Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 1، بهار 1392)

ارزیابی الگوی بیان ژن روبیسکو و برخی صفات فیزیولوژیک تحت تنش سرما در گیاه نخود

سیده صنم کاظمی شاهاندشتی[1]، رضا معالی امیری *[2]، حسن زینالی[2]، سیده‌ساناز رمضانپور[3]، محسن مهدیه[4]، سید عباس طباطبایی فر[5]

1 و 2 دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
3 دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
4 محقق موسسه تحقیقات دیم مراغه
5 آموزشکده کشاورزی رضوان کرمان

تاریخ دریافت: 1391/03/24، تاریخ پذیرش: 1391/07/05

چکیده

گیاهان در فرآیند سازگاری به کمک تنظیم بیان ژن‌ها و متابولیسم سلولی به دماهای پایین پاسخ می‌دهند. در این پژوهش، میزان رونوشت ژن روبیسکو به عنوان آنزیم مهم دخیل در فتوسنتز و تولید انرژی، میزان پراکسیداسیون چربیهای غشا به عنوان شاخص خسارت سلولی و میزان پرولین به عنوان یکی از سازوکارهای حفاظت سلولی در شرایط دمایی معمولی (23 درجه سانتی گراد)، سرماسازگاری (10 درجه سانتی گراد)، تنش سرما (4 درجه سانتی گراد) و دوره بهبودی (23 درجه سانتی گراد) در نخود کابلی جم ارزیابی شد. نتایج حاکی از تفاوت معنی دار صفات مطالعه شده در تیمارهای آزمایش بود. افزایش بیان ژن روبیسکو که با خسارت کمتر و میزان پرولین بیشتر غشاء همراه بود اهمیت روبیسکو را به عنوان یکی از ژن‌های موثر در فرآیند پاسخ سلولی نشان داد. در دوره بهبودی بیان ژن افزایش معنی‌دار نشان داده و میزان خسارت غشایی کاهش یافت که حاکی از نجات سلول‌های گیاه تحت سرما و استقرار نوعی سازگاری جدید در نخود است. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که پایداری بیان ژن روبیسکو با حفاظت کننده‌های سلولی و خسارت غشایی در ارتباط بوده و می‌تواند به عنوان یکی از فرآیندهای دخیل در ساز و کارهای تحمل محسوب شود.

کلمات کلیدی: *بیان ژن، پراکسیداسیون چربی‌ها، تنش سرما، سازگاری، روبیسکو.*

* نویسنده مسئول: رضا معالی امیری تلفن: 09124190124 Email: rmamiri@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تنش سرما به عنوان یکی از مهمترین تنش-های محیطی سبب کاهش عملکرد گیاهان و حتی مرگ آن‌ها می‌شود (Jun-jie *et al.*, 2009). غشای پلاسمایی به عنوان اولین بخش سلول که به تنش سرما پاسخ می‌دهد، ساختاری دینامیک بوده که از بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی حمایت می کند. یکی از اثرات عمده تنش سرما بر غشا، پراکسیداسیون چربی‌های غشایی است که در اثر ایجاد مالون دی آلدهید[1](MDA) به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع به وجود می‌آید (Campos *et al.*, 2003). بدین ترتیب با تغییر در ساختار غشاء و پروتئین‌ها و افزایش مواد محلول سمی، نفوذپذیری و انعطاف-پذیری غشا افزایش یافته و خروج یون‌ها از غشا و در نتیجه ایجاد خسارت به گیاهان تسریع می‌شود (Bowers 1994). بنابراین اندازه گیری شاخص‌های خسارت به غشا یکی از معیارهای مطالعه پاسخ های گیاه به تنش سرما می‌باشد (Heidarvand *et al.*, 2011). در طبیعت القای تحمل به سرما با استقرار تدریجی گیاه در دماهای پایین غیریخبندان ایجاد می‌شود، فرآیندی که سرماسازگاری[2]، نامیده می‌شود (Thomashow., 1999). سرماسازگاری از طریق تغییرات متعدد در بیان ژن، کاهش یا توقف رشد، تغییر در ترکیب لیپیدی غشا، تغییر در ترکیب محلول‌های سازگار و افزایش آنتی‌اکسیدان های سلولی انجام می‌شود (Nayyar *et al.*, 2005).

گیاه نخود (*Cicer Arietinum* L.) به عنوان دومین لگوم خوراکی کشور، دارای تنوع مورفولوژیکی بالا، اما تنوع ژنتیکی ضعیف، حساس به سرما بوده و تحت تنش سرما تولید آن محدود می‌شود. سنجش میزان اثر عوامل مختلف در تحمل به تنش‌های غیر زنده از روش‌های متعددی از جمله اندازه‌گیری سطوح رونویسی ژن‌ها و روش‌های فیزیولوژیکی انجام می گیرد. بنابر این یافتن رابطه بین پاسخ‌های مختلف گیاه در سطوح ژنتیکی و فیزیولوژیکی حائز اهمیت بوده و به ارزیابی بهتر گیاه و همچنین درک بعضی از ساز وکارهای تحت تاثیر تنش و تغییرات متابولیکی گیاه کمک می‌کند.

