Archive of SID

مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۲، سال ۱۳۸۰(۴۷۸-۴۶۷)

اثر توام درجه حرارت و ساکارز بر سرما سختی[1] و بیان ژنهای القا شونده در برابر سرما[2] در کشت های سلول و کالوس جو (*Hordeum vulgare* L.)

سیدرضا طبائی عقدائی
استادیار پژوهش موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۱۰/۲۱

خلاصه

در این پژوهش مقاومت به سرما و بیان ژنها در واکنش به تغییرات توام درجه حرارت و غلظت ساکارز در سلول گیاه مورد بررسی قرار گرفت. کالوس از رویان های نارس جو (*Hordeum vulgare* L.) تولید و در محیط کشت MS مایع و در دمای ۲۵°C واکشت گردید. سپس کشت ها در دو دوره ۵ و ۱۰ روزه در محیط کشت حاوی ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز و تحت دمای ۶°C به مدت۱۰ ساعت و ۲°C به مدت ۱۴ ساعت قرار گرفتند. پس از انجام آزمون انجماد، میزان سرماسختی از طریق ارزیابی زنده مانی و نیز تخمین آسیب وارده به سلول‌ها اندازه گیری گردید. RNA کل از کالوس‌های شاهد و نیز از کشت های تحت تیمارهای مختلف استخراج و میزان تجمع mRNAهای مربوط به ژن‌های HmG1t4 ، HmAP1t2.2 و dh1 با روش نورذرن بلاتینگ[3] ارزیابی گردید. نتایج بدست آمده افزایش سرماسختی در کشت‌های قرار گرفته در معرض درجه حرارت‌های پایین (بالاتر از نقطه انجماد)[4] (۶°C/۲°C (۱۴ساعت/۱۰ ساعت)) را نشان می‌دهند. همچنین، تحمل به یخزدگی در کشت‌های انجام گرفته شده در غلظت ۳٪ ساکارز و تحت دماهای ۲۵°C و ۶ °C/۲°C بسیار بالاتر از کشت‌های انجام گرفته در غلظت ۰/۱ درصد ساکارز در دماهای مذکور بود. تغییر در تجمع mRNA ژن‌های مورد آزمایش نیز به موازات تغییر در تحمل به سرما صورت گرفته، و همبستگی مثبتی بین میزان سرماسختی و بیان ژن‌های مذکور وجود داشت. نتایج ارزیابی‌ها همچنین نشان دادند که افزایش تحمل به سرما و بیان ژن در واکنش به افزایش غلظت ساکارز (از ۰/۱ به ۳ درصد) حتی در دمای معمولی (۲۵ °C) بسیار بیشتر از افزایش ناشی از تغییر در دمای رشد کالوس از ۲۵ °C به ۶ °C/۲ °C می‌باشد. بنابراین، ساکارز به عنوان عاملی مهم در فرایند سازگاری به سرما می‌تواند نقشی تعیین کننده را در تحمل به یخزدگی و بیان ژن‌ها در واکنش به سرما ایفا نماید.

واژه‌های کلیدی: سرماسختی، بیان ژن، دمای پایین بالاتر از نقطه انجماد، غلظت ساکارز، ژن‌های القا شونده در مقابل سرما، تجمع mRNA، نورذرن بلاتینگ، کالوس.

---

1 . Cold hardiness
2 . Cold – inducible genes
3 . Northern blotting
4 . Low non – freezing temperatures

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تغییر در شرایط حرارتی محیط رشد، فرایندهای مختلف را در گیاه تحت تاثیر قرار می دهد. تاثیر مستقیم و غیر مستقیم تغییر دما بر مراحل مختلف فعالیت گیاه، واکنش‌های گیاه را پیچیده‌تر نموده و تشخیص اثر مهم را از غیر مهم مشکل می‌سازد (۲۹). در بسیاری از گیاهان زمستانه مناطق معتدل، گذراندن یک دوره تحت درجه حرارت پایین ولی بالاتر از نقطه انجماد، منجر به افزایش تحمل گیاه در مقابل دماهای زیر صفر و یخزدگی می‌گردد. این فرایند به سازگاری به سرما[1] معروف بوده و طی آن تغییراتی از جمله افزایش میزان قندها در سلول اتفاق می‌افتد (۲۳ و ۲۴). نقش موثر روشنایی در ایجاد و افزایش سرماسختی در گیاه (۱۵ و ۴۷)، نیز می‌تواند به دلیل تامین یک منبع انرژی (هیدراتهای کربن) از طریق انجام فتوسنتز و فراهم نمودن شرایط مناسب برای شروع فرایند سازگاری به سرما و ادامه آن باشد، که برای زمستان گذرانی گیاهان از اهمیت خاصی برخوردار است (۳۸). ارتباط مستقیمی نیز بین میزان سازگاری به سرما و شدت و زمان تابش نور در غلات زمستانه گزارش شده است (۴)، و توانایی سازگارشدن گیاهچه‌های جوان حتی در تاریکی نیز می‌تواند به دلیل استفاده از ذخایر انرژی آندوسپرم باشد (۲). مطالعات زیادی ارتباط بین تجمع هیدراتهای کربن محلول و تحمل به سرما را در گیاهان نشان داده‌اند (۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۳۴، ۳۵، ۳۸، ۴۰، ۴۲و ۴۸)، و ایجاد سرماسختی از طریق تغذیه گیاهان با مواد حاصل از فتوسنتز (ساکارز و سایر قندها) در دماهای پایین و درغیاب نور نیز امکانپذیر می‌باشد (۴۶). تغییر در وضعیت هیدراتهای کربن در گیاه می‌تواند بر بیان ژن نیز تاثیر بگذارد (۱۹، ۲۰، ۵۴ و ۵۷). تغییر در میزان mRNA ژن‌های گروه (nsLTPs) lipid transfer proteins– specific –Non در واکنش به دماهای پایین در گیاهان گزارش شده است (۳۰، ۳۱، ۳۲ و ۴۴). همچنین در ارتباط با سازگاری گیاهان به سرما پروتئین‌ها (۵۰) و mRNA های (۳۶) مربوط به گروه ژنی Dehydrins افزایش می‌یابند. نظر به اینکه غشای سیتوپلاسمی تحت تاثیر کم آبی ناشی از یخزدگی سلول قرار می‌گیرد، انتقال انواع مختلف‌لیپیدها(۵۵)ویاتسهیل جابجایی (۵) آنها بین سیستم‌های غشایی مختلف بوسیله پروتئین‌های انتقال دهنده لیپیدها (nsLTPs)، می‌تواند به تغییر و اصلاح ساختمان و رفتار غشای سیتوپلاسمی منجر گردیده و به افزایش تحمل در مقابل تنش‌های محیطی به ویژه سرما کمک نماید (۴۱). کشت‌های سلول و کالوس جو نشان داده‌اند که توانایی سرماسخت شدن را تحت دمای پایین را داشته (۱)، و نیز تحمل به سرما و بیان ژنهای القا شونده در مقابل سرما در آنها تحت تاثیر غلظت ساکارز قرار می‌گیرد (۲). در این مطالعه تاثیر غلظت ساکارز همراه با درجه حرارت پایین بر وضعیت تحمل سلولها در مقابل انجماد و بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به سرما در کشت‌های سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

