"ردیابی مولکولی تجلّی ژنها تحت شرایط سرما در *Agropyron deserturum* و *A. elongatum*"

سید رضا طبایی عقدایی[۱]

چکیده:

متوسط تجلّی ژنها در واکنش به سرما (دماهای پایین غیر یخ زا) در *Agropyron deserturum* و *A. elongatum* مورد بررسی قرار گرفتند. از گیاهان روییده تحت دماهای ۲۰°C در روز و ۱۵°C هنگام شب (شاهد) و ۶°C/۲°C (شب / روز)، RNA کل استخراج گردید. انواع مختلف RNA به کمک الکتروفورز از یکدیگر تفکیک و با انجام هیبریداسیون RNA تجمع mRNA های مربوط به ژنهای خانواده‌های nsLTPs و Dehydrins، القاء شونده در شرایط نامساعد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

سنجش زنده مانی گیاهان شاهد، و سرما دیده ارزیابی شد. میزان mRNA ژنهای مورد آزمایش در گیاهان قرار گرفته در دمای ۶°C/۲°C افزایش یافت که نشاندهنده افزایش تجلّی ژن در واکنش به تنش سرما می باشد. تحمل به یخ زدگی نیز در گیاهان روییده در دمای کم افزایش یافت. میزان سرما سختی با قرار دادن گونه‌ها در دماهای مختلف انجماد و بر اساس درصد زنده مانی گیاهان شاهد و سرما دیده مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان برای زنده مانی پس از انجماد و تجلی ژنها در پاسخ به درجه حرارتهای پایین در *A. desertorum* بیشتر از گونه *A. elongatum* بود. نتایج ارزیابیها همچنین نشان دادند که رابطه ای مستقیم بین میزان تحمل یخ زدگی و تجلی ژنهای مورد بررسی وجود

۱- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع بخش تحقیقات ژنتیک و فیزیولوژی

دارد. این پدیده دستاورد با ارزشی در روشن شدن نقش ژنهادر تحمّل گیاه در مقابل یخ زدگی محسوب می شود.

واژه‌های کلیدی: سرما سختی، تجلّی ژن، دمای پایین غیر یخ زا، ژنهای القاء شونده در شرایط نامساعد، تجمع mRNA، زنده مانی، هیبریداسیون نورذرن

مقدمه:

تجلّی ژنها و تغییرات آن در واکنش به شرایط مختلف محیطی بسیاری از مطالعات ژنتیکی اصلاحی را به خود اختصاص داده است. بسیاری از واکنشهای گیاه در برابر تنش های محیطی نظیر سرما، خشکی و شوری توسط گروهی از ژنها کنترل می شوند. فعالیت و نقش این ژنها مختلف بوده و تعدادی از آنها در مرحله رونویسی[۱] و سنتز RNA فعال می باشند و به تجمع پروتئینهایی در بافتهای گیاهان تحت شرایط تنش منجر می گردند (Skriver و Mundy ۱۹۹۰؛ Chandler و Robertson، ۱۹۹۴) ژنهای گروه Dehydrins در گیاهان قرار گرفته تحت تنش‌های خشکی‌زا[۲] بیان می شوند، و بیان این ژنها در واکنش به خشکی در گیاهچه‌های گندمیان[۳] (Close و همکاران، ۱۹۸۹؛ Tabaei-Aghdaei و همکاران، ۲۰۰۰) در برابر سرما در اسفناج (Neven و همکاران، ۱۹۹۳)، در غلات (Houde و همکاران، ۱۹۹۲؛ Van Zee و همکاران ۱۹۹۵؛ طبایی عقدایی، زیر چاپ) یا در شرایط شوری در برنج (Mundy و Chau، ۱۹۹۸؛ Moons و همکاران، ۱۹۹۵)، گزارش شده است. گروه دیگری از ژنها موسوم به nsLTPs[۴] نیز به شرایط نامساعد واکنش نشان می‌دهند. از بیان این ژنها در واکنش به خشکی (Molina و Garcia-Olmedo، ۱۹۹۳؛ Tabaei - Aghdaei و

