بررسی اثر قارچ *Rhizophagus irregularis* بر بیان پروتئین انتقال دهنده قند در گیاه گوجه‌فرنگی: تکنیک پروتئومیکس

ستاره امانی‌فر [۱]، ناصرعلی اصغرزاد [۲]، محمود تورچی [۳]، مهدی زارعی [۴]
۱ - استادیارگروه علوم خاک دانشگاه زنجان، ۲-استاد گروه علوم خاک دانشگاه تبریز، ۳- [*] استاد گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه تبریز، ۴- دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه شیراز

چکیده
در این مطالعه از تکنیک پروتئومیک برای مطالعه پروتئین‌های استخراج شده از بافت ریشه‌ای گوجه‌فرنگی میکوریزی شده با قارچ رایزوفاگوس ایرگیولاریس (*Rhizophagus irregularis*) و شناسایی پروتئین‌های درگیر در روابط گیاه-قارچ استفاده شد. گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) با قارچ تلقیح و در بستری از شن استریل کشت شد و گیاهان شاهد غیرمیکوریزی تلقیح نشده باقی ماندند و آزمایش به مدت نه هفته در شرایط اتاقک رشد اجرا شد. در مقایسه پروتئوم ریشه گیاهان میکوریزی شده با قارچ رایزوفاگوس ایرگیولاریس با گیاهان شاهد غیرمیکوریزی بیان نه لکه پروتئینی به طور معنی‌داری از تیمار قارچ متاثر شدند. پروتئین‌های با بیان متفاوت به روش طیف‌سنجی جرمی nano-HPLC ESI-Q-TOF شناسایی شدند. از این میان دو لکه به عنوان پروتئین انتقال دهنده قند و پروتئین ۱۴-۳-۳ protein ۶ شناسایی گردیدکه طی کلونیزاسیون میکوریزی بیان آن‌ها به ترتیب افزایش و کاهش نشان داد.