یکی از آنزیم‌های مهم در فعالیت فتوسنتزی گیاه، روبیسکو است که در حدود 50 درصد پروتئین های برگی را شامل می‌شود. این پروتئین از زیر واحدهای بزرگ و کوچک تشکیل شده که به ترتیب بوسیله ژنوم کلروپلاست و هسته سنتز می-شوند. مطالعات در گیاهان دیگر نشان داده که تنش‌های محیطی اثرات سوء بر فعالیت آنزیم روبیسکو داشته که به صورت کاهش سنتز یا فعالیت زیر واحدها، تخریب آن‌ها و در نهایت کاهش فتوسنتز تظاهر می‌یابد (Moreno *et al.*, 2008). Leport *et al* (1999) گزارش نمودند که 80-50 درصد کاهش در عملکرد در اثر محدودیت در فتوسنتز است. تنش سرما با

[1] Malondialdehyde (MDA)
[2] Cold acclimation

www.SID.ir

Archive of SID

آسیب به غشاءهای کلروپلاستی می تواند بیشترین خسارت را به فتوسنتز و راندمان تولید گیاه وارد سازد (Kingston-Smith *et al.*, 1997). بنابراین بررسی روند تغییرات بیان ژن روبیسکو تحت تیمارهای کنترل، سرما سازگاری و تنش سرما احتمالا بیانگر بخشی از پاسخ های سلولی می‌تواند باشد. پرولین[1] از جمله محلول‌های سازگار، نیز به عنوان یکی از مکانیسم های حفاظت عمومی در سلول های گیاهی عمل می کند. تجمع پرولین منجر به افزایش اسملیته سلول شده و فشار لازم برای توسعه بافت سلولی[2] را فراهم می‌آورد. در نتیجه یکپارچگی غشا برای جلوگیری از تجریه پروتئین‌ها، تحت تنش اسمزی یا دهیدراسیون که به طور غیر مستقیم از تنش شوری، گرما و سرما به وجود می‌آیند، حفظ می‌شود. پرولین همچنین از ساختار و فعالیت‌های پروتئینی محافظت کرده و نقش کلیدی در حفاظت از فعالیت فتوسنتزی دارد. به طور سنتی نخود در مناطق مدیترانه‌ای و ایران به صورت بهاره کشت می‌شود. کشت بهاره اغلب با تنش‌های خشکی و گرمایی آخر فصل مواجه شده که تولید را کم و بی ثبات می‌کند (Deokar *et al.*, 2011)، به طوری که هر ساله حدود 15-14 درصد خسارت محصول به دلیل افزایش دمای آخر فصل و کاهش رطوبت خاک و نیز کاهش بارش‌ها در مناطق مدیترانه‌ای رخ می‌دهد (Berger *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد کشت زمستانه نخود، می تواند بخشی از این مشکلات را حل نموده اما نیاز به بهبود تحمل به تنش سرما در این گیاه احساس می‌شود. در این پژوهش، میزان بیان ژن روبیسکو در سطح RNA و همچنین برخی پاسخ های فیزیولوژیکی گیاه نخود از جمله مقدار خسارت وارده به غشا و میزان پرولین در فواصل زمانی اعمال تیمار سرمایی در نخود جم ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از نخود کابلی جم استفاده شد. بذور با وایتکس ده درصد به مدت ده دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری دیش با رطوبت لازم قرار گرفت. پتری‌دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای 23 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Kaur *et al.*, 2008) و پس از جوانه زنی، گیاهچه‌ها به گلدان ها انتقال یافت. گلدان‌ها در اتاقک رشد با نور 200 میکرومول بر انیشتن و شرایط نوری 16 ساعت روز و 8 ساعت شب و دمای 23 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 75 درصد قرار داده شد. نمونه گیری از برگ گیاهچه‌های سه هفته‌ای انجام شد. گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای به دو قسمت تقسیم شدند بخشی از آنها در دمای 23 درجه سانتی‌گراد و شرایط فوق الذکر نگهداری شده و بخشی دیگر به دمای 10 درجه سانتی‌گراد جهت سرما سازگاری انتقال یافت. به منظور