1- Transcription level

2- Dehydrative stresses

3- Poaceae

4- Non - Specific lipid transfer proteins

همکاران، ۲۰۰۰)، در برابر سرما (Harrison و همکاران، ۱۹۹۵؛ Pearce و همکاران، ۱۹۹۶ و ۱۹۹۸؛ Pearse، ۱۹۹۹; Tabaei- Aghdaei و همکاران ، ۲۰۰۰؛ طبایی عقدایی، ۱۳۷۸؛ طبایی عقدایی، زیر چاپ؛ طبایی عقدایی و پیرس، زیر چاپ) و در برابر شوری (Torres-Schumann و همکاران، ۱۹۹۲؛ Tabaei-Aghdaei و همکاران، ۲۰۰۰) گزارش شده است. به منظور مطالعه بیان ژن در سطح رونویسی، به mRNA سنتز شده در شرایط مورد نظر (نظیر تنشها) نیاز است که با استخراج RNA از سلولهای گیاه تحت تنش تأمین خواهد شد. دراین مطالعه تغییرات بوجود آمده در میزان تحمل به سرما و تجلّی ژنها در واکنش به تغییرات دما در گیاهان *A.desertorum* و *A . elongatum* مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روشها:

بذر گونه‌های *A. elongatum, A. deserturum* روی کاغذ صافی مرطوب، در داخل پتری‌دیش و در دمای اتاق، جوانه دار شده و پس از آن به خاک و درون گلدانهای ۱۰سانتیمتری انتقال یافتند. گیاهان در دمای ۲۰°C/۱۵°C (شب / روز)، طول روز به ۱۰ ساعت، شدت روشنایی ۱۷۰ میکرو مول در متر مربع در ثانیه و رطوبت نسبی ۷۰ درصد رشد کردند (شاهد).

پس از رسیدن به مرحله سه برگی، گیاهان هر دو گونه به مدت دو هفته تحت دمای ۶°C/۲°C (شب/روز) قرار گرفتند (سرمادیده). پس از آن آزمون انجماد[1] طبق روش Pearce و McDonald (۱۹۷۸) و Pearce (۱۹۸۰) بر روی آنها انجام گرفت. برای انجام این عمل گیاهان شاهد و سرمادیده از هر دو گونه را برداشت نموده و پس از هرس ریشه واندام هوایی، آنها را درون لوله‌هایی قرار داده و انجماد نمونه‌ها در داخل حمام

1- Frost test

الکل ودر دماهای ۲-،۴-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-و ۲۰°C- و به مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت. سپس گیاهان در دمای اتاق (۲±۲۳) ذوب و جهت رشد مجدد به خاک و دمای ۲۰°C/۱۵°C منتقل شدند، و پس از مدت ۲۸ روز درصد زنده مانی پس از انجماد در دماهای مختلف انجماد تعیین گردید.

برای بررسی وضعیت تجلّی ژنها، مریستم ساقه با غلاف برگ احاطه کننده آن از گیاهان شاهد و تحت دمای پایین، در ازت مایع منجمد شده و RNAکل از آنها به روش Wadsworth و همکاران (۱۹۸۸) استخراج گردید. غلظت RNA توسط اسپکتروفتومتر تعیین، و کیفیت نمونه‌های RNA با قرار دادن یک میکروگرم RNAکل در ژل یک درصد آگارز در داخل بافر TBE (۰/۰۸۹ مولارتریس بیس، ۰/۰۸۹ مولار اسیدبریک، ۰/۰۰۲ مول EDTA، pH=۸) و با رنگ آمیزی توسط اتیدبوم بروماید و تحت نور ماوراء بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار ۱۰ میکروگرم RNAکل در ژل ۱/۲ درصدآگارز و ۲/۲ مولار فرمالدئید طبق روش سمبروک و همکاران (۱۹۸۹) الکتروفورز گردید. سپس RNA به یک غشاء نایلونی با بار مثبت[1] به روش نورذرن بلاتینگ [2] استفاده شده توسط Dunn و همکاران (۱۹۹۰) منتقل و به کمک یووی کراس لینکر[3] و با نور ماوراء بنفش بر روی غشاء مذکور تثبیت شد. آماده سازی قبل از هیبریداسیون با قراردادن غشاء حاوی RNA در دمای ۴۲°C درون محلول هیبریداسیون حاوی ۵ x SSPE (۱ x SSPE عبارتست از: ۰/۱۸ مولار NaCl، ۰/۰۱ مولار NaH_2PO_4، ۰/۰۰۱ مولار EDTA، pH: ۷/۴)، ۵ × Denhardt's (۱۰۰ × Denhardt's عبارتست از ۲ درصد (وزن در حجم) BSA، ۲ درصد فیکول و ۲ درصد PVP، ۰/۵درصد SDS، ۵۰ درصد فرمامید و ۰/۲ میلیگرم در لیتر DNA