کالوس از رویان‌های نارس جو زمستانه کولتیوار ایگری (*Hordeum vulgare* L. cv. Igri) بر روی محیط کشت MS (۲۶)، حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D ، ۳٪ ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار در دمای ۲۵°C تولید و پس از آن کالوس‌های حاصله در داخل محیط کشت مایع (بدون آگار) به مدت ۲ هفته کشت گردیدند. سپس بازکشت در محیط کشت فوق با غلظت‌های ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز انجام گرفته و تحت دمای ۲/۲ °C ۶ (۱۴ساعت /۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز قرار گرفتند، و با تعویض روزانه محیط کشت به تثبیت غلظت‌های ساکارز در طول دوره سازگاری اقدام گردید. آزمون انجماد بر روی کشت‌های شاهد، و تحت تیمارهای مختلف طبق روش پیرس و مک دونالد (۱۳۷۸) (۲۷) در دماهای ۴-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد به عمل آمد. برای آزمون انجماد نیز شاهد از تیمارهای مختلف در نظر گرفته و در درجه حرارت اتاق (۲±۲۳) نگهداری شد. سرماسختی سلولها با

1 . Cold (frost) acclimation

www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی‌قدرت زنده مانی به روش رنگ‌آمیزی تترازولیوم (TTC[1])

طبق روش تانینو و مک کرسی (۴۵)، و نیز با تخمین صدمه وارده به سلول، به روش تعیین هدایت الکتریکی با دستگاه اندازه‌گیری هدایت الکتریکی طبق روش پیرس (۱۹۸۰) (۲۸) تعیین گردید.

RNA کل از کشت‌های تحت تیمارهای مختلف پس از تغییر روش پیشنهادی وادس ورث و همکاران (۵۲) از طریق جایگزینی بافر استخراج (۴۳)، بدست آمد. الکتروفورز RNA با استفاده از روش معرفی شده توسط سمبروک و همکاران (۳۹) در ژل آگارز – فرمالدئید انجام و از طریق انتقال کاپیلاری[2] (RNA) به یک غشا نایلونی با بار مثبت منتقل و با استفاده از نور ماورا بنفش و به کمک دستگاه یووی‌کراس لینکر[3] بر روی غشای مذکور تثبیت شد.

CDNAهای HmG1t4 (۱۷)و b1t4.9 (۵۳) از گروه ژنی nsLTPs از طریق روش ترانسفورماسیون باکتریایی و طبق روش سمبروک و همکاران (۱۹۸۹) (۳۹) درون باکتری کلی باسیل (نژاد XL1Blue) قرار گرفته و تکثیر شدند. پلاسمیدهای ناقل cDNAهای فوق با استفاده از کیت ویژه[4] از باکتری مذکور استخراج شدند. سپس پلاسمید pGEM5Zf (پرومگا[5]) حاوی HmGlt4 به وسیله نوکلئاز محدودگر NotI برش داده شد و cDNA مذکور از آن جدا گردید. همچنین آنزیم محدودگر EcoRI برای قطع توالی b1t4.9 از پلاسمید $pCR^{TM}II$ بکار گرفته شد، وپس از انجام الکتروفورز در ژل ۱٪ آگاروز و به کمک کیت مخصوص استخراج DNA از ژل[6] ، cDNA جدا گردیده و غلظت آن با استفاده از روش فلورسانس اتیدیوم بروماید طبق روش میناتیس و همکاران(۱۹۸۲) (۲۵) تعیین گردید.