[1] Proline
[2] Expansion

www.SID.ir

Archive of SID

سرماسازگاری، گیاهچه‌ها پنج روز در این دما نگهداری شدند. سپس، گیاهچه‌ها به دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز انتقال یافتند. بعد از اتمام دوره تنش و جهت بررسی فرآیند بهبود[1]، گیاهچه‌ها به دمای 23 درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها در روزهای اول و پنجم سرملسازگاری، روز دوم تنش و روز دوم دوره بهبودی انجام شد. میزان اکسیداسیون گیاهچه-ها براساس تجمع مالون دی آلدهید برگ با استفاده از تیوباربیتوریک اسید تعیین شد (Heath and Packer., 1968). 250 میلی گرم نمونه برگی از بخش میانی ساقه در دو میلی لیتر بافر استخراج (TCA یک درصد) هموژنه شده و به مدت پانزده دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت 13000 *g* قرار داده شد. یک میلی لیتر از محلول فوقانی به دست آمده با دو میلی لیتر محلول تیوبار بیتوریک اسید حاوی اسید تری کلرواستیک (TBA پنج درصد و TCA بیست درصد) مخلوط و در حمام آب جوش (95 درجه سانتی گراد) به مدت 30 دقیقه قرار داده شد. پس از سانتریفوژ با سرعت 10000 *g* به مدت ده دقیقه، چگالی[2] نمونه در طول موج 532 نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzoon160) تعیین شد. غلظت مالون دی آلدهید براساس فرمول $C=\frac{D}{E}$ محاسبه شد که D همان چگالی و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر 105×1/56) می‌باشد (Zhirov et al., 1982; Maali-Amiri et al., 2007).

سنجش مقدار پرولین نیز به روش اسپکتروفتومتری و در دمای 25 ±1 ºC با استفاده از روش بیتس (1973) اندازه گیری شد. به 0/5 گرم نمونه گیاهی تازه 10 میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک 3 درصد اضافه شد و به طور یکنواخت کوبیده شد و به تیوب 15 میلی‌لیتری منتقل شد. تیوب‌های حاوی نمونه 20 دقیقه با سرعت 4000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس 2 میلی لیتر از عصاره به تیوب های جدید منتقل و 2 میلی لیتر اسید نااین هیدرین(برای تهیه اسید نااین هیدرین[3] 1/25 گرم پودر اسید نااین هیدرین در 30 میلی‌لیتر اسید استیک گلایسل حل شد و سپس 20 میلی‌لیتر اسید فسفریک 6 مولار آماده شده، به آن اضافه شد.) و 2 میلی لیتر اسید استیک گلایسال به آن اضافه و محلول ورتکس شد. هم‌زمان مقدار 2 میلی لیتر از استانداردهای 0 و 4، 8، 12، 16، 20 میلی‌گرم در لیتر پرولین را درون تیوبهای جدید ریخته و 2 میلی لیتر اسید نااین هیدرین و 2 میلی لیتر اسید استیک گلایسال به آن اضافه و محلول ورتکس شد. تمام نمونه‌ها در حمام آب گرم[4] به مدت یک ساعت حرارت داده شد و سپس نمونه‌ها بر روی یخ قرار داده شد تا کاملا سرد شود. 4 میلی لیتر تولوئن به محلول اضافه نموده و به مدت 20 ثانیه با ورتکس به هم زده شد. میزان پرولین به

[1] Recovery
[2] Optical density
[3] Nine hydrine
[4] Ben marry

www.SID.ir

Archive of SID

کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج 520 نانومتر قرائت شد. داده های آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS 19.0 بر اساس آزمون t مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

80 میلی گرم از بافت مورد نظر (برگ گیاه) که با کمک هاون چینی استریل به خوبی در نیتروژن مایع کوبیده شده بودند برای استخراج RNA کل به روش بایوزول[1] استفاده شد. غلظت RNA پس از هر استخراج، با استفاده از دستگاه نانودراپ و در طول موج 260 نانومتر تعیین گردید. مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم در میکرولیتر محاسبه شد. همچنین جهت تعیین کیفیت RNA نیز مقدار 5 میکروگرم از هر نمونه روی ژل یک درصد آگارز، الکتروفورز شد تا نسبت به کیفیت بالای آن اطمینان حاصل شود. پس از اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی 18s و 28 s تیمار آنزیمی DNase بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز[2] برای تمامی نمونه‌ها اعمال شد. دو میکروگرم RNA ، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNaseI و 10 واحد آنزیم RNase inhibitor(u) مخلوط شدند و به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت10 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. تیوب‌ها جهت نگهداری، در دمای80- درجه سانتی گراد قرار داده شدند. برای ساخت cDNA، از روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. اولین رشته‌ی cDNA با کمک آغازگر الیگو دی‌تی[3] (18-20 نوکلئوتید) ساخته شد. مقدار 5 میکرولیتر از RNA ای که با DNase تیمار شده بود، همراه با 0/5 میکروگرم آغازگر الیگودی تی (18-20 نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به 11 میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت 5 دقیقه در دمای 70 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن به سرعت روی یخ، سرد گردید. سپس 4 میکرولیتر بافر واکنش و 2 میکرولیتر دی‌اکسی-نوکلئوتری‌فسفات[4] با غلظت 10 میکرومول و 20 واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب افزوده شد و حجم محلول با آب DEPC به 19 میکرولیتر رسانده شد و به مدت 5 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از آن 200 واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به محلول فوق اضافه شده و پس از مخلوط نمودن به مدت یک ساعت در دمای 42 درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس به منظور غیر فعال نمودن واکنش، تیوب ها به مدت 10 دقیقه در دمای 70 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای تایید سنتز cDNA از روش RT-PCR

[1] Biozol
[2] Fermentase
[3] Oligo dt
[4] Deoxynucleothriphosphate

www.SID.ir

Archive of SID

و الکتروفورز روی ژل در درصد آگارز استفاده شد.