1- Nylon plus membrane

2- Northern blotting

3- UV crosslinker

اسپرم سالمون[۱])، انجام گرفت. کاوشگرهای[۲] $HmGlt_4$ (Harrison و همکاران، ۱۹۹۵) و dhn1 (Close، ۱۹۸۹) به ترتیب جهت ردیابی ژنهای خانواده nsLTPs و Dehydrins، به روش آغازگر تصادفی[۳] و با استفاده از کیت ویژه - MBI (Fermentas) با نشانگر $[\alpha-^{32}p]dCTP$ نشاندار شدند. هیبریداسیون RNA با کاوشگرهای فوق و در داخل محلول هیبریداسیون در دمای ۴۲°c انجام شد. سپس خود پرتونگاری[۴] تا ظهور لکه یا نوارهای مشخص بر روی فیلم حساس در دمای ۷۰°c- بعمل آمد.

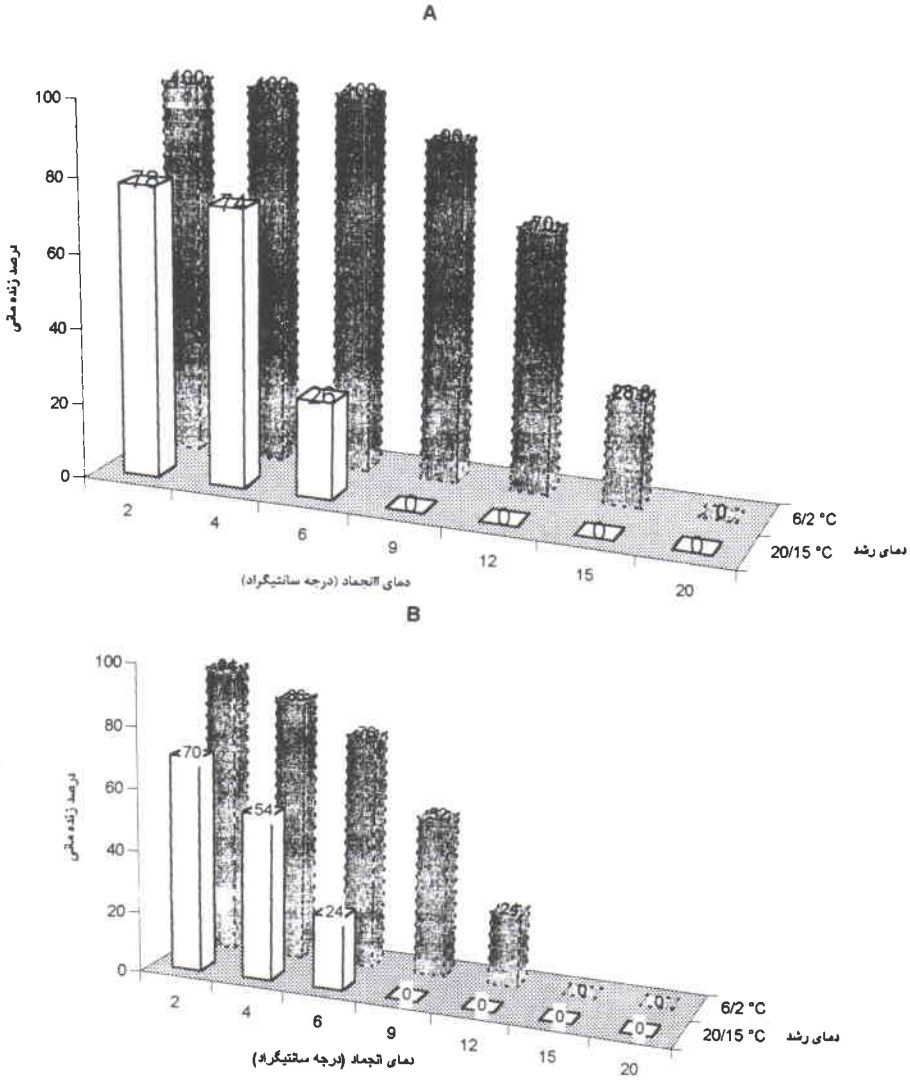
تبدیل[۵] داده‌های مربوط به زنده‌مانی (درصد زنده مانی) که بین صفر و ۱۰۰ درصد قرار داشتند. با تبدیل Arcsine انجام گرفت و تجزیه واریانس به روش GLM[۶] و با استفاده از نرم افزار MINITAB به منظور تعیین اختلاف معنی دار میان میانگین‌های مورد نظر بعمل آمد.

