مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

مطالعه تجمع پرولین و بیان ژن P5CS دربرگ‌ها و جوانه‌های گل ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی تحت تنش خشکی

نرگس قره‌قانی پور[۱]، بهروز شیران*[۲]، محمود خدام باشی[۲]، علیرضا مولائی[۳]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه شهرکرد

[۲] دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهرکرد

[۳] پژوهشگر مرکز تحقیقات کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۰۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۱۵

چکیده

یازده ژنوتیپ از دو گروه متفاوت لوبیا (لوبیا چیتی و لوبیا سفید) به منظور آزمون تحمل به تنش خشکی در طی مراحل رشد رویشی و زایشی انتخاب شدند. تنش خشکی در مرحله رشد رویشی با ظهور سومین سه برگچه‌ای و در مرحله زایشی هنگامی که جوانه‌های گل در حال گذر از میوز بودند اعمال شد. سپس محتوی پرولین و بیان ژن Δ-۱- پرولین -۵-کربوکسیل سنتتاز (*P5CS*) آزمون گردید. در همه ژنوتیپ‌ها با وقوع تنش خشکی پرولین تجمع یافت ولی افزایش سطح پرولین در ژنوتیپ‌های مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس بیشتر بود. همچنین محتوی پرولین در جوانه‌های گل لوبیا ۱۰ برابر محتوی پرولین در برگ‌ها در هر دو شرایط کنترل و تنش بدست آمد. بیان ژن کلیدی در متابولیسم پرولین (*P5CS*) در برگ‌ها و جوانه‌های گل تحت تنش خشکی با استفاده از *RT-PCR* نیمه کمی مورد بررسی قرار گرفت. تنش محیطی سبب افزایش بیان معنی‌دار از ژن *P5CS* گردید. این افزایش بیان در ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی قابل توجه‌تر از ژنوتیپ حساس به خشکی بوده و احتمالا باعث افزایش فرآورده نهایی این ژن می‌شود. همبستگی بین سطح پرولین و بیان ژن *P5CS* در برگ‌ها و جوانه‌های گل مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پرولین، تنش خشکی، لوبیای معمولی

* نویسنده مسئول: بهروز شیران تلفن: ۰۹۱۳۱۸۱٤٤۷۳ Email: beshiran45@gmail.com

مقدمه

لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) عضوی از خانواده لگومینوز، محصول دنیای جدید است ولیکن در همه مناطق اقلیمی رشد می‌کند. تولید لوبیا از ۵۲ درجه عرض شمالی تا ۳۲ درجه عرض جنوبی (Van schoonhoven & Voysest, 1991) و از ارتفاع کم در نزدیکی سطح دریا در قاره‌های آمریکا و اروپا تا ارتفاع ۳۰۰۰ متری در آمریکای جنوبی امکان پذیر است (Graham & Ranalli, 1997). لوبیا همچنین یک ماده غذایی مهم در بسیاری از مناطق ایران بوده و سطح زیر کشت آن ۱۱۱۰۰۰ هکتار و در بیش از ۱۲ استان با متوسط عملکرد ۱۹٤۰ کیلوگرم در هکتار کشت می‌شود. یکی از مشکلات فیزیولوژیکی محدود کننده تولید لوبیا در کشورهای توسعه یافته خشکی است. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که فقط ۷ درصد از مناطق رشد لوبیا در شرایط مطلوب از نظر رطوبت قرار دارد (Broughton *et al*., 2003) و تقریباً ٦۰ درصد از مناطق تولید با شرایط خشکی جدی مواجه است (Van schoonhoven & Voysest, 1991). همچنین مشاهدات حاکی از آن است که لوبیا در تمامی مراحل رشد به ویژه در مرحله رشد زایشی به تنش خشکی حساس است. در مرحله گلدهی، تنش خشکی سبب عدم تلقیح و سقط جنین گل‌ها شده و عملکرد و تعداد دانه در غلاف را کاهش می‌دهد (Graham & Ranalli, 1997; Martınez *et al*., 2007). در دهه‌های اخیر شناخت ما از فرآیندهای پاسخ به تنش خشکی در سطح مولکولی تا سطح کلی گیاه در حال افزایش است (Chaves *et al*., 2003; Shinozaki & Shinozaki, 2007). شناسایی ژن‌های درگیر در تحمل به تنش خشکی در لوبیا برای بررسی مکانیزم‌های پاسخ به تنش خشکی ضروری است. ژن *PvLEA-18* که پروتئین LEA (Late Embryogenesis Abundant) را کد می‌کند متعلق به گروه ۳ از این خانواده ژنی است و بیان این ژن در بافت‌های رویشی در پاسخ به کم آبی افزایش می‌یابد (Colmenero-Flores *et al*., 1997). پس از آن، ژن پاسخ به کم آبی *PvNCED* که هورمون ABA را کد می‌کرد شناسایی شد (Qin *et al*., 1999). همچنین Kavar et al (2008) افزایش بیان و کاهش بیان از چندین ژن تحت تنش خشکی را گزارش دادند. بعلاوه در سطح مولکولی، بسیاری از گروه‌های ژنی را شناسایی کردند که پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که این پروتئین‌ها نقش مهمی را در پاسخ به تنش خشکی ایفا می‌کنند که از آنجمله می‌توان به پروتئین‌های انتقال سیگنال و تنظیم بیان ژن و پروتئین‌هایی دخیل در سازگاری به تنش از قبیل HSP و LEA و پرولین اشاره کرد (Shinozaki *et al*., 2003). پرولین یک پروتئین حمایتی بسیار مهم است که نقش مهمی را در سازگاری به تنش‌های محیطی از قبیل شوری و خشکی بازی می‌کند. پرولین سبب افزایش پتانسیل اسمزی سلول‌ها، حمایت از ساختار