طراحی آغازگر برای کمیت سنجی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1]

طراحی آغازگر برای ژن روبیسکو[2] و ژن خانه دار اَکتین[3] با استفاده از نرم افزار پرایمر3 انجام شد. توالی آغازگر ژن اختصاصی و ژن خانه دار در جدول 1 ارائه شده است.

انجام روشQRT-PCR[4]

در این پژوهش از دستگاه iQ5 شرکت بایورد[5] و کیت حاوی رنگ فلورسنت SYBR BioPars(دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) برای ارزیابی کمی استفاده گردید. 20 میکرولیتر مخلوط واکنش شامل 10 میکرولیتر مخلوط SYBR BioPars، یک میکرولیتر از هریک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت 10 میکرومول، 3 میکرولیتر آب مقطر استریل و 5 میکرولیتر نمونه cDNA مورد بررسی بود. برای هر واکنش سه تکرار تکنیکی و دو تکرار بیولوژیکی در نظر گرفته شد. پس از آماده نمودن مخلوط واکنش، پلیت مورد نظر به دستگاه iQ5 منتقل گردید و با شرایط زیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد: 2 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد و 35 تکرار با چرخه‌های 10 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد، 10 ثانیه در دمای 58 درجه سانتی‌گراد (دمای Tm آغازگر) و 10 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی گراد. بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. به این صورت که هر تیمار با گیاهان کنترل مربوط به زمان خود مقایسه گردید. جهت تجزیه‌ی داده‌ها از نرم افزار REST[6] استفاده شد.

نتایج و بحث

ژنوتیپ جم در مرحله‌ی گیاهچه‌ای تحت دمای 10 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. دمای 10 درجه سانتی‌گراد مطابق با تحقیق گذشته (Habibpour *et al.*, 2012) در مطالعه پاسخ گیاهچه-های نخود به دمای سازگاری انتخاب شد. نتایج آزمایش نشان داد که مقایسه پاسخ های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه نخود روش کارآمدی در بررسی برخی سازوکارهای دفاعی تحت تنش سرما محسوب می‌شود. آزمون مقایسه میانگین داده‌های پراکسیداسیون غشا (MDA)، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای دمایی نشان داد که بیانگر تنوع بالقوه پاسخ‌های گیاه تحت این شرایط بود (شکل 1).

[1] Real-time PCR
[2] Rubisco
[3] Actin
[4] Quantitative Reverse Transcript PCR
[5] BioRAD
[6] Relative Expression Software Tool

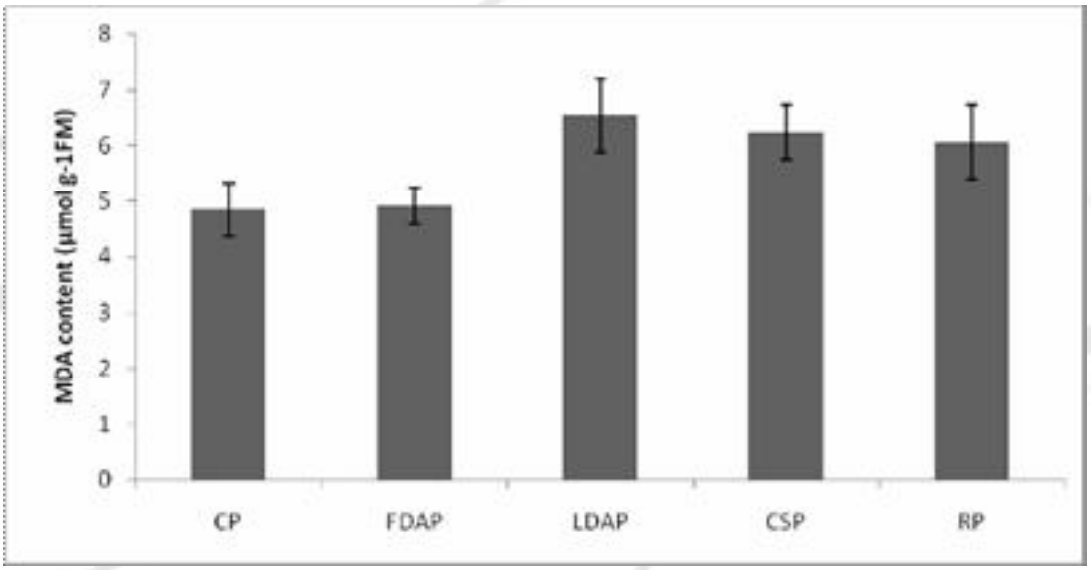
www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- توالی و خصوصیات آغازگر ژن روبیسکو و اَکتین.

Table 1-the characteristics and sequences of rubisco and actin genes.