هیبریداسیون RNA برای ارزیابی میزان mRNA مربوط به HmG1t4 ، HmAP1t2.2 (از گروه ژنی nsLTPs) (۱۷) و dh1 (از گروه ژنی Dehydrins) (۷)، به عمل آمد. برای انجام هیبریداسیون از روش آغازگر تصادفی[7] و کاوشگرهای نشان‌دار شده با ایزوتوپ فسفر ([α-32p]dCTP) استفاده گردید. با استفاده از خود پرتونگاری[8] نتایج مربوط به هیبریداسیون به صورت لکه‌هایی بر روی فیلم حساس (فوجی آر ایکس) ظاهر گردیده و با استفاده از دانسیتومتر مورد ارزیابی کمی قرار گرفت. برای اطمینان از صحت هیبریداسیون از ژن blt63 (با میزان بیان یکسان در شرایط مختلف محیطی[9]) (۱۶)، استفاده شد. کاوشگر مربوط به این ژن با یک روش غیر رادیواکتیو[10] نشان‌دار گردید. هیبریداسیون و ظهور علائم مربوطه به کمک آنتی‌بادی و با استفاده از کیت مخصوص[11] انجام گرفت. از علائم ظاهر شده به صورت لکه و یا نوار قبل از خشک شدن غشای پلاستیکی عکس تهیه گردیده و مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

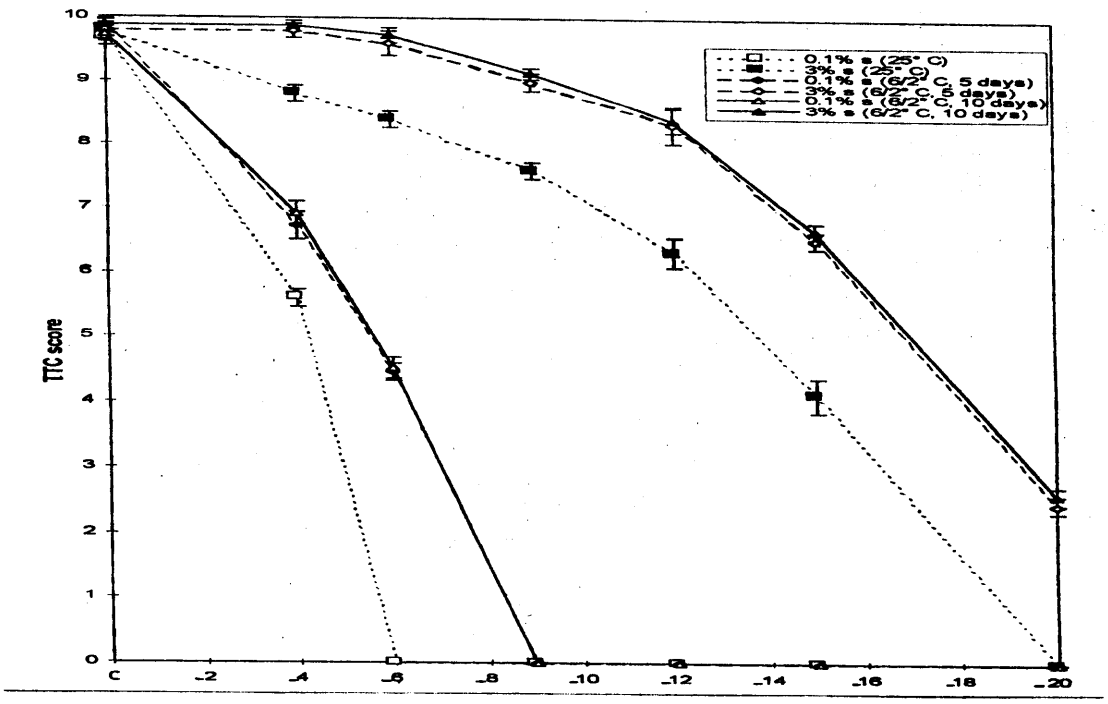
تحمل به سرما با ارزیابی قدرت زنده‌مانی و نیز میزان آسیب دیدگی پس از انجماد در کشت‌های انجام شده در دمای معمولی رشد (۲۵°C) و نیز در ۶ °C/۲ °C (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ یا ۱۰ روز در محیط کشت حاوی ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز، با روش‌های رنگ‌آمیزی تترازولیوم و تعیین هدایت الکتریکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از آزمون تترازولیوم (شکل شماره ۱ و جدول شماره ۱) نشان می‌دهند که تحمل به سرما در کشت‌های تحت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت حاوی ۳٪ ساکارز بسیار بالاتر از آنهایی بود که در محیط کشت حاوی ۰/۱ درصد ساکارز رشد نمودند.

پس از گذراندن دوره‌های ۵ و ۱۰ روزه تحت دمای ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت /۱۰ ساعت) مقاومت به انجماد در کشت‌های قرار گرفته در هر دو غلظت ساکارز (۰/۱ و ۳ درصد) افزایش یافت. نتایج حاصل از آزمون تعیین هدایت الکتریکی (شکل شماره۲ و جدول شماره ۲) نیز در نشان دادن واکنش ۲۵ سلول‌ها به عوامل مورد نظر (دما و ساکارز) با داده‌های مربوط به روش رنگ‌آمیزی تترازولیوم هماهنگی کامل داشتند. در دمای معمولی و نیز تحت درجه حرارت پایین، توده‌های سلولی کشت شده در غلظت ۰/۱ درصد ساکارز درصد نشت[12] بیشتری را در

1 . 2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride
2 . Capillary transfer
3 . UV crosslinker
4 . Qiaprep Spin Plasmid Kit
5 . Promega
6 . Qiaquick Gel Extraction Kit
7 . Random priming
8 . Autoradiography
9 . Constitutively regulated gene
10 . Digoxygenin – labeled probe
11 . DIG Nucleic Acid Detection (Boehringer Mannheim Biochemica)
12 . Percentage leakage

www.SID.ir

Archive of SID



دما (°C)

شکل ۱- قدرت زنده‌مانی پس از انجماد توده‌های سلولی جو کشت شده در محیط کشت MS مایع (بدون آگار) حاوی ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز (S) و در دمای ۲۵°C ، ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز، که با استفاده از آزمون تترازولیوم (TTC) ارزیابی شده است. مقادیر، میانگین ± خطای استاندارد مربوط به۱۵ تکرار را نشان می‌دهند، که از تیمارهای مختلف پس از انجماد و نیز شاهدهای مربوطه (c) (نمونه‌ای از تیمارهای مختلف نگهداری شده در درجه حرارت اتاق (۲ ± ۲۳) بدست آمده‌اند.