واژه های کلیدي: الکتروفورز دوبعدی، پروتئومیک، میکوریز آربوسکولار، گوجه فرنگی

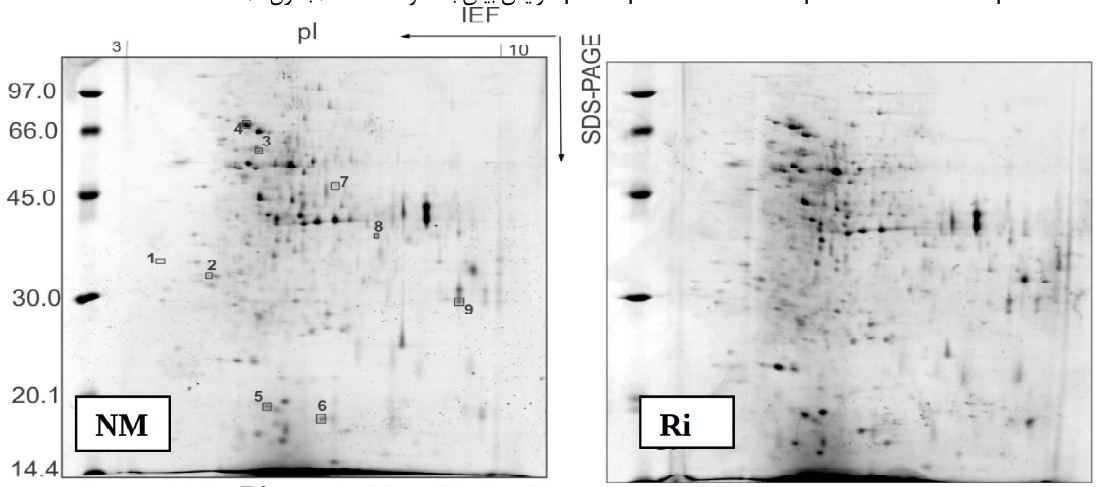
مقدمه
قارچ‌های میکوریز آربوسکولار از شاخه گلومرومایکوتا هستند و جزو موجودات زنده اکوسیستم طبیعی اکثر خاک‌ها محسوب می‌شوند (شوبلر و همکاران ۲۰۰۱). این قارچ‌ها قابلیت ایجاد همزیستی با بیش از ۸۰% گیاهان را دارند و به‌شکل قابل توجهی حجم خاک در دسترس گیاه را افزایش داده و به تغذیه آن‌ها کمک می‌کنند (Gohr and Paszkowski ۲۰۰۶). آشکارسازی عملکرد فاکتورهای متعدد در سطوح پس از ترجمه نیازی اساسی در جهت تکمیل مطالعات فیزیولوژیک همزیستی میکوریزی می‌باشد. علم مطالعه و بررسی پروتئوم (مجموعه پروتئین‌های بیان شده در یک سلول، بافت یا سیستم زیستی معین در یک زمان خاص) پروتئومیک نامیده می‌شود که از طریق سنجش و ارزیابی بیان ژن در سطح پروتئین به توصیف فرآیندهای بیولوژیک می‌پردازد. در نتیجه پیشرفت‌های گسترده در زمینه دستیابی به اطلاعات توالی نوکلئوتیدها و بر اساس پیشرفت‌های حاصله در شناسایی دقیق و حساس پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک طیف‌سنجی جرمی، رهیافت پروتئومیک دورنمای جدیدی را در زمینه آشکارسازی هرچه بیشتر عملکرد پیچیده گیاهان مدل و گونه‌های زراعی ایجاد کرده است. در سال‌های اخیر قارچ‌های میکوریز و برهمکنش آن با گیاهان طی مطالعات پروتئومیک بررسی شده است.
قارچ‌های میکوریز که از گروه بیوتروف‌های اجباری می‌باشند، برای برقراری رابطه همزیستی با گیاه میزبان به سلول‌های اپیدرم و پوست ریشه نفوذ می‌کنند. (Gianinazzi-Pearson ۱۹۹۶; Bonfante and Perotto ۱۹۹۵). تبادل مواد غذایی بین قارچ و گیاه میزبان از طریق غشای پری‌آربوسکولار انجام می‌شود. دلیل این ادعا شناسایی پروتئین‌های ویژه‌ای است که فقط در سلول‌های دارای غشای پری‌آربوسکولار مشاهده شده‌اند. از میان این پروتئین‌ها می‌توان به ناقلین پروتون، فسفات، نیتروژن و قندها اشاره کرد (Couto et al. ۲۰۱۳). مکانیسم‌های شناسایی شده همزیستی میکوریزی عمدتاً مربوط به مکانیسم‌های دفاعی، سیگنالینگ و متابولیسم انرژی هستند. گوجه فرنگی گیاهی ایده‌آل برای مطالعه برهمکنش گیاه-پاتوژن و سایر مطالعات همچون متابولیسم قندها و بیوسنتز کارتنوئیدها می‌باشد (Matsukura et al. ۲۰۰۸). ریشه‌های لطیف، نازک و غیرچوبی گوجه فرنگی که سبب سهولت در استخراج پروتئین‌های آن می‌گردد، اطلاعات نسبتا کامل موجود در داده پایگاه‌ها و قابلیت برقراری همزیستی با قارچ‌های میکوریز دلیل انتخاب این گیاه در تحقیق حاضر بود.

مواد و روش‌ها
به‌منظور جوانه‌زني و تهيه گياهچه‌های تلقيح شده و شاهد، بذور سالم و يكنواخت گوجه‌فرنگي (*Solanum lycopersicum* L.) تهيه شده از منطقه لاله تبريز پس از ضدعفوني سطحي به تعداد كافي در تشتك‌های جداگانه حاوی مايه تلقيح رايزوفاگوس ايرگيولاريس و مايه تلقيح اتوكلاو شده (به ميزان ۵۰% حجمي با پرليت مخلوط شدند) كشت شدند و تا مرحله ۴ برگي به مدت ۳۰ روز در شرايط اتاقك رشد (دماي حدود ۲۸ درجه سلسيوس و رطوبت نسبي ۶۰ درصد) نگهداری شدند. گياهچه‌های تلقيح شده و شاهد به آرامي و با دقت به تعداد يک بوته در هر گلدان به گلدان‌های پلاستيكي حاوی ۵/۱ ليتر شن كوارتز استريل (استريل شده