Primer name	Sequence
Actin chickpea 841 F	CTACGAATTGCCTGATGGAC
Actin chickpea 1029 R	CCTCCTGAAAGGACGATGTT
Rubisco small subunit-For	CAACACTTGAACAGCCTCAG
Rubisco small subunit-Rev	GGGATGGGTTCCTTGCT



شکل 1- شاخص پراکسیداسیون چربیهای غشایی(MDA) در گیاهچه‌های نخود تحت تیمارهای کنترل (CP)، اولین روز سرماسازگاری 10 درجه سانتی‌گراد (FDAP)، پنجمین روز سرماسازگاری (LDAP)، تنش سرمای 4 درجه سانتی‌گراد (CSP) و فاز بهبودی (RP).

Figure 1- membrane lipid peroxidation index of chickpea seedlings in different thermal treatments, first day of acclimation phase 10˚C (FDAP), fifth day of acclimation phase (LDAP), cold stress phase (CSP) and recovery phase (RP).

انتقال گیاهچه‌ها از دمای 23 درجه سانتی گراد به دمای 10 درجه سانتی‌گراد در روز اول تغییر قابل توجهی را در میزان MDA ایجاد نکرد، اما در روز پنجم افزایش نشان داد. به طور کلی میزان کم پراکسیداسیون غشاء در سلولهای برگ یکی از عوامل مهم تحمل گیاه به تنش سرما محسوب می‌شود (Maali-Amiri *et al.*, 2007; Deryabin *et al.*, 2005). تیمار دمایی 4 درجه سانتی‌گراد در گیاه سازگار شده سبب کاهش میزان MDA شد که اهمیت سرما سازگاری در گیاه را