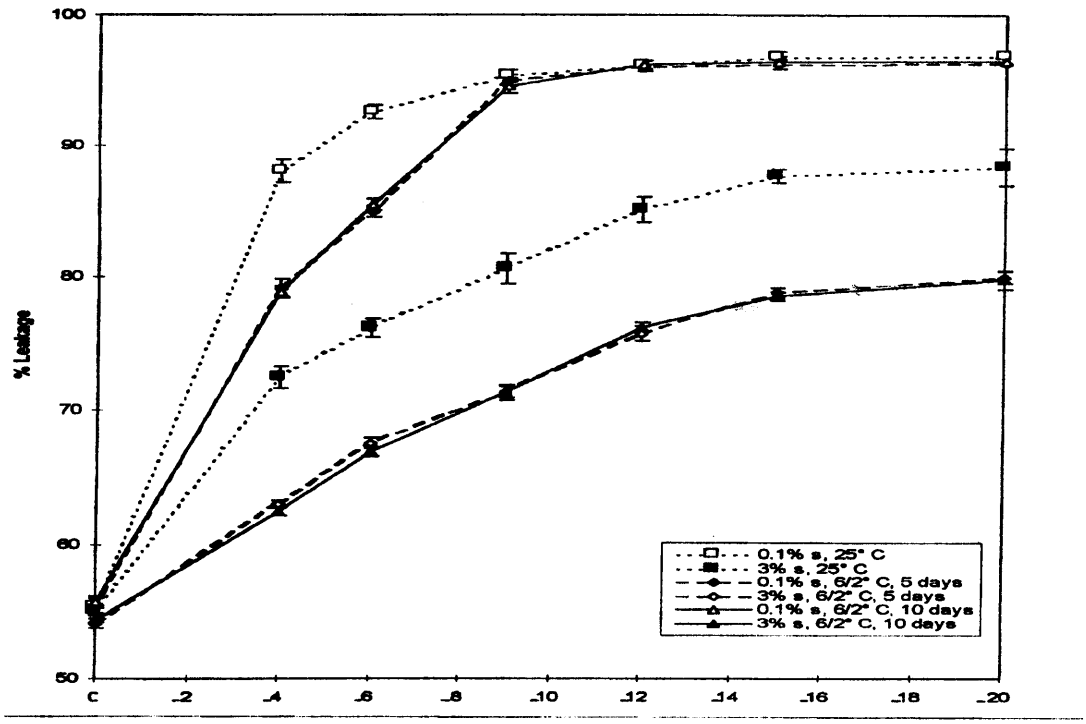
جدول۱- مقایسه داده‌های مربوط به تحمل سرما در توده‌های سلولی جو، کشت شده در ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز (S) و تحت ۲۵ °C و یا ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز، که به روش رنگ‌آمیزی تترازولیوم ارزیابی شدند.

Freezing Temp. (°C)	0.1% S vs 3% S			6/2 °C, 5 days vs 6/2 °C, 0 days		6/2 °C, 10 days vs 6/2 °C, 0 days		6/2 °C, 5 days vs 6/2 °C, 10 days	
	6/2 °C 0 day	6/2 °C 5 day	6/2 °C 10 day	0.1% S	3% S	0.1% S	3% S	0.1% S	3% S
-4	***	***	***	***	***	***	***	ns	ns
-6	***	***	***	***	***	***	***	ns	ns
-9	***	***	***	ns	***	ns	***	ns	ns
-12	***	***	***	ns	***	ns	***	ns	ns
-15	***	***	***	ns	***	ns	***	ns	ns
-20	ns	***	***	ns	***	ns	***	ns	ns

*** , ** ,* و ns به ترتیب تفاوت‌های معنی‌دار در سطح ۰/۱ ، ۱، ۵ درصد و عدم وجود تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند.

www.SID.ir

Archive of SID



(°C)

شکل ۲- درصد نشت پس از انجماد توده‌های سلولی جو کشت شده در محیط کشت MS مایع (بدون آگار) حاوی ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز (S) تحت دمای ۲۵ °C ، ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز که با استفاده از دستگاه سنجش هدایت الکتریکی[1] ارزیابی شده است. مقادیر، میانگین ±خطای استاندارد مربوط به ۳ تکرار را نشان می‌دهند، که از تیمارهای مختلف پس از انجماد و نیز شاهدهای مربوطه (c) (نمونه‌ای از تیمارهای مختلف نگهداری شده در درجه حرارت اتاق (۲±۲۳) بدست آمده‌اند.

جدول ۲- مقایسه داده‌های مربوط به تحمل به سرما در توده‌های سلولی جو، کشت شده در ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز (S) و تحت ۲۵ °C و یا ۶°C/۲°C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز که به روش تعیین هدایت الکتریکی برآورد شدند.

Freezing Temp. (°C)	0.1% S vs 3% S			6/2 °C, 5 days vs 6/2 °C, 0 days		6/2 °C, 10 days vs 6/2 °C, 0 days		6/2 °C, 5 days vs 6/2 °C, 10 days	
	6/2 °C 0 day	6/2 °C 5 day	6/2 °C 10 day	0.1% S	3% S	0.1% S	3% S	0.1% S	3% S
-4	***	***	***	**	**	*	**	ns	ns
-6	***	***	***	*	**	*	*	ns	ns
-9	**	***	***	ns	**	ns	**	ns	ns
-12	*	***	***	ns	**	ns	**	ns	ns
-15	**	***	***	ns	**	ns	***	ns	ns
-20	*	***	***	ns	*	ns	*	ns	ns

***، **، * و ns به ترتیب. تفاوتهای معنی دار در سطوح ۰/۱، ۱، ۵ درصد و عدم وجود تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند.