در دماي ۲۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت) منتقل شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد به مدت ۹ هفته با طول روز ۱۶ ساعت، % ۶۰ رطوبت نسبی، دمای ۲۸ ± ۲ C در روز و ۲۰ ± ۲ C در شب نگهداری شدند. در این مدت گیاهان با محلول Long-Ashton حاوی ۳۲ میکرومولار فسفر (Hewitt ۱۹۶۶)، آبیاری شدند. پس از برداشت و شستن ریشه‌ها حدود ۲/۰ گرم از ریشه‌های ظریف و ریز با استفاده از محلول رنگي متیل بلو در لاکتیک اسید رنگ‌آمیزي شدند و پس از رنگبری جهت تعیین درصد کلونیزاسیون ۳۰ قطعه از ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده به طول یک سانتی‌متر روی لام قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ درصد حضور اندام‌های قارچی در طول ریشه برآورد و با استفاده از نرم افزار MYCOCALC درصد F ، A% ، M% محاسبه شد (Trouvelot et al. ۱۹۸۶). استخراج پروتئین از ریشه گوجه‌فرنگی با محلول استون حاوی ۱۰% تری کلرواستیک اسید (TCA) و ۰۷/۰ % DTT انجام گرفت (Damerval et al. ۱۹۸۶). آزمایشات الکتروفورز دوبعدی در چهار تکرار انجام شد. جهت بارگذاری غلظت یکسان پروتئین (۲۵۰ میکروگرم به ازای هر ژل در هر بار الکتروفورز)، غلظت پروتئین با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (Bradford ۱۹۷۶) و حجم لازم از پروتئین استخراج شده جهت ایجاد غلظت‌های برابر در تمام ژل‌های بعد اول الکتروفورز که به روش ژل IPG اجرا شد، استفاده گردید. بعد اول با استفاده از ژل‌های نواری ۱۳ سانتیمتری آماده IPG با pH= ۱۱-۳ صورت پذیرفت. الکتروفورز بعد اول با دستگاه Multiphor Electrophoresis System, Amersham با توانایی انجام الکتروفورز همزمان ۶ انجام شد. الکتروفورز بعد دوم با استفاده از ژل های ۱۲% تهیه شده در محفظه مخصوص تهیه این نوع ژل انجام شد و ژل‌ها با ابعاد ۲۴×۲۰× ۲/۰ سانتی‌متر تهیه شدند. برای پرکردن محفظه دستگاه بعد دوم از بافر رانش SDS-PAGE استفاده شد و سپس شیشه‌های حاوی ژل بعد دوم بر روی دستگاه سوار شدند. نشانگر رنگی آبی برموفنول برای اطلاع از رسیدن اولین لکه پروتئینی به انتهای ژل استفاده گردید و از جریان ثابت ۳۵ میلی آمپر به ازای هر ژل جهت اجرای آزمایش استفاده شد. با رسیدن خط نشانگر به انتهای ژل، رانش به پایان رسید که ۸ ساعت طول کشید. رنگ آمیزی ژل‌ها با استفاده از آبی کوماسی انجام شد و سپس محلول رنگبر روی ژل‌ها اضافه گردید و رنگ‌بری به مدت یک شب انجام شد. جهت آنالیز کمی ژل‌های دوبعدی تصویربرداری ژل‌ها با اسکنر Bio Rad GS-۸۰۰ انجام شد و آنالیزکمی لکه‌های پروتئینی با نرم افزار PD Quest® انجام شد. مقایسات بین تیمارها (شاهد غیرمیکوریزی و گیاهان میکوریزی) بر اساس آزمون t استیودنت و در سطح احتمال ۵% انجام شد. بر این اساس لکه‌های با تغییرات معنی‌دار مشخص شدند و پس از جداسازی از ژل و رنگ زدایی توسط بافر هضم حاوی آنزیم ترپیسین هضم شدند (Hellman et al.۱۹۹۵). پس از تکمیل مراحل هضم آنزیمی و استخراج پپتیدها آزمایشات nano-HPLC-MS/MS با nano-HPLC ESI-Q-TOF انجام شد. جستجوی پروتئین هدف در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی با استفاده از موتور جستجوگر مسکات انجام شد. از میان یافته‌های مسکات پروتئین‌های هدف براساس شباهت معنی‌دار (در سطح ۵%) انتخاب شدند.