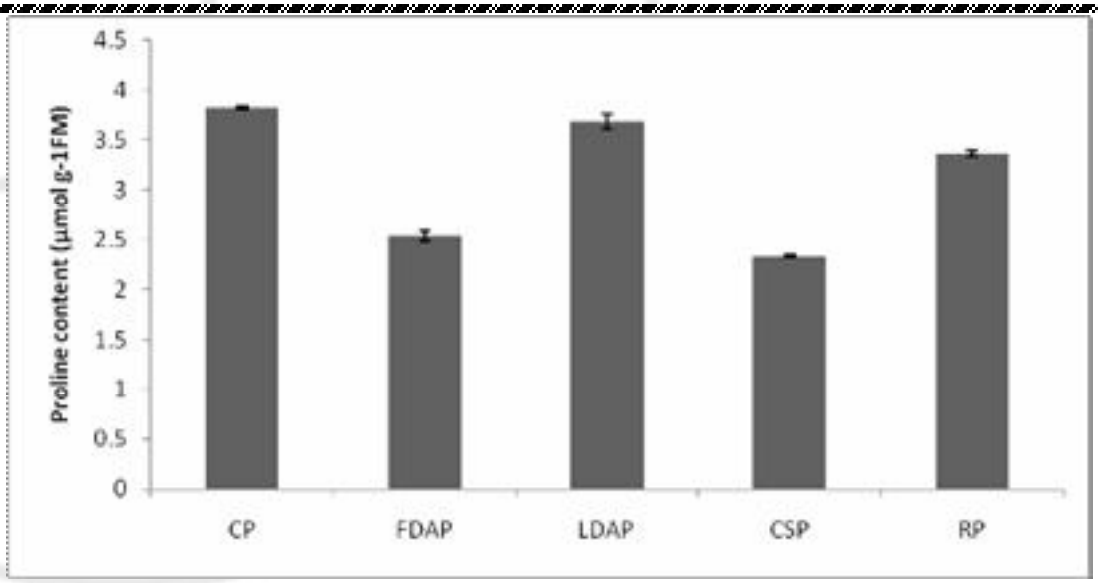
www.SID.ir

Archive of SID

تایید کرد. در فاز بهبودی نیز نتایج حاکی از کاهش میزان MDA در سطح سلول بود که بیانگر بهبود پاسخ‌های گیاه در جهت مقابله با تنش سرمایی است. نتایج بررسی تغییرات پرولین نیز حاکی از آن بود که گیاه نخود سیستم دفاعی خود را در مقابله با تنش سرما فعال کرده است. بررسی تغییرات مشاهده شده در پرولین رابطه جالبی با نتایج MDA نشان داد به طوری که در روز اول سرماسازگاری میزان پرولین کاهش یافت وقتی که میزان پراکسیداسیون غشا تغییر معنی داری نداشت. به نظر می‌رسد عدم حضور گونه های اکسیژن فعال اگرچه دمای محیط رشد به پایین‌تر از شرایط نرمال رسیده است، سبب تغییر متابولیت‌های سلولی در جهت کاهش فعالیت حفاظتی و دفاعی عمل می‌کند. نتایج بیان ژن روبیسکو در ادامه این نتیجه را تایید می‌کند. در روز پنجم سازگاری با افزایش MDA میزان پرولین نیز افزایش می‌یابد. بنابراین با افزایش میزان گونه های اکسیژن فعال که به افزایش میزان MDA منجر می‌شود سلول مسیرهای متعدد دفاعی حفاظتی خود را فعال می‌کند که به نظر می‌رسد یکی از آن ها پرولین باشد (شکل 2). چنین روند معقولی در تیمارهای دیگر دمایی نیز ادامه پیدا کرد. تیمار دمایی 4 درجه سانتی‌گراد در گیاهان سازگار شده سبب کاهش MDA و کاهش میزان پرولین شد. این موضوع تایید کننده نتایج به دست آمده در تحقیقات Kaur *et al.* (2011) بوده و نشان داد پرولین به عنوان یکی از مکانیسم‌های دفاعی نخود تحت تنش‌های سرما عمل می‌کند. در فاز بهبودی نیز با کاهش میزان MDA سطح پرولین نیز به سطح کنترل نزدیک می شود. نکته جالب این تحقیق آن است که میزان پرولین در سراسر آزمایش، از سطح آن در تیمار شاهد افزایش نیافت. بنابراین به نظر می‌رسد که تغییر میزان پرولین بیشتر در درجه تحمل به تنش سرما دخالت دارد و به عنوان یکی از مکانیسم‌های تحمل ایفای نقش می‌کند. پژوهش ها نشان داده که تحت تنش‌های سرما، خشکی و شوری فعالیت آنزیم روبیسکو در گیاهان کاهش می‌یابد (Hashimoto and Komatsu, 2007). در مطالعه حاضر، القا تیمارهای دمایی سبب تغییر بیان ژن روبیسکو شد. تجزیه‌ی داده‌ها با کمک نرم افزار REST نشان داد که بیان ژن روبیسکو در فواصل زمانی پس از قرار گیری در دمای 10 درجه‌ی سانتی‌گراد اختلاف معنی داری با تیمار کنترل در شرایط بدون تنش (23 درجه سانتی‌گراد) نشان داده است به طوری که میزان نسبی بیان ژن تا حدود 9 برابر افزایش یافت (شکل 3). به نظر می‌رسد با شروع دوره سرما سازگاری، گیاه در جهت مقابله با دمای پایین سعی در تولید انرژی بیشتر و افزایش فعالیت در جهت مهار اثرات سوء دمای پایین است. یعنی گیاه تنش دمای پایین را درک کرده و پاسخ‌های متعدد در سطوح مولکولی و فیزیولوژیکی را آغاز کرده است (Sukumaran and Weiser., 1972; Nazari *et al.*, 2011).

www.SID.ir

Archive of SID



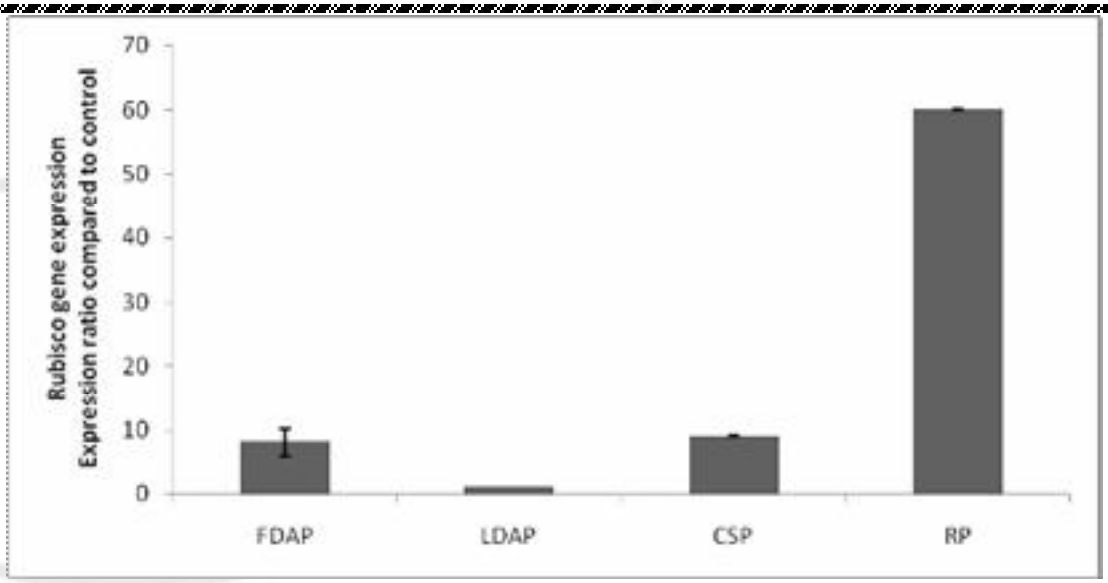
شکل 2- تغییرات میزان پرولین آزاد سلول گیاهی نخود تحت تیمارهای کنترل (CP)، اولین روز سرماسازگاری 10 درجه سانتی‌گراد (FDAP)، پنجمین روز سرماسازگاری (LDAP)، تنش سرمای 4 درجه سانتی‌گراد (CSP) و فاز بهبودی (RP).

Figure 2- changes of chickpea cells free proline content in different thermal treatments, first day of acclimation phase 10˚C (FDAP), fifth day of acclimation phase (LDAP), cold stress phase (CSP) and recovery phase (RP).

بررسی تغییرات مشاهده شده در تیمارهای دمایی این تحقیق رابطه جالبی بین بیان ژن روبیسکو و MDA نشان داد. عدم تغییر معنی دار در میزان پراکسیداسیون لیپیدی در روز نخست سرما سازگاری به معنای عدم خسارت تلقی شد یعنی القاء دمای پایین از یک طرف و عدم افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طرف دیگر سبب افزایش فعالیت فتوسنتزی گیاه شد. اما با طولانی شدن دوره سرماسازگاری میزانMDA در سلول افزایش یافت که این افزایش منجر به کاهش فعالیت ژن‌های فتوسنتزی شد. همچنین تغییر کمی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی در فواصل زمانی استقرار در تیمارهای آزمایش، مدت زمان تنش را به عنوان عنصر کلیدی در مطالعه تحمل به تش تعیین کرد. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که افزایش گونه های اکسیژن فعل سبب القا اثرات سوء مستقیم و غیر مستقیم بر زیر واحدهای روبیسکو می شود (Marin-Navarro and Moreno 2006; Yan 2006).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 3- سطوح نسبی رونوشت ژن روبیسکو در گیاهچه‌های نخود تحت تیمارهای کنترل (CP)، اولین روز سرماسازگاری در دمای 10 درجه سانتی‌گراد (FDAP)، پنجمین روز سرماسازگاری (LDAP)، تنش سرمای 4 درجه سانتی‌گراد (CSP) و فاز بهبودی (RP).

Figure 3- Quantitative levels of rubisco gene expression in chickpea seedlings in different thermal treatments, first day of acclimation phase 10˚C (FDAP), fifth day of acclimation phase (LDAP), cold stress phase (CSP) and recovery phase (RP).

بنابراین، به نظر می‌رسد القاء دمای پایین سبب تنظیم منفی فعالیت روبیسکو در سطح رونویسی شده و سلول با کاهش فعالیت فتوسنتزی، به افزایش فعالیت های دفاعی در جهت مهار پراکسیداسیون لیپیدی اقدام کرده است. کاهش معنی دار میزان MDA در دوره دمایی چهار درجه سانتی گراد موید این مسئله بود. بنابراین به نظر می رسد دوره سرماسازگاری ایجاد نوعی سازگاری سلولی در جهت مقابله با سرما در این آزمایش کرده است. این وضعیت با توجه به کاهش میزان پراکسیداسیون سلولی در فاز بهبودی و افزایش میزان بیان ژن روبیسکو قابل بررسی بود. پژوهش‌ها نشان داده دمای چهار درجه، دمای LT_{50} در نخود محسوب می‌شود (Nayyar *et al.*, 2005). دوره سرماسازگاری حتی با کاهش موقت میزان فتوسنتز سبب پایداری سلول و مهار گونه های اکسیژن فعال شده است که بیانگر درک گیاه از بهبود شرایط و همکاری فاکتورهای مختلف سلولی در بازگشت گیاه به شرایط قبل از تنش می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که گیاه نخود با گذراندن دوره سرماسازگاری، همان شرایطی که معمولا در طبیعت رخ می‌دهد احتمالا قادر به تحمل دماهای پایین (در این آزمایش،4 درجه سانتی گراد) می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که گیاه نخود در مناطقی از کشور که

www.SID.ir

Archive of SID

فاقد زمستان‌های خیلی سرد هستند، کشت شود. مطالعات قبلی نشان داد که کشت پاییزه یا زمستانه نخود، احتمالا با افزایش دوره رشد رویشی و امکان استفاده از رطوبت خاک و یا نزولات آسمانی سبب افزایش عملکرد حتی تا دو برابر شود (Habibpour *et al.*, 2012). در اثبات این مسئله بایستی سازوکارهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی تحمل به سرما در نخود در جزئیات بیشتر بررسی شود.

سپاسگزاری

هزینه این پژوهش از محل اعتبار طرح ۹۱۰۰۰۹۴۲ صندوق حمایت از پژوهشگران کشور تامین شده که مولفین کمال تشکر و قدردانی دارند.

منابع

Attallah CV, Welchen E, Martin AP, Spinelli SV, Bonnard G, Palatnik JF, Gonzalez DH (2011). Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis. Journal of Experimental Botany 62: 4281-4294.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973). Rapid determination of proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-208.

Bowers MC (1994). Environmental effects of cold on plants. In: Wilkinson, R.E. (Ed.), Plant-Environment Interactions. Marcel Dekker, New York, pp. 391–411.

Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of Coffea sp. Plants. .Journal of Plant Physiology 160: 283–292.

Deokar, A. A., V. Kondawar (2011). Comparative analysis of expressed sequence tags (ESTs) between drought-tolerant and -susceptible genotypes of chickpea under terminal drought stress. BMC Plant Biology 11: 1-70.

Deryabin AN, Dubinina IM, Burakhanova EA, Astakhova NV, Sabelnikova EP, Trunova TI (2005). Influence of yeast-derived invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature. Thermal Biology 30: 73-77.

Habibpour F, Zeinali H, Maali Amiri R, Nazari M (2012) .Genotypic Variability and physio-biochemical characteristic of Iranian black chickpea to cold stress. Romanian Agricultural Research 29: 121-130.