1 . Conductance meter

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- تحمل در برابر یخزدگی (بر حسب LT_{50})، در توده‌های سلولی جو، کشت شده در محیط کشت MS مایع (بدون آگار) حاوی ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و قرار گرفته بمدت ۵ و ۱۰ روز در معرض دمای ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت). داده‌ها از شکل شماره ۱ استخراج شده‌اند.

غلظت ساکارز					
۰/۱ درصد			۳ درصد		
۲۵°C	۶°C/۲°C، ۵ روز	۶°C/۲°C، ۱۰ روز	۲۵°C	۶°C/°C۲، ۵ روز	۶°C/۲°C، ۱۰ روز
-۴/۲°C	-۵/۶°C	-۵/۷°C	-۱۴/۳°C	-۱۷/۳°C	-۱۷/۵°C

مقایسه با کالوس‌های قرار گرفته در ۳ درصد ساکارز نشان دادند. همچنین، درصد نشت کشت‌های قرار گرفته تحت دمای درجه سانتی‌گراد در هر یک از دو غلظت استفاده شده ساکارز بیشتر از کالوس‌های نگهداری شده در دمای پایین ۶ °C/۲ °C می‌باشد.نتایج هیچ یک از دو روش ارزیابی مقاومت به سرما تغییر قابل ملاحظه‌ای در تحمل به سرما پس از افزایش دوره سرما (۶ °C/۲ °C) از ۵ به ۱۰ روز را در سلول‌ها نشان ندادند. LT_{50} (دمایی که ۵۰ درصد مرگ و میر را باعث می‌شود) توده‌های سلولی پس از تغییر دمای آنها از دمای ۲۵ °C به ۶ °C/۲ °C (۱۴ساعت /۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز، از ۴/۲- درجه سانتی‌گراد به ۵/۶- درجه سانتی‌گراد تا ۵/۷- درجه سانتی‌گراد در محیط کشت حاوی ۰/۱ درصد ساکارز و از ۱۴/۳- به ۱۷/۳- تا ۱۷/۵- درجه سانتی‌گراد در محیط کشت حاوی ۳ درصد ساکارز تغییر کرد (جدول شماره ۳).میزان تجمع mRNA های نمونه‌های هیبرید شده برای HmG1t4 در شکل شماره ۳ و همچنین دانسیته نسبی mRNA های شبیه به HmG1t4، HmAP1t2.2 و dhn1 در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. تجمع mRNAهای مربوط به ژن‌های مورد آزمایش در کشت‌های تحت دمای ۲۵ °C و ۶ °C/۲ °C (۱۴ساعت /۱۰ ساعت) برای مدت ۵ یا ۱۰ روز در محیط کشت مایع با غلظت نسبتا ثابت ۳٪ ساکارز (با تعویض روزانه محیط کشت)، بیشتر از کالوس‌های قرار گرفته بر روی محیط کشت جامد (با آگار) حاوی ۳٪ ساکارز (بدون تعویض روزانه) بود. بیشترین تجمع mRNA در کشت‌های قرار گرفته در دمای ۶ °C/۲ °C (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ یا ۱۰ روز در محیط کشت مایع حاوی ۳٪ ساکارز بود، که با تعویض روزانه محیط کشت، غلظت ساکارز ثابت نگه داشته شد و در نتیجه با افزایش مدت زمان نگهداری کشت‌ها در این دما از ۵ به ۱۰ روز تغییر قابل ملاحظه‌ای در میزان mRNA حاصل نگردید. دانسیتهmRNA های مربوط به ژن‌های مذکور در کالوس‌های کشت شده در غلظت ۰/۱ درصد ساکارز چه در دمای معمولی رشد (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و چه در دمای پایین ۶°C/۲°C (۱۴ساعت /۱۰ساعت) بسیار ناچیز بود. نتایج مربوط به هیبریداسیون RNA بدست آمده از کشت‌های انجام گرفته در غلظت‌های ۰/۱ و۳ درصد ساکارز (در دمای ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز) اختلاف زیادی را در میزان mRNA شبیه به blt63 به عنوان یک ژن شاهد در دو غلظت بکار رفته از ساکارز نشان ندادند (شکل شماره ۴).