نتایج و بحث

در گیاهان شاهد غیرمیکوریزی هیچ کلونیزاسیونی مشاهده نشد در حالیکه میانگین شدت کلونیزاسیون (M%)، فراوانی کلونیزاسیون (F%) و میزان آربوسکول برای گیاهان تلقیح شده با قارچ رایزوفاگوس ایرگیولاریس به ترتیب برابر با ۴۳/۲۰، ۶۵/۸۰ و ۳۴/۵ درصد بود. در مقایسه پروتئوم ریشه گیاهان میکوریزی با قارچ رایزوفاگوس ایرگیولاریس (Ri) و گیاهان غیرمیکوریزی (NM) نه لکه پروتئینی بیان متفاوت معنی‌داری ($p<0.05$) را نشان دادند (شکل ۱). از میان آن‌ها سه لکه افزایش بیان و شش لکه کاهش بیان به‌همراه داشتند. از این میان هفت لکه توسط دستگاه nano-HPLC ESI-Q-TOF شناسایی شدند. از میان آن‌ها لکه شماره ۲ مطابق با پروتئین ۳-۳-۱۴ protein ۶ کاهش بیان و لکه شماره ۵ مطابق با پروتئین ABC-type sugar transporter periplasmic component-like protein افزایش بیان به‌همراه داشتند (جدول ۱).



شکل ۱- الگوی پروتئوم ریشه گیاهان میکوریزی شده با قارچ *رایزوفاگوس ایرگیولاریس* (Ri) و گیاهان غیرمیکوریزی (NM).

جدول ۱- پروتئین‌های با بیان متفاوت ($p < ۰.۰۵$) در مقایسه پروتئوم گیاهان میکوریزی شده با قارچ *رایزوفاگوس ایرگیولاریس* و گیاهان غیرمیکوریزی

شماره لکه	نام پروتئین	گونه گیاهی مرجع	شماره دسترسی[d]	MW-pI[a] تئوری	MW-pI آزمایشی	فاکتور القا[b]
۲	protein ۶ ۱۴-۳-۳	*Solanum lycopersicum*	gi|۴۶۰۴۱۱۷۰۳	۷/۴-۹/۲۶	۹۹/۴-۲۹/۳۲	-۱/۲[c]
۵	ABC-type sugar transporter periplasmic component-like protein	*Solanum tuberosum*	gi|۴۹۸۳۸۲۰۱۳	۸/۵-۵/۴۰	۹۶/۵-۹۵/۱۸	+۶/۲

[a] MW و pI عبارتند از وزن مولکولی و pH نقطه ایزوالکتریک.

[b] فاکتور القا حاصل تقسیم شدت نسبی لکه مورد نظر در گیاهان میکوریزی به شدت نسبی همان لکه در گیاهان بدون همزیست می‌باشد.

[c] علامت + بیانگر افزایش بیان و علامت – بیانگر کاهش بیان می‌باشد.

[d] شماره دسترسی مربوط به داده پایگاه NCBI می‌باشد.

transporter ABC-type sugar در پری‌پلاسم جای دارد و تجمع آن در گره‌های یونجه همزیست با سینوریزوبیوم ملیلوتی توسط جوردجویک (۲۰۰۴) گزارش شده است. این نوع ناقل در انتقال اسید آمینه‌ها و یون‌های معدنی مثل آهن و فسفر نیز نقش ایفا می‌کند (Djordjevic ۲۰۰۴) و می‌تواند بیانگر نقل و انتقال عناصر غذایی بین قارچ و گیاه میزبان باشد. جولیکور و همکاران (۲۰۰۲) اظهار داشتند که منابع فسفر و قند محلول داخل سلول‌های گیاه کنترل کننده همزیستی میکوریزی است. به عقیده آن‌ها سلول‌های ریشه همانند قارچ به مقادیری از قند و فسفر سیتوزولی نیاز دارند و در اینجا قارچ برای جذب قند وارد رقابت با سلول‌های گیاه می‌شود. پس می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که افزایش بیان پروتئین انتقال دهنده قند در جهت تامین نیاز قارچ به ترکیبات قندی می‌باشد. پروتئین ۱۴-۳-۳ با اتصال به انتهای کربنی H^+-ATPase و فعال‌سازی آن در سلول‌های گیاهی نقش مهمی در استقرار pH و شیب پتانسیل الکتریکی دارد. پروتئین ۱۴-۳-۳ نقش مهمی در ترارسانی علامت به ویژه در متابولیسم کربن و نیتروژن دارد (Diaz et al. ۲۰۱۱). مطالعه دیاز و همکاران (۲۰۱۱) نشان می‌دهد که این پروتئین به شکل قابل توجهی در فرآیندهای متابولیک شامل TCA و مسیر شیکیمیک اسید نقش ایفا می‌کند. محصول نهایی مسیر شیکیمیک اسید، کوریسمات است که علاوه بر ایفای نقش سیگنالینگ در متابولیسم اولیه و ثانویه (Weaver and Herrmann ۱۹۹۷)، وارد بیوسنتز اسیدهای آمینه حلقوی شامل فنیل آلانین، تریوزین و تریپتوفان می‌شود. از طرف دیگر لازمه متابولیسم فنیل پروپانوئیدها بیوسنتز این سه اسید آمینه آروماتیک است. در نتیجه مسیر شیکیمیک اسید یک واسطه کلیدی برای آغاز متابولیسم فنیل پروپانوئیدها و اسید آمینه‌های آروماتیک محسوب می‌شود. ایزوفلاوونوئیدها و فلاوونوئیدها که مشتقات فنیل پروپانوئیدها هستند، نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی گیاه دارند.