Hashimoto M and Komatsu S (2007). Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress Proteomics. 7: 1293–1302.

www.SID.ir

Archive of SID

Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. 1. Kinetics and Stoichoimetry of Fatty Acid Peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-215.

Heidarvand L, Maali Amiri R, Naghavi MR Farayedi Y, Sadeghzadeh B, Alizadeh KH (2011). Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. Russian Journal of Plant Physiology 58: 157–163

Jun-jie G, Tao LI, Xian-chang YU (2009). Gene expression and activities of SOD in cucumber seedlings were related with concentrations of Mn^{2+}, Cu^{2+}, or Zn^{2+} under low temperature stress. Agricultural Sciences in China 6: 678-684.

Kaur G, Kumar S, Nayyar H, Upadhyaya HD (2008). Cold Stress Injury during the Pod-Filling Phase in Chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on Quantitative and Qualitative Components of Seeds. Journal of Agronomy and Crop Sciences 194: 457-464.

Kaur G , Kumar S, Thakur P, Malika JA, Bhandhari K, Sharmab KD, Nayyar H (2011). Involvement of proline in response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to chilling stress at reproductive stage. Scientia Horticulturae 128: 174–181.

Kingston-Smith AH, Harbinson J, Williams J, Foyer CH (1997). Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. Plant Physiology 114: 1039-1046.

Leport L, Turner NC, French RJ, Barr MD, Duda R, Davies SL, Tennant DF, Siddique KHM (1999). Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a mediterranean-type environment. European Journal of Agronomy 11: 279–291.

Maali-Amiri R, Goldenkova-Pavlova I., Pchelkin VP, Tsydendambaev VD, Vereshchagin AG,

Deryabin AN, Trunova TI, Los DA and Nosov AM (2007). Lipid Fatty Acid Composition of Potato Plants Transformed with the Δ12-Desaturase Gene From Cyanobacterium. Russian Journal of Plant Physiology 54: 678-685.

Marin-Navarro J, Moreno J (2006). Cysteines 449 and 459 modulate the reduction-oxidation conformational changes of ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the translocation of the enzyme to membranes during stress. Plant Cell Environment 29: 898-908.

Moreno J, Garcia-Murria MJ, Marin-Navarro J (2008). Redox modulation of rubisco conformation and activity through its cysteine residues. Journal of Experimental Botany 59: 1605-1614.

Nayyar H, Bains TS, Kumar S (2005). Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environmental and Experimental Botany 54: 275–285.

www.SID.ir

Archive of SID

Nazari MR, Maali Amiri R, Ramezanpour SS (2011). Quantitative Assessment of Gene Expression Pattern of Beta galactosidase and Beta glucosidase under Cold Stress Condition in Chickpea. Modern Genetics Journal 4: 59-70.

Sukumaran NP, Weiser CJ (1972). An Excised Leaflet Test for Evaluation Potato Frost Tolerance. HorScience 7: 467-468.

Thomashow MF (1999). Plant cold acclimation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 571–599.

Yan SP (2006). Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. Molecular and Cellular Proteomics 5: 484-496.

Zhirov VK, Merzlyak MN, Kuznetsov LV (1982). Peroxidation of membrane lipids in cold-resistant plants damaged by below-zero temperature. Russian Journal of Plant Physiology 29: 1045–1052.

www.SID.ir

Archive of SID

Assessment of Gene Expression Pattern of Rubisco and some physiological characteristics under ColdStress Condition in Chickpea

Kazemi Shahandashti S.S.[1], Maali-Amiri R.*[1], Zeinali H.[1], Ramezanpour S.S.[2], Mahdieh M.[3], Tabatabaifar S.A.[4]

1-Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2-Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Dryland Agricultural Research Institute, Ministry of Jihad-e-Agriculture Research and Education Organization

4- Junior College of Rezvan, Kerman.

Abstract

Plant responses to low temperatures have been created through cold acclimation process using gene expression regulatory mechanisms. In this research, the quantitative gene expression ratio of *rubisco*, as an important enzyme participating in photosynthesis and cell energy production, the peroxidation of membrane fatty acids as a damage index, and the changes in proline content as one of the cell protecting mechanisms in normal, acclimation, cold stress and recovery temperatures have been assessed. Our results have shown meaningful differences between thermal treatments in studied characteristics. Increasing *Rubisco* gene expression accompanied by low damage index and high membrane proline has revealed the importance of Rubisco as one of the effective genes in cell response processes. At the end of cold stress situation and by starting recovery phase, *Rubisco* gene expression increased which is a sign of decreasing membrane damage, surveying plant cells and stabilizing a new homeostasis in chickpea. All in all, this study showed that the regulation of *Rubisco* gene expression related with cell protecting agents and membrane damage and can be assumed as one of the important processes in tolerant mechanisms.

Keywords: *Acclimation, Cell membrane fatty acids peroxidation, Cold stress, Quantitative gene expression, Rubisco.*

* Corresponding Author: Maali-Amiri R. Tel: 09124190124 Email: rmamiri@ut.ac.ir

www.SID.ir