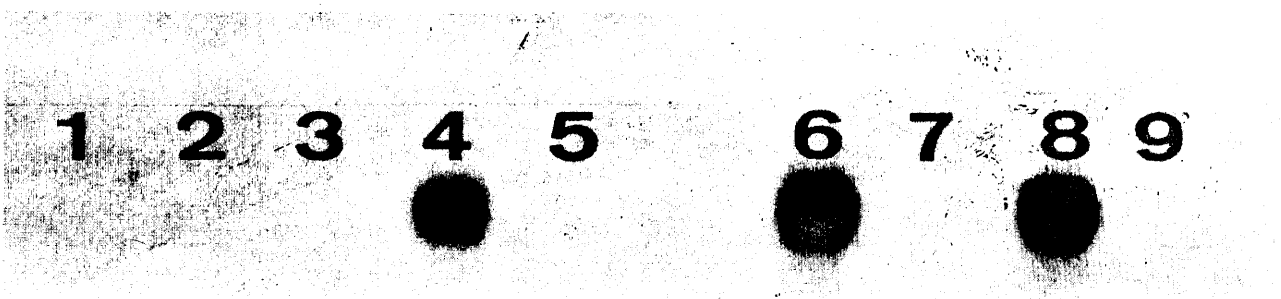
بحث

مطالعات انجام گرفته پیرامون سرماسختی در کشت‌های سلولی نشان داده‌اند که درجه حرارت‌های پایین (بالاتر از نقطه انجماد) می‌توانند مقاومت کالوس‌های جو در مقابل انجماد را افزایش دهند (۱). غلظت ساکارز نیز به طور قابل توجهی بر تحمل به یخزدگی و بیان ژن‌های القا شونده در درجه حرارت پایین حتی در دمای معمولی رشد کالوس (۲۵ درجه سانتی‌گراد) تاثیر می‌گذارد (۲). اما چگونگی تغییرات تحمل در مقابل سرما و بیان ژن هنگام افزایش ساکارز به کشت‌های سلول و کالوس قرار گرفته در دمای پایین گزارش نشده است. بنابراین، آزمایشی به منظور بررسی واکنش سلول‌های گیاه به تغییرات توام دما و غلظت ساکارز، بر روی کشت‌های سلول و کالوس جو صورت گرفت. نتایج به دست آمده افزایش تحمل به سرما را در کشت‌های انجام گرفته در هر دو غلظت ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز پس از قرار گرفتن در دمای ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) نشان می‌دهند، که بر تاثیر درجه حرارت‌های پایین بر افزایش مقاومت به سرما دلالت دارند. نکته قابل ذکر این است که غلظت ۳٪ در مقایسه با ۰/۱ درصد ساکارز، تحمل سلول‌های کشت شده در دمای ۲۵ °C و یا ۲/ °C ۶ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) را در مقابل انجماد افزایش داد. این تغییرات با افزایش تجمع mRNAهای مربوط به ژن‌های القا شونده در دماهای پایین همراه بود. همچنین، نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که تغییر دمای رشد از ۲۵ °C به ۶ °C/۲ °C (به مدت ۵ یا ۱۰ روز)

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت به سرما را به مقدار ۱/۴ تا ۱/۵ درجه سانتی‌گراد در کشت‌های صورت گرفته در غلظت ۰/۱ درصد ساکارز و به میزان ۳ تا ۳/۲ درجه سانتی‌گراد در کشت‌های رشد کرده در غلظت ۳٪ ساکارز افزایش می‌دهند،



شکل ۳- میزان تجمع mRNA در کشت کالوس و سلول جو (*Hordeum vulgare*)، در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز (S) تحت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و انتقال یافته به مدت ۵ و ۱۰ روز به دمای C ۲/۲ ˚C ۶ (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت). کلون HmGlt4 به عنوان کاوشگر در ارزیابی نورذرن مورد استفاده قرار گرفت.

محیط کشت MS بدون تعویض روزانه محیط کشت

۱- ۳S٪ ، ۲۵ درجه سانتی‌گراد

۲- ۳S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز

۳- ۳S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۱۰ روز

محیط کشت MS مایع با تعویض روزانه محیط کشت

۴- ۳S٪، ۲۵ درجه سانتی‌گراد

۵- ۰/۱S٪، ۲۵ درجه سانتی‌گراد

۶- ۳S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز

۷- ۱S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز

۸- ۳S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۱۰ روز

۹- ۱S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ ساعت /۱۰ ساعت) به مدت ۱۰ روز

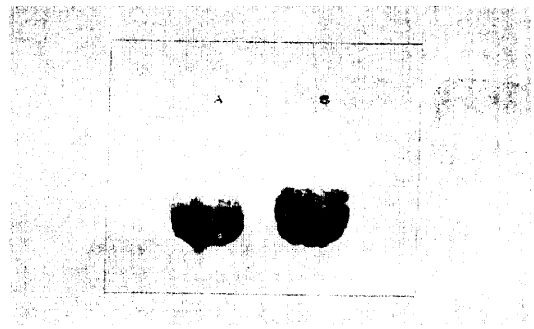
جدول ۴- داده‌های دانسیتومتری بدست آمده از نتایج ارزیابی میزان mRNA مربوط به ژن‌های خانواده nsLTPs و Dehydrins در کشت‌های سلولی کالوس جو، در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ و ۳ درصد ساکارز (S)، تحت دماهای ۲۵ ˚C و ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ به مدت ۵ ، و ۱۰ روز. داده‌های حاصل از تیمارهای مختلف نسبت به مقادیر مربوط به کالوس‌های کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز (با تعویض روزانه) و در درجه حرارت ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ برای مدت ۱۰ روز (*) تنظیم شده‌اند (دانسیته نسبی).

تیمارها	دانسیته نسبی		
	Hmglt4	HmAPlt2.2	dhn1
محیط کشت MS بدون تعویض روزانه محیط کشت			
۱- ۳S٪ ، ۲۵ درجه سانتی‌گراد	۰/۰۲	۰/۰۱	tr
۲- ۳S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز	۰/۰۲	Tr	tr
۳- ۳S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۱۰ روز	Tr	Tr	tr
محیط کشت MS مایع با تعویض روزانه محیط کشت			
۴- ۳S٪، ۲۵ درجه سانتی‌گراد	۰/۶۸	۰/۵۲	۰/۵۶
۵- ۰/۱S٪، ۲۵ درجه سانتی‌گراد	tr	Tr	tr
۶- ۳S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۷
۷- ۱S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز	tr	Tr	tr
۸- ۳S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۱۰ روز	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰
۹- ۱S٪، ۲ ˚C/۲ ˚C ۶ (ساعت ۱۰/۱۴ ساعت) به مدت ۱۰ روز	Tr	Tr	tr

tr دانسیته نسبی کمتر از ۰/۰۱

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- میزان mRNA مربوط به ژن blt63 در توده‌های سلولی جو، کشت شده در دمای ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز در محیط کشت MS مایع حاوی ۰/۱٪ (A) و یا ۳٪ (B) ساکارز.