سلول و بالاخص غشاء سلولی و سایر پروتئین‌ها در مواجه به تنش‌های اکسیداتیو و کم آبی می‌شود (Delauney & Verma, 1993; Bohnert & Jensen, 1996; Verslues *et al*., 2006). در گیاهان عالی، پرولین از دو مسیر گلوتامیک اسید و ارنتین سنتز می‌شود. این دو مسیر به عنوان مسیرهای اصلی به ویژه در شرایط تنش‌های اسمزی می‌باشد. در مسیر گلوتامیک اسید، پرولین از مسیر گلوتامیک از طریق دو ماده واسط گلوتامیک γ سمی آلدئید و پرولین ۵-کربوکسیلات (P5C) سنتز می‌شود. دو آنزیم پرولین ۵-کربوکسیل سنتتاز (P5CS) در گام اول و پرولین ۵-کربوکسیل ردوکتاز (P5CR) در گام دوم در مسیر سنتز پرولین نقش دارد. ژن کد کننده P5C از گیاهان گوناگون استخراج شده و با نام P5CS ثبت گردیده است (Nanjo *et al*., 1999). همچنین این آنزیم در لوبیا شناسایی شده است که توسط یک ژن هسته‌ای با نام *P5CS* کد می‌شود (Chen *et al*., 2009). علاوه بر این تجمع پرولین با تحمل به تنش خشکی و شوری در گیاهان همبستگی مثبت بالایی دارد (Delauney *et al*., 1993). تعدادی از مطالعات اثبات می‌کند که فوق بیان از ژن‌های دخیل در فرآیند بیوسنتز پرولین سبب افزایش تحمل به خشکی و شوری در گیاهانی مانند تنباکوی تراریخته شد (KaviKishor *et al*.; 1995; Shen *et al*., 1997). در آرابیدوپسیس القاء ژن *P5CS* سبب تجمع پرولین گردید و پیشنهاد شد که P5CS یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز پرولین تحت تنش اسمزی است (Ramanjulu & Bartels, 2002). در مطالعه حاضر، میزان تجمع پرولین و سطح بیان ژن *PvP5CS* در لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش خشکی در برگ‌ها و جوانه‌های گل بررسی و رابطه بیان این ژن و تجمع پرولین آزمون شد.

مواد و روش‌ها

ژرموپلاسم انتخابی لوبیای معمولی، شرایط رشد گیاه و تیمارهای تنش خشکی

در این مطالعه ۱۱ ژنوتیپ از لوبیا (*Phaseolus vulgaris L.*) جهت بررسی تحمل به تنش خشکی در دو مرحله رشد رویشی و زایشی انتخاب گردیدند. نام، عادت رشدی و منشاء این ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ آورده شده است. این ژنوتیپ‌ها از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرکرد و خمین تهیه گردیدند. بذور لوبیا در گلدان‌هایی (۱۰/۵ cm× ۱۳/۵، سه بوته در هر گلدان) که با مخلوطی به نسبت ٤:۲:۱ از خاک :شن: کمپوست پر شده بود کاشته شد. همه گلدان‌ها در شرایط گلخانه با نور طبیعی رشد یافتند و تا قبل از اعمال تنش خشکی، آبیاری گلدان‌ها هر روز انجام گردید. تیمار خشکی در شرایط کنترل شده گلخانه (با ١٦ ساعت روشنایی و دمای ٢٤ درجه سانتی‌گراد، ٨ ساعت تاریکی و دمای ١٥ درجه سانتی‌گراد) به مدت ٤ الی ٥ روز اعمال شد. گیاهان در مرحله رشد رویشی با ظهور سومین سه برگچه‌ای و در مرحله رشد زایشی در جوانه‌های گل در مرحله میکروسپور

جوان در معرض تنش خشکی قرار گرفتند. معیار اعمال تنش، محتوی آب نسبی (RWC) بود که در هر دو شرایط کنترل و تنش (٤ روز پس از اعمال تنش) از برگ‌ها تعیین شد. برای این منظور برگ‌های جمع آوری شده از هر تیمار بلافاصله وزن و اعداد حاصل یاداشت گردید (FW) سپس نمونه‌های جمع آوری شده به مدت ٤ ساعت در آب استریل گذارده شدند تا تمامی بافت برگ به حالت اشباع برسند سپس برگ‌ها از آب خارج و مجدد وزن شدند (TW) و برگ‌ها به مدت ٨ ساعت در آون خلاء در دمای ٨٠°C خشک شد و مجددا توزین گردید(DW) و نهایتاً با توجه به معادله زیر RWC محاسبه گردید (Weatherley, 1950) :

$$RWC = [(FW - DW)(TW - DW) \times 100]$$

میزان آب نسبی برگ‌ها از ژرم پلاسم‌های مختلف در ٤ روز بعد از تیمار تنش بین ٦٤ تا ٦٨ درصد متغییر است نمونه برداری از هر دو جوانه گل و برگ‌ها در میزان آب نسبی ٢±٦٦ درصد انجام شد.

جدول ١- نام، منبع تیپ رشدی ارقام و لاین‌های لوبیای مورد بررسی در این تحقیق.

Table1- Name, source and growth habit of common bean genotypes used in the present study.

ردیف Row	ژنوتیپ genotype	منشاء Source	نوع type	فرم بوته* Growth habit	واکنش به کم آبی Response to drought
1	G-14088	CIAT	چیتی	تیپ III	حساس Sensitive
2	G-01437	CIAT	چیتی	تیپ III	نا معلوم Unknow
3	KS-21189	CIAT	چیتی	تیپ III	نیمه حساس Semie-sensitive
4	KS-21191	CIAT	چیتی	تیپ III	نیمه حساس تا مقاوم Semie-sensitive
5	KS-21486	CIAT	چیتی	تیپ I	متحمل Suffer
6	Tylore	CIAT	چیتی	تیپ II	متحمل Suffer
7	Khomein	Iran	چیتی	تیپ III	حساس Sensitive
8	Daneshkadeh	CIAT	سفید	تیپ III	نیمه حساس تا متحمل Semie-sensitive
9	Kara	CIAT	سفید	تیپ IV	نامعلوم Unknow
10	Goynok 98	CIAT	سفید	تیپ I	نامعلوم Unknow
11	Jules	CIAT	سفید	تیپ III	نیمه حساس تا متحمل Semie-sensitiv

* I=تیپ رشد محدود و ایستاده، II=تیپ رشد نامحدود و نیمه رونده، III=تیپ رشد نامحدود و رونده، IV=رشد نامحدود و بالا رونده (Bayat *et al* 2010)

I= determinate, erect; II= indeterminate, semi-spreading; III= indeterminate , spreading; IV= indeterminate, erect (Bayat *et al* 2010)

برای مطالعه بیان ژن، برگ‌ها (برگچه‌های جوان) و جوانه‌های گل (با اندازه حدود ۲ میلی-متر) به ترتیب در مرحله رشد رویشی وزایشی جمع آوری شدند. به منظور کاهش میزان خطای نمونه برداری ناشی از تاثیر زمان‌های مختلف جمع آوری نمونه‌ها در بعداز ظهر انجام شد. نمونه‌های برداشت شده بلافاصله به نیتروژن مایع منتقل شد و سپس در دمای ۸۰°C ذخیره گردید. رقم G-۱٤۰۸۸ به عنوان ژنوتیپ حساس به تنش خشکی برای مقایسات انتخاب گردید (Bayat *et al*., 2010). دو تکرار بیولوژیک برای مطالعات مولکولی از هر ژنوتیپ و تیمار (نمونه‌ها از برگ‌ها و جوانه‌های گل تحت شرایط تنش و کنترل) در نظر گرفته شد.

استخراج RNA و RT-PCR نیمه کمی

RNA کل از برگ‌ها و جوانه‌های گل با استفاده از لیتیم کلراید بر طبق روش Chang et al (1993) استخراج شد. RNA استخراج شده با آنزیم *DNaseI* (فرمنتاز، #EN052) تیمار شد و عمل خالص سازی توسط لیتیم کلراید (۲ مولار) انجام شد. تعیین کمیت نمونه‌های RNA به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ساخت شرکت اپندورف آلمان انجام شد. کیفیت نمونه‌های RNA از طریق الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل اگارز ۱/۵٪ بافر 1X MOPS تعیین گردید. نمونه‌های دارای چهار باند مجزا به عنوان نمونه‌های با کیفیت مطلوب در نظر گرفته شد و نمونه‌های بدون باند یا دارای اسمیر مجدداً استخراج گردید. و سپس ۰/۵ میلی گرم از RNA کل از برگ‌ها و جوانه‌ها برای سنتز رشته cDNA بکار برده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت Revertaid first strand cDNA synthesis kit ساخت شرکت فرمنتاز (# K 1622) و برطبق دستورالعمل آن شرکت انجام شد. واکنش PCR با استفاده از آنزیم Dream Taq (فرمنتاز، #EP0701) با پرایمرهای اختصاصی ژن *P5CS* انجام گردید. پرایمرهایی استفاده شده برای ژن *P5CS* به صورت زیر می‌باشد پرایمر رفت: 5'-TCATGGCTCTCTACGATACGC-3' و پرایمر برگشت: 5'-ACCAGAAGAATCCTCATACGG-3' (Chen *et al*., 2009). ژن اکتین در لوبیا *ACT-1* (CV53739) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (Kavar *et al*., 2008). فرآورده RT-PCR بروی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید و توسط نرم افزار ImageJ کمی گردید (Image J software; Rasband, 2011). داده‌های بیان ژن برای هر نمونه نسبت به بیان ژن اکتین نسبی شد و میانگین بیان هر ژن با استفاده از دو تکرار بیولوژیک محاسبه گردید. آزمون *t*-test دو طرفه به منظور بررسی اختلاف‌های معنی‌دار بین تیمارها استفاده گردید.

اندازگیری پرولین

نمونه برگ‌ها و جوانه‌های گل (در مرحله رشد رویشی و زایشی در دوره تنش و کنترل) در

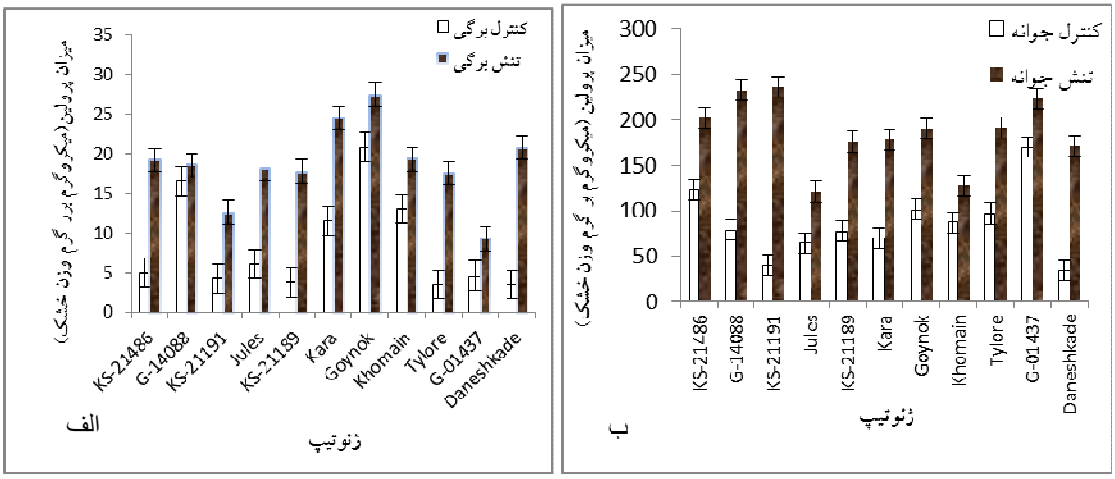
سه تکرار جمع آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید. استخراج و تعیین پرولین بر طبق روش Bates et al (1973) انجام شد. نمونه‌های برگ و جوانه‌های گل با ۳٪ سولفوسالیک اسید استخراج شد. ۲ میلی لیتر از ماده استخراجی، با ۲میلی لیتر ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر گلاشیال استیک اسید اضافه گردید و برای یک ساعت در آب جوش قرار گرفت. پس از خروج از آب جوش، ۲ میلی لیتر تولوئن به محلول اضافه و در یخ و در مکان تاریک گذارده شد. محتوی پرولین توسط اسپکتوفتومتر (Jenway 6320) در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازگیری گردید و بر حسب میکروگرم بر گرم ماده خشک پرولین استاندارد محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار Mini Tab آنالیز و مقایسات میانگین با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام شد.

نتایج و بحث

۱) تاثیر تنش خشکی بر روی تجمع پرولین در ژنوتیپ‌های لوبیا

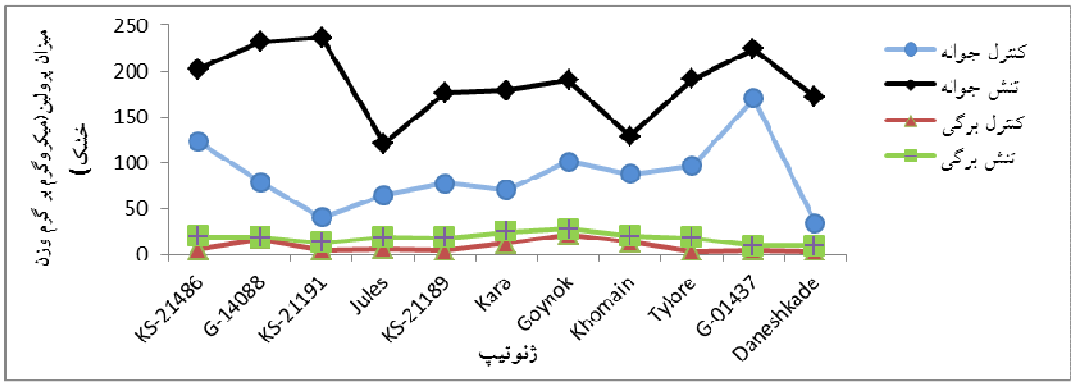
تجمع پرولین در برگ‌ها (در مرحله رشد رویشی) و جوانه‌های گل (در مرحله رشد زایشی) در ۱۱ ژنوتیپ لوبیا در شرایط تنش و کنترل اندازگیری شد. داده‌های حاصل افزایش معنی‌دار در میزان پرولین در شرایط تنش در مقایسه با کنترل نشان دادند. در نمونه‌های برگی از ژنوتیپ دانشکده سطح پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی افزایش ٦ برابری در مقایسه با شرایط کنترل نشان دادند. تجمع پرولین در ژنوتیپ تیلور و Ks- ۲۱۱۸۹ (۵ برابر) در ژنوتیپ Ks- ۲۱٤۸٦ (۳/۸ برابر)، ژنوتیپ Ks- ۲۱۱۹۱ و جولز (۳ برابر) در طی تنش نسبت به شرایط کنترل بود ($P>0.05$). این افزایش در میزان پرولین در همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر آماری معنی‌دار بود (شکل۱ الف). همچنین میزان پرولین در جوانه‌های گل در هر دو شرایط تنش و کنترل استخراج شد. بالاترین میزان پرولین اندازگیری شده (۲۳٦ $\mu gr\ g^{-1}FW$) در رقم Ks- ۲۱۱۹۱ بود. همچنین بیشترین میزان افزایش پرولین در جوانه‌های گل ژنوتیپ‌های تحت تنش در لاین Ks– ۲۱۱۹۱ و دانشکده (به ترتیب با ۵/۷ و ۵ برابر) مشاهده گردید. در دیگر ژنوتیپ‌ها این افزایش در میزان پرولین تحت تنش مشاهده شد و این افزایش برای همه ژنوتیپ‌ها معنی دار بود (شکل ۱ ب). تجمع پرولین در اندام‌های رویشی و زایشی تحت تنش خشکی در بسیاری از گیاهان از جمله برنج (Chen *et al*., 2001, Hur *et al*., 2004)، سیب زمینی (Hmida-Sayari *et al*., 2005)، آفتابگردان (Unyayar *et al*., 2004)، گندم (Tatar *et al*., 2008) و *Vigna aconitifolia* (KaviKishor, 1995) مشاهده شده است. پرولین یکی از مولکول‌های اسموپروتکتین (اسمولیت) است که تجمع آن حتی در باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و گیاهان در پاسخ به تنش خشکی و شوری گزارش شده است (Delauney & Verma, 1993). مطالعات نشان می‌دهند که تجمع پرولین در شرایط تنش،

نقش حمایتی و حفاظتی اساسی از سلول‌ها و بافت‌ها داشته و سبب تحمل و مقاومت به تنش‌های محیطی می‌گردد (Mahajan and Tuteja, 2005; Seki *et al*., 2007). در این پژوهش نیز واریته‌های مقاوم (دانشکده، Tylore Ks-۲۱۱۹۱) تجمع پرولین بیشتری را نسبت به واریته‌های حساس (G-۱٤۰۸۸ و خمین) به تنش خشکی در هر دو مرحله رشدی تحت شرایط تنش نشان دادند. همچنین محتوی پرولین در جوانه‌های گل ۱۰ برابر محتوی پرولین برگ‌ها در هر دو شرایط کنترل و تنش بدست آمد (شکل ۲). در سایر پژوهش‌ها نیز این فزونی میزان پرولین در بخش‌های زایشی نسبت به بخش رویشی مشاهده شده است. به عنوان مثال در بافت‌های زایشی آرابیدوپسیس از قبیل گلچه‌ها، دانه گرده و دانه محتوی پرولین ۲٦ درصد گزارش شده در حالیکه در بافت‌های رویشی فقط ۱تا ۳ درصد بوده است (Mitioly *et al*., 2009). همچنین محتوی پرولین در گل‌های گوجه فرنگی ٦۰ برابر بیشتر از سایر ارگان‌ها بیان شده است (Schwacke *et al*., 1999). در دهه ۸۰ میلادی گروهی از محققان دریافتند که تولید میزان بالای پرولین در اندام‌های زایشی در گیاهان مختلف نسبت به اندام‌های رویشی در شرایط بدون تنش به دلیل نقش این آمینو اسید در توسعه این اندام‌ها است (Mattioli *et al*., 2009).



شکل ۱- محتوی پرولین در برگ‌ها (الف) و جوانه‌های گل(ب) در شرایط تنش و کنترل ژنوتیپ‌های لوبیا.

Figure 1- Proline content in leaves (A) and flower buds (B) after drought exposed and control common bean genotypes.

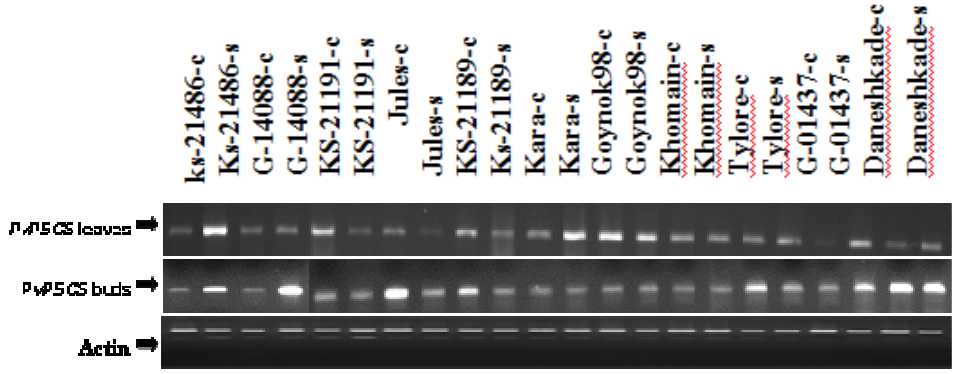


شکل ٢- مقایسه ای از محتوی پرولین در برگ‌ها و جوانه‌های گل تحت شرایط تنش و کنترل.

Figure 2- Comparison of proline content in leaves and flower buds under drought stress and control condition.

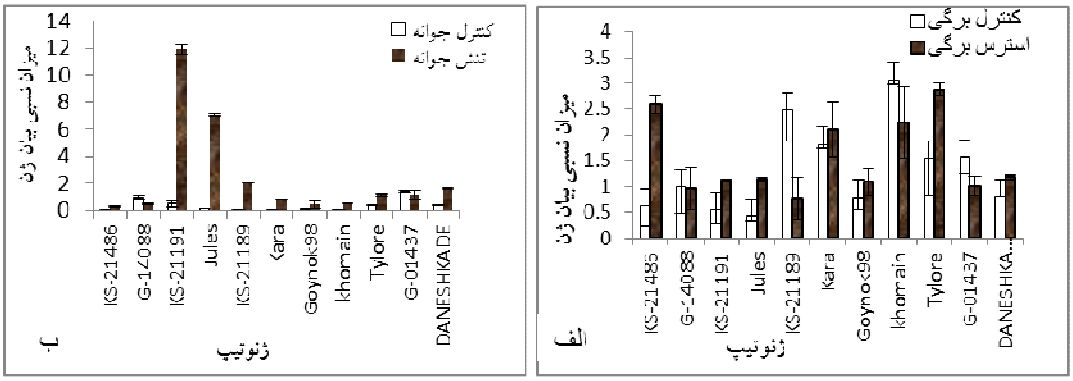
٢) بیان ژن کد کننده پرولین

یکی از ژن‌های کلیدی درگیر در متابولیسم پرولین، ژن *P5CS* که در لوبیا شناسایی شده است (Chen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). *P5CS* برای تحقیق در مورد مکانیزم از تجمع پرولین در لوبیا در سطح رونویسی انتخاب شدند. تجمع رونویسی *P5CS* تحت شرایط تنش خشکی توسط RT-PCR نیمه کمی با استفاده از پرایمرهای اختصاص این ژن مطالعه گردید. قطعه تکثیر شده توسط این پرایمر ٢٠٥bp بود (شکل ٣). سطح رونویسی ژن *P5CS* توسط تنش خشکی در برگ‌ها و جوانه‌های گل افزایش یافت. در برگ‌ها، ژنوتیپ KS- ٢١٤٨٦ (٢/٦ برابر، P=٠/٠٣) و تیلور(٢ برابر، P=٠/٠٥) نسبت به ژنوتیپ حساس G-١٤٠٨٨ از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد. در سایر ژنوتیپ‌ها، هیچ تفاوت آماری معنی‌داری در بیان ژن *P5CS* در شرایط کنترل و تنش مشاهده نشد (شکل ٤-الف). در جوانه‌های گل (در مرحله میکروسپور جوان)، بیان ژن *P5CS* در همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده گردید. بیان ژن *P5CS* در ژنوتیپ‌های Ks-٢١١٩١ (١٢ برابر نسبت به کنترل ژنوتیپ حساس، *P*= ٠/٠٠٠٤)، دانشکده (١/٦ برابر، *P*= ٠/٠٠١) و تیلور (١/٢ برابر، *P*=٠/٠١٦) تحت تنش خشکی افزایش یافت. بیان این ژن تفاوت آماری چشمگیری را در ژنوتیپ‌های خمین، گوینک ٩٨ و G-٠١٤٣٧ نشان نداد. کاهش بیان این ژن در ژنوتیپ‌های Ks- ٢١٤٨٦ (٣/١ برابر، *P*= ٠/٠٣) ، G-١٤٠٨٨ (٢/١ برابر، *P*= ٠/٠١) و Kara (١/١ برابر، *P*= ٠/٠١٢) مشاهده شد (شکل ٤-ب).



شکل۳- آشکارسازی بیان ژن *PvP5CS* در برگ‌ها و جوانه‌های گل و تاثیر تنش خشکی بر بیان ژن *PvP5CS* توسط RT-PCR نیمه کمی (C: کنترل و S: تنش، ۲۹ سیکل PCR).

Figure 3- Detection of *PvP5CS* expressions in leaves and buds of common bean genotypes and the effect of drought on *PvP5CS* expression by semi quantitative RT-PCR (C: Control and S: Stress, 29 PCR cycles.



شکل٤- بیان ژن کدکننده پرولین *PvP5CS* در برگ‌ها (الف) و جوانه‌های گل (ب). میزان بیان نیمه کمی نسبت به لاین حساس G-14088 نسبی شده است. داده‌ها میانگین دو تکرار بیولوژیکی می‌باشد.

Figure 4- Expression of the common bean proline metabolism genes *PvP5CS* in leaves (A) and flower bud (B). The semi-quantitative RT-PCR expression data are relative to the drought-sensitive lines G-14088. The data represent averages of two biological repeats.

افزایش بیان ژن *P5CS* در برگ‌های لوبیا (Chen *et al*., 2009) و در بخش‌های رویشی بسیاری از گیاهان عالی از جمله *Vigna aconitifolia* (Ramanjulu & Bartels, 2002)، آرابیدوپسیس (Seki *et al*., 2002)، برنج زراعی (Hur et.al., 2004) و سیب زمینی (Hmida-Sayari *et al*., 2005) گزارش شده است.

ژن *P5CS* در گیاهان عالی برای اولین بار از *V. aconitifolia* ایزوله شد. ژن *P5CS*، آنزیم Δ-۱-پرولین۵- کربوکسیل سنتتاز را که یک نقش

کلیدی در سنتز پرولین در *V. aconitifolia* دارد را کد می‌کند(Hu *et al*., 1992). بیش بیان ژن *P5CS* از *V. aconitifolia* در تنباکو منجر به افزایش سطح از پرولین و بهبود رشد و تحمل به خشکی شد(KaviKishor et.al., 1995). افزایش بیان این ژن در اندام‌های زایشی گیاهانی مانند برنج و آرابیدوپسیس مشاهده گردید. دو ژن *P5CS1* و *P5CS2*، آنزیم Δ- ۱- پرولین ۵- کربوکسیل سنتتاز را در برنج کد می‌کند که اولی در همه بخش‌های گل از قبیل لودیکول و پوشینه در شرایط تنش بیان می‌شود اما P5CS2 فقط در پرچم‌ها بیان می‌گردد (Hur *et al*., 2004). افزایش بیان از ژن *P5CS* در ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی لوبیا نسبت به ژنوتیپ‌های حساس مشاهده گردید و این افزایش شاید در نهایت منجر به افزایش سطح فرآورده نهایی از این ژن (پرولین) شود. به عنوان یک اسمولیت، پرولین یک نقش مهمی را تعادل اسمزی، نگهداری و حفاظت از ساختار سلول، حذف رادیکال‌های آزاد و تولید انرژی دارد (Szabados & Savoure, 2010). باتوجه به نتایج حاصل می‌توان گفت ژنوتیپ با افزایش بیان بیشتر ژن *P5CS* و تولید و تجمع پرولین قابل توجه در تنش خشکی، مقاومت به خشکی بیشتری را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد.

به عنوان نتیجه گیری کلی و جمع‌بندی نتایج نهایی حاصل از این پژوهش می‌توان اظهار داشت که محتوی پرولین و بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز پرولین در شرایط تنش نسبت به شرایط کنترل تغییرات قابل توجهی را نشان دادند. تنش خشکی سبب القاء بیان ژن *P5CS* و افزایش سطح پرولین در همه ژنوتیپ‌ها گردید. در بسیاری از ژنوتیپ‌ها، بیان ژن *P5CS* همبستگی بالایی با سطح پرولین در برگ‌ها و جوانه‌های گل مشاهده گردید که این افزایش بیان و بالا بودن سطح پرولین سبب مقاومت احتمالی در این ژنوتیپ‌ها می‌گردد.

منابع

Bayat AA, Sepehri A, Ahmadvand G, Dorri HR (2010). Effect of water deficit stress on yield and yield components of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Iran J Crop Sci*ence 12: 42- 54 (in Farsi).

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.

Bohnert HJ, Jensen RG (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. Trends in Biotechnology 14: 89–97.

Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 252: 55–128.

Chang S, Puryear L, Cairney J (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine tree. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.

Chaves MM, Maroco JO, Pereira JS (2003). Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functtional plant biology* 30: 239-264.

Chen TC, Chen Lm, Chi Lin C, Huei Kao C (2001). Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Science* 160: 283-290.

Chen JB, Wang SM, Jing RL, Mao XG (2009). Cloning the *PvP5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under biotic stresses. *Journal of Plant Physiology* 166: 12-19.