نتایج و بحث:

به منظور مطالعه توانایی تحمل در برابر سرما در *A.desertorum* و *A. elongatum*، تغییرات در میزان سرماسختی ناشی از کاهش دما مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون انجماد (جدول ۱ و شکل ۱) در هر دو گونه مورد بررسی نشان دادند که درصد زنده‌مانی گیاهان در دمای ۶°C/۲°C (شب / روز) بیشتر از دمای ۲۰°C/۱۵°C (شب/روز) است. نظر به اهمیت شناخت عوامل مؤثر در میزان تحمّل در برابر سرما و به ویژه نقش سرما سازگاری[۷]

1- Salmon sperm DNA
2- Probes
3- Random priming
4- Autoradiography
5- Data transformation
6- Generalized linear model
7- Cold acclimation

در افزایش بقاء گیاه در برابر یخ زدگی، تأثیر درجه حرارت بر فرآیند فوق مورد آزمون قرار گرفت و نتایج بدست آمده با نتایج Dunn و همکاران (۱۹۹۴) و Pearce وهمکاران (۱۹۹۶) یکسان بودند که اثر دماهای پایین را در افزایش سرما سختی و تحمل در برابر سرما مثبت گزارش کرده اند. همچنین، افزایش تحمل در برابر سرما و زنده مانی پس از انجماد در گیاهان سرمادیده با افزایش تجمع mRNAهای ژنهای مورد نظر همراه بود (شکل شماره ۲)، که با گزارشهای Pearce و همکاران (۱۹۹۸) و Tabaei - Aghdaei و همکاران (۲۰۰۰) همانندی دارد. افزایش میزان سرماسختی و تجمع mRNA در واکنش به دمای پایین ممکن است به دلیل افزایش قندهابه ویژه ساکارز (Calderon و Pontis، ۱۹۸۵; Leborgne و Teulieres ، ۱۹۹۵) باشد. افزایش غلظت ساکارز در گیاهان قرار گرفته در دماهای پایین می تواند به دلیل کاهش مصرف مواد تولید شده طی فرآیند فتوسنتز (به دلیل رشد کم در درجه حرارت کم) باشد (Pollock، ۱۹۸۶)، که در نتیجه ذخیره هیدراتهای کربن به ویژه قندها در سلولهای گیاه افزایش می یابد. افزایش سرما سختی و تجلی ژنها در نتیجه افزایش غلظت قندها نظیر ساکارز نیز در موافقت با پیشنهاد طبایی عقدایی و پیرس، ۱۳۷۸؛ Yu، ۱۹۹۹) است. با توجه به جدول ۲، بین دو گونه مورد آزمایش روییده شده در شرایط شاهد ۲۰°C روز و ۱۵°C شب)، از نظر زنده مانی پس از آزمون انجماد و نیز میزان تجمع mRNA ژنهای مورد بررسی اختلاف معنی داری وجود نداشت. در حالیکه بین دو گونه در شرایط روئیده شده ۶°C/۲°C پس از آزمون انجماد، به لحاظ زنده مانی و تجمع mRNA ژنهای مورد نظر اختلاف معنی داری در سطح ۰/۱ درصد وجود داشت. که بیانگر توانمندی بیشتر *A. elongatum* در بقاء پس از تنش ناشی از یخ زدگی می باشد (جدول شماره ۲ و شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: مقایسه داده‌های مربوط به تحمل در برابر سرما در گیاهان *Agropyron desertorum* (A) و *A. elongatum* (B) روییده در دماهای ۲۰°C/۱۵°C (شب/روز) و ۶°C/۲°C (شب/روز) بر اساس تعیین درصد زنده مانی پس از انجماد در دماهای مختلف

در مجموع اگر چه دو گونه از نظر واکنش در برابر دمای پایین و تنش سرما متفاوت بودند، امّا در هر یک از دو گونه مورد بررسی بین میزان تحمل در برابر تنش یخ زدگی و تجلّی ژنهای مورد آزمایش (در سطح *mRNA*) همبستگی مستقیمی وجود داشت.

جدول شماره ۱: اثر تغییرات درجه حرارت رشد بر تحمل به یخ‌زدگی (درصد زنده‌مانی) در گونه‌های *A. elongatum, A. desertorum*

گونه گیاهی	دمای رشد	درصد زنده‌مانی در دماهای مختلف انجماد															
		−۲°C		−۴°C		−۶°C		−۹°C		−۱۲°C		−۱۵°C		−۲۰°C	
		میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P
A. desertorum	۲۰°C/۱۵°C	۷۸	**	۷۴	***	۲۶	***	۰	***	۰	***	۰	***	۰	Ns
	۶°C/۲°C	۱۰۰		۱۰۰		۱۰۰		۹۰		۷۰		۲۸/۸			
A. elongatum	۲۰°C/۱۵°C	۷۰	***	۵۴	***	۲۴	***	۰	***	۰	***	۰	ns	۰	Ns
	۶°C۲°C	۹۴		۸۶		۷۶		۵۲		۲۴		۰		۰	

ns: عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد (P>0.05)

**: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد(P>0.01)

***: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد(P>0.001)

جدول شماره ۲: مقایسه تحمل به یخ‌زدگی در *A. desertorum* و *A. elongatum* براساس آزمون انجماد

گونه گیاهی	دمای رشد	درصد زنده‌مانی در دماهای مختلف انجماد															
		-۲°C		-۴°C		-۶°C		-۹°C		-۱۲°C		-۱۵°C		-۲۰°C			
		میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P	میانگین	P
A. desertorum	۲۰°C/۱۵°C	۷۸	**	۷۴	***	۲۶	***	۰	***	۰	***	۰	***	۰	Ns
	۶°C/۲°C	۷۰		۵۴		۲۴		۰		۰		۰			
A. elongatum	۲۰°C/۱۵°C	۱۰۰	***	۱۰۰	***	۱۰۰	***	۹۰	***	۷۰	***	۲۸/۸	ns	۰	Ns
	۶°C/۲°C	۹۴		۸۶		۷۶		۵۲		۲۴		۰		۰	

ns: عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد (P>0.05)

**: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد(P>0.01)

***: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد(P>0.001)

منابع

۱- طبائی عقدائی، س.ر. و *R.S. Pearce* ۱۳۷۸. اثر ساکارز بر بیان ژنهای (Gene expression) عامل مقاومت به سرما در کشت‌های سلول و کالوس جو *(Hordeum vulgare)*. نخستین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، تهران، ص ۳۰۷-۲۹۵.

Calderon, P. and H.G. Pontis, 1985. Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chiling shock. Plant Sci., 42: 173-176.

Chandler, P.M. and M. Robertson, 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and relation to stress tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 45:113-141.

Close, T.J., A.A. Kortt, and P.M. chandler, 1989. A cDNA - based comparison of dehydration - induced by cold treatment. J. Exp. Bot., 41 (232): 1405-1413.

Dunn, M.A., N.G. Goddard, L. Zhang, R.S. Pearce and M.A. Hughes, 1994. Low-temperature-responsive barley genes have different control mechanisms. Plant Mol. 24: 879-888.

Houde, M., J. F. Lalibert, Rassart, E., Dhindsa, R.S. and F. Sarhan, 1992. Cloning, Characterization, and expression of a cDNA encoding a 50-kilodlton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. Plant Physiolology, 99: 1381-1387.

Harrison, P., J.E. Rixon, P.M. Cairns, R.S. Pearce, M.A. Hughes, and M.A. Dunn. 1995. Molecular analysis of cold induced non-specific lipid transfer of wall barley *(Hordeum murinum L.)* differing in low temperature adaptation. J. Exp. Bot., 46:67.

Leborgne, N. and C. Teulieres, 1995. Carbohydrate content of *Eucalyptus gunnii* leaves along an annual cycle in the field and during induced frost-hardening in controlled conditions. Trees, 10:86-93.

Molina, A. and F. Garcia-Olmedo, 1993. Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *Plant J.*, 4(6): 983-991.