در صورتی که افزایشی به مقدار ۱۰/۱ درجه سانتی‌گراد در تحمل سلول‌ها به یخزدگی در نتیجه افزایش غلظت ساکارز (از ۰/۱ به ۳ درصد)، حتی در دمای معمولی رشد (۲۵ درجه سانتی‌گراد) حاصل می‌گردد. بنابراین، ساکارز می‌تواند عاملی اساسی در فرایند سازگاری به سرما و افزایش مقاومت به تنش به شمار آید. بیشترین مقاومت به یخزدگی و تجمع mRNA در کشت‌های قرار گرفته در دمای ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) و در یک محیط کشت حاوی ۳٪ ساکارز (با تعویض روزانه محیط کشت به منظور ثابت نگه داشتن غلظت ساکارز) مشاهده گردید. این نتایج در موافقت با پیشنهادی است که میزان قند را از عوامل افزایش مقاومت به یخزدگی در بعضی از گیاهان دانسته است(۵۶). همچنین، دماهای پایین، که تحمل به سرما را در سلول‌ها افزایش دادند می‌توانند میزان ساکارز را در گونه‌های مناطق معتدل افزایش دهند (۶ و ۲۲). افزایش در میزان سرماسختی و تجمع mRNA در واکنش به دمای پایین همراه با غلظت بالای ساکارز می‌تواند به دلیل مصرف کم قند (به دلیل رشدکم در درجه حرارت پایین) باشد، که منجر به ذخیره بالای قند در سلول می‌گردد. در گیاهان تحمل قرار گرفته در دمای پایین نیز از مصرف مواد تولید شده طی فرایند فتوسنتز کاسته شده (۳۳) و در نتیجه ذخیره هیدرات‌های کربن به ویژه قندها در سلول افزایش می‌یابد. همچنین کلدرون و پونتیس(۱۹۸۵) (۶) افزایش آنزیم ساکارز[1] را در فاصله یک ساعت بعد از قرار گرفتن گیاهچه‌های گندم در معرض دمای پایین گزارش کرده‌اند. آنزیم فوق پس از ۱۴ روز قرار گرفتن تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت، که این امر نیز می‌تواند به دلیل میزان کمتر تخریب آنزیم در درجه حرارت‌های پایین باشد (۹). در این مطالعه بین دوره‌های مختلف سرماسختی یعنی قرار گرفتن ۵ و ۱۰ روز در دمای ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت/ ۱۰ ساعت)، اختلاف معنی‌داری از نظر تغییر در میزان تحمل سرما و تجمع mRNA ژن‌های مورد آزمایش وجود نداشت. نتایج بدست آمده از این مطالعه با پیشنهاد طبائی عقدائی و پیرس (۱۹۷۸) (۲) در مورد نقش قندها در سازگاری به سرما موافقت دارند. همچنین، مشکل تحمل پایین و بیان کمتر ژن‌های مورد بررسی در کالوس‌های کشت شده تحت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قبل از انتقال به دمای ۶ °C/۲ °C (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت)، که در مطالعات قبلی (۱) مشاهده شده بود، در این مطالعه با تامین قند (ساکارز) و ثابت نگه داشتن غلظت آن از طریق استفاده روزانه از محیط کشت تازه برطرف گردید، و این نیز می‌تواند دلیلی بر اهمیت نقش قندها از جمله ساکارز در افزایش تحمل سلول‌های گیاه در مقابل سرما باشد. همچنین نتایج بدست آمده از این مطالعات در موافقت با پیشنهاد رودولف و کرو (۱۹۸۵) (۳۷) مبنی بر نقش قندهای محلول در پایداری غشاهای سلولی در شرایط یخزدگی می‌باشد. تاثیر قندها در افزایش تحمل به سرما را نیز می‌توان طبق گزارش کرو و همکاران (۱۲ و ۱۳) جلوگیری از تغییر شکل و حالت[2] غشاهای سلولی دانست، که قندها با قرار گرفتن به جای مولکول‌های آب در بین مولکول‌های چربی از نزدیک شدن آنها به همدیگر جلوگیری نموده، و بدین ترتیب باعث تاخیر در تغییر حالت و ساختمان غشاها شده و در نتیجه باعث پایداری آنها می‌گردند. در نتیجه حفظ وضعیت عادی غشا از نظر ساختمان و فعالیت آن، انجام مبادلات از طریق غشاها از جمله جریان کلسیم به درون سلول و سیتوپلاسم ادامه می‌یابد، که در حالت غیر عادی به ویژه در اثر کمبود آب ناشی از تنش‌های محیطی در غشای سیتوپلاسمی، جریان فوق متوقف می‌گردد (۱۰ و۱۱).

بنابراین، با در نظر گرفتن نقش قندها در تسهیل جریان کلسیم به داخل سلول و نیز کمک به تحمل شرایط نامساعد (۲۴ و ۳۵) و در موافقت با گزارش نایت و همکاران (۱۸) می‌توان لزوم افزایش کلسیم در سیتوپلاسم[3] را برای افزایش تحمل به سرما پیشنهاد نمود. گزارش‌های موجود در مورد تجمع قندهای محلول در واکنش به درجه حرارت‌های پایین (۲۲، ۳۸، ۴۰

1 . Sucrose synthase

2 . Phase transition

3 . Cytosolic calcium

www.SID.ir

Archive of SID

و ۴۸) نیز می‌تواند پیشنهاد فوق را به واقعیت نزدیکتر نمایند. در هر حال افزایش جریان کلسیم به داخل سلول با فرایند بیان ژن مرتبط می‌باشد (۱۴، ۴۹ و ۵۱). اما چگونگی تاثیر و دخالت مستقیم ساکارز در مراحلی از پدیده مذکور در جهت تغییر میزان بیان ژن و افزایش تحمل در مقابل سرما، به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. طبائی عقدائی، س. ر. ۱۳۷۹. سازگاری به سرما و بیان ژن در واکنش به سرما در کالوس جو (*Hordeum vulgare*) . مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۳۱، ص ۸۳۸-۸۷۲.