Chen J, Zhang X, Jing R, Blair MB, Mao X, Wang S (2010). Cloning and genetic diversity analysis of a new *P5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theory Applied Genetics* 120: 1393–1404.

Colmenero-Flores JM, Campos F, Garciarrubio A, Covarrubias AA (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology* 35: 393-405.

Delauney AS, Verma DPS (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plant. *Plant Journal* 4: 215-223.

Food and Agricultural Organization, (2011). from http://faostat.fao.org.

Graham PH, Ranalli P (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research* 53: 131-146.

Hmida-sayari A, Gargouri-Bouzid R, Bidani A, Jaoua L, Savoure A, Jaoua S (2005). Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Science* 169: 746–752.

Hu CAA, Delauney AJ, Verma DPS (1992). A bifunctional enzyme (1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the Wrsttwosteps in proline biosynthesis in plants. *Proceeding National Academy Science* 89: 9354–9358.

HurJ, Jung KH, Lee CH, An G (2004). Stress- inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science* 167: 417-426.

Kavar T, Maras M, Kidric M, Sustar-Vozic J, Meglic V (2008). Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding* 21: 159–172.

KaviKishor PB, Hong Z, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS (1995). Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases Proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108: 1387–1394.

Mahajan S, Tuteja N (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochemical Biophys* 444: 139-158.

Mart´ınez JP, Silva H, Ledent JF, Pinto M (2007). Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy* 26: 30–38.

Mattioli R, Costantino P, Trovato M (2009). Proline accumulation in plants not only stress. *Plant Signaling & Behavior* 4: 1016-1018.

Nanjo T, Masatomo K, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Kakubari Y, Yamaguchi S, Shinozaki K (1999). Biological function of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 18: 185.

Qin X, Zeevaart JAD (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *PNAS* 96: 15354-15361.

Ramanjulu S, Bartels D (2002). Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell and Environ*ment 25: 141-151.

Rasband WS (2011). Image J. U.S.National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/

Schwacke R. Grallath S. Breitkreuz K.E. Stranaky H. Frommer W.B. and Rentsch D. (1999) LeproT1; a transport for prolin glycin betain and gamma –amin butyric acid in tomato pollen . Plant cell. 11:377-392

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, shinozaki K (2002). Monitoring the expression proles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journa* 31: 279-292.

Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion Plant Biology* 10: 296-302.

Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts, *Plant Physiology* 113: 1177–1183.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Gene network involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58: 221-227.

Shinozaki K, Yamagushi-Shinozaki M, Seki M (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion Plant Biology* 6: 410–417.

Szabados L, Savoure A (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Scencei* 15.

Tatar O, Nuri Gevrek M (2008). Influence of water stress on proline accumulation, lipid peroxidation and water content of wheat. *Asian Journal plant Science* 7: 409-412.

Unyayar S, Keles Y, Unal E (2004). Proline and ABA levels in two sunflower genotype subjected to water stress. *Plant Physiology* 30: 34-47.

Van Schoonhoven A, Voysest O (1991). Common bean. Research for crop improvement.

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu JH, Zhu JK (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal* 45: 523–539.

Weatherley, PE (1950). Studies in the water relations of the cotton plant: I – the field measurement of water deficit in leaves. *New Phytol*ogy 49: 81–97.

Study of Proline accumulation and gene expression of P5CS in leaves and flower buds of common bean cultivars under drought stress

Garaghanipur N.[1], Shiran B.[*1], Khodambashie M.[1], Molaie A.R.[2]

[1]Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sharekord University
[2] Section of Legume, Agriculture and Natural Resources Research Center of Shahrekord, Shahrekord, Iran

Abstract

Eleven common genotypes belonging to two different groups (cranberry bean and lima bean) were submitted to drought stress during vegetative and reproductive stage under controlled glasshouse condition. Drought stress was induced at vegetative stage with the appearance of the third trifoliate and at reproductive stage when flower buds were passing through meiosis. Then proline level and Δ-1-proline -5-carboxylate synthetase (*P5CS)* gene expression were analyzed. In all genotypes free proline accumulated under drought stress, however proline levels increased earlier in drought-tolerant genotypes compared to more susceptible ones and so the content of free proline in bean flower buds was 10-fold higher than leaves under both conditions of drought and control. The expression of key gene in proline metabolism *(P5CS*), was studied in the leaves and flower buds of experimental plants by semi-quantitative RT-PCR under drought stress. This abiotic stress caused significant up-regulation of the expression of *P5CS.* An increase of expression of *P5CS* was observed in drought-resistant genotypes of bean, compared with sensitive ones. This may be resulted from an increase of the level of final product of the gene. Expression of *P5CS* gene correlates with the proline levels found in leaf and flower buds tissue.

Keywords: *Common bean, Drought stress, Gene expression, Proline.*

[*] Corresponding Author: Shiran B. Tel: 03814424428 Email: beshiran45@gmail.com