Moons, A., G. Bauw, E. Pearson, M. Van Montagu and D.V. Straeten, 1995. Molecular and physiological response to abscisicacid and salts. Plant Physiol., 107: 177-186.

Mundy, J. and N.H. Chau, 1988. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. European Mol. Biol. Organization J., 7: 2279-2286.

Neven, L.G., D.W. Haskell, A. Hofig, Q.B. Li, and C.L. Guy, 1993. Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. Plant Mol. Biol., 21: 291-305.

Pearce, R.S. and I. McDonald, 1978. The independent assessment of frost hardiness of excised laminae, excised roots and trimmed tillers of tall fescue *(Festuca arundinaceae)*. J. Appl. Ecol., 15: 885-895.

Pearce, R.S, 1980. Relative hardiness to freezing of laminae, roots and tillers of tall fescue. New Phytol., 84: 449-463.

Pearce , R.S., M.A. Dunn, J.E. Rixon, P. Harrison, and M.A. Hughes, 1996. Expression of cold-inducible genes and frost hardiness in the crown meristem of young barley *(Hordeum vulgare* L. cv. *lgri)* plants grown in indifferent environments. Plant Cell Environ., 19:275-290.

Pearce, R.S., C.E. Houlston, K.M. Atherton, J.E. Rixon, P. Harison, M.A. Hughes, and M.A. Dunn, 1998. Localization of expression of three cold-induced genes, blt 101, blt4.9 and blt14, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley. Plant Physiol., 117: 787-795.

Pearce, R.S. 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. Plant Growth Regulation, 29: 47-76.

Pollock, C.J. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. New Phytol., 104: 1-24.

Sambrook, J., E.F. Fritch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A labortory manual. Cold spring Harbor Laboratory, New York.

Skriver, K. and J. Mundy, 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. Plant Cell, 2: 502-512.

Tabaei- Aghdaei S.R. P. Harrison and R.S. Pearce, 2000. Expression of dehydration-stress-related genes in the crowns of wheatgrass species *[Lophopyrum elongatum* (Host) A. Love and *Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link) Schult.] having contrasting acclimation to salt, cold and drought. Plant, Cell and Environ, 23: 561-571.

Torres - Schumann, S., A. Godoy, Joes. Goddy. and A. Josie. Pintor - Toro, 1992. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. Plant Mol. Biol., 18: 749-757.

Van Zee, K., F.Q. Chen, P.M. Hayes, T.J. Close, and T.H.H. chen, 1995. Cold specific induction of a dehydrin gene family member in barley. Plant Physiol., 108: 1233-1239.

Wadsworth, G.J., M.G. Redinbaugh, and J.G. Scandalios, 1988. A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. Analytical Biochem., 172: 279-283.

Yu, S.M. 1999. Cellular and genetic responses of plant to suger starvation. Plant Physiol., 121(3): 687-693.

Molecular tagging of cold-inducible genes in *Agropyron desertorum* and *A. elongatum*

Seyed R. Tabaei-Aghdaei[1]

Differential expression of low - temperature - induced genes was investigated in *Agropyron desertorum* and *A.elongatum*. Total RNA was extracted from the plants grown under 20/15°C (day/night) and at 6/2°C (day/night) temperatures. The RNA was then fractionated through electrophoresis, and accumulation of mRNAs corresponding to stress - inducible nsLTP and dehybrin gene families was analyzed, using northern hybridization.

The mRNA level of the test genes increased in plants under 6/2°C, indicating gene expression enhancement in responses to low temperature stress. Also, cold hardiness was examined through a frost test, by assessment of survival in both control (20/15°C) and low - temperature (6/2°C) -treated plants after freezing. Freezing tolerance was improved in plants grown at low-non-freezing temperatures. Also, the levels of freezing survival and gene expression were higher in *A. desertorum* than in *A. elongatum*.

A positive correlation was also observed between the degree of freezing tolerance and the expression of the cold-inducible genes, and this could be a useful result in clarification of the role of the genes in plant freezing tolerance.

Key words: Cold hardiness, Gene expression, Low-non-freezing temperature, Strees-inducible genes, mRNA accumulation, Survival, Northern hybridization, *Agropyron deserturum* and *A. elongatum*.

1- Department of Genetics and Physiology, Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran , Iran.