۲. طبائی عقدائی، س. ر. و آر. اس. پیرس. ۱۳۷۸. اثر ساکارز بر بیان ژنهای (Gene expression) عامل مقاومت به سرما در کشت‌های سلول و کالوس جو (*Hordeum vulgare*). مجموعه مقالات نخستین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، جلد اول، تهران، ص۳۰۷-۲۹۵.

3.Andrews, C. J. 1960. Cold hardiness of sprouting wheat by duration of hardening as affected by duration of hardening and dehardening temperature. Can. J. Plant Sci., 40:94-103.

4.Andrews, C. J. and M. K. Pomeroy, 1974. The influence of light and durnal freezing temperature on the cold hardiness of winter wheat seedlings. Canadian J. Bot., 52: 2539-2546.

5.Arondel, V. and J. C. Kader, 1990. Lipid transfer in plants. Experimentia, 46: 579-585.

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

7.Choi, D. W., B. Zhu, and T.J. Close. 1999. The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo. Theor. App1. Gen., 98: 1234-1247.

8.Close , T. J., A. A. Kortt, and P. M. Chandler, 1989. a cDNA – based comparison of dehydration – induced proteins (dehydrins) in barley and corn. Plant Mo1. Bio 1., 13: 95-108.

9. Crespi, M. D., E. J. Zabaleta, H. G. Pontis, and G. L., Saerno, 1991. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat. Plant Physiol., 96: 887-891.

10. Crowe, L. M. and J. H. Crowe, 1982. Hydration – dependent hexagonal phase lipid in a biological membrane. Archives of Biochemistry and Biophysics, 217: 582-587.

11.Crowe, J. F., L. M. Crowe and S. A. Jackson, 1983. Preservation of structural and functional – activity in lyophilized sarcoplasmic – reticulum. Archives of Biochemistry and Biophysics, 220: 447-484.

12.Crowe, J. F., L. M. Crowe and D. Chapman, 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. Science, 223: 701-703.

13.Crowe, J. f., L. M. Crowe, J. F. Carpenter and C. Aurell – Wistrom, 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. Biochem. J., 242: 1-10.

14.Datta, N. and A. R. Cashmore, 1989. Binding of a pea nuclear protein to promoters of certain photoregulated genes is modulated by phosphorylation. Plant Cell, 1: 1069-1077.

15.Dexter, S. T. 1993. Effect of Several environmental factors on the hardening of pltnts. Plant Physiol., 8:123-129.

16.Dunn, M. A., A. Morris, L. J. Peter and M. A. Hughes, 1993. A low – temperature – responsive translation elongation factor 1a from barley (Hordeum vulgare L.). Plant Mol. Biol., 23: 221-225.

17.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 proteins of wall barley (*Hordeum murinum* L.) differing in low temperature adaptation. J. Exp. Bot., 46: 67.

18. Knight , H., A. J. Trawavas and M. R., Knight, 1992. Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. Plant Cell, 8: 489-503.

19.Koch, K. E. 1996. Carbohydrate – modulated gene expression in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 47: 509-540.

www.SID.ir

Archive of SID

20. Komatsu, A. Y. Takanokura, T. Morguchi, M. Omura and T. Akihama, 1999. Differential expression of three sucrose – phosphate synthase isoforms during sucrose acclimation in citrus (Citrus unshiu Marc). Plant Physiol, 140 (2): 169-178.
21. Leborgne, N., C. Teulieres, S. Travert, M. P. Rols, J. Teissie and A. M. Baudet, 1995. Introduction of specific carbohydrates into Eucalyptus gunnii cells increases their freezing tolerance. European J. Biochem., 229: 710-717.
22. 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.
23. Levitt, J. 1956. The hardiness of plants, Academic Press, New York.
24. Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. 2nd ed., Vol. 1, Academic Press, New York.
25. Maniatis, T., E. F. Fritch , and J Sambrook, 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
26. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
27. Pearce, R. S. and I. McDonald, 1978. The independent assessment of frost hardiness of excised lamineae, excised roots and trimmed tillers of tall fescue (Festuca arundinacea). J. Appl. Ecol., 15: 885-895.
28. Pearce, R. S. 1980. Relative hardiness to freezing of laminae, roots and tillers of tall fescue. New Phytol., 84: 449-463.
29. Pearce, R. S., M. A. Dunn, and M. A. Hughes, 1993. Molecular biology of cold tolerance. In: Jackson, M. B. and C. R. Black, eds, Interacting stresses on Plants in a changing climate, NATO ASI Series 1: Global Environmental Change, Vol. 16, Springer – Verlag, Berlin, pp 681-695.
30. 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. Igri) Plants grown in different environments. Plant Cell Environ., 19: 275-290.
31. Pearce, R. S., C. E. Houlston, K. M. Atherton, J. E. Rixon, P. Harrison, M. a. Hughes, and M. A. Dunn. 1998. Localisation of expression of three cold –induced genes (blt101, blt4.9 , blt14) in different tissues of the crown and developing leaves of cold – acclimated cultivated barley (*Hordeum Vulgare* L. cv. Igri). Plant Physiