handbook of organic farming. Agrobios, India.pp. 627. 2002.

17-Shin, H., Shin, H.S., Dewbre, G.R., Harrison, M.J. *Plant Journal*. 39: 629–642. 2004.

18-Verbruggen, N. and Hermans, C. Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids. 35: 753–759. 2008.