منابع

Bradford, M. M. ۱۹۷۶. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, ۷۲(۱), ۲۴۸-۲۵۴.

Bonfante, P. and Perotto, S. ۱۹۹۵. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytologist, ۱۳۰: ۳-۲۱.

Couto, M.S.R., Lovato, P.E., Wipf, D. and Dumas-Gaudot, E. ۲۰۱۳. Proteomic studies of arbuscular mycorrhizal associations. Advances in Biological Chemistry, ۳: ۴۸-۵۸.

Damerval, C., Vienne, D.D., Zivy, M. and Thiellement, H. ۱۹۸۶. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis, ۷: ۵۲-۵۴.

Diaz, C., Kusano, M., Sulpice, R., Araki, M., Redestig, H., Saito, K., Stitt, M. and Shin, R. ۲۰۱۱. Determining novel functions of *Arabidopsis* ۱۴-۳-۳ proteins in central metabolic processes. BMC Systems Biology, ۵:۱۹۲.

Djordjevic, M. A. ۲۰۰۴. Sinorhizobium meliloti metabolism in the root nodule: A proteomic perspective. Proteomics, ۴: ۱۸۵۹-۱۸۷۲.

Gianinazzi-Pearson, V. ۱۹۹۶. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis. Plant Cell, ۸: ۱۸۷۱-۱۸۸۳.

Gohr, V. and Paszkowski, U. ۲۰۰۶. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. Planta: ۲۲۳: ۱۱۱۵-۱۱۲۲.

Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, J. and Heldin, C. H. ۱۹۹۵. Improvement of an" In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. Analytical biochemistry, ۲۲۴(۱), ۴۵۱-۴۵۵.

Hewitt, E.J. ۱۹۶۶. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Community, No. ۲۲. Common Wealth Bureau, London.

Jolicoeur, M., Bouchard-Marchand, E., Bé card, G. and Perrier M. ۲۰۰۲. Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. Ecological Modelling, ۱۵۸(۱-۲): ۱۲۱-۱۴۲.

Matsukura,C., Aoki, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Asamizu, E., Saito, T., Shibata, D. and Ezura, H. ۲۰۰۸. Comprehensive resources for tomato functional genomics based on the miniature model tomato Micro-Tom. Current Genomics, ۹: ۴۳۶-۴۴۳.

Schubler, A., Schwarzott, D. and Walker, C. ۲۰۰۱. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycological Research, ۱۰۵(۱۲) : ۱۴۱۳-۱۴۲۱.

Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. ۱۹۸۶. Mesure du taux de mycorhization VA d'un syste me radiculaire. Recherche de mé thodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In 'Mycorrhizae: physiology and genetics'. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds.). INRA, Paris. ۲۱۷-۲۲۱.

Weaver, L. M. and Herrmann, K.M. ۱۹۹۷. Dynamics of the shikimate pathway in plants. Trends Plant Science, ۲:۳۴۶-۳۵۱.

Abstract

In the present study, proteomics was used to investigate the root-extracted proteins from tomato colonized with Rhizophagus irregularis, to identify proteins which could contribute to the plant-fungi interaction. Tomato (Solanum lycopersicum L.) plants were inoculated with Rhizophagus irregularis and control plants were left un-inoculated as non-mycorrhizal controls and plants were kept in a growth chamber for nine weeks. Mycorrhization significantly changed the expression of ۹ protein spots in inoculated plants in comparison to non-mycorrhizal plants. Differently expressed protein spots were identified by nano-HPLC ESI-Q-TOF mass spectrometry. Among them ۲ spots identified as ABC-type sugar transporter periplasmic component-like protein and ۱۴-۳-۳ protein ۶. Mycorrhization induced up-accumulation and down-accumulation of them consequently.

Key words: two-dimensional electrophoresis, proteomic, arbuscular mycorrhiza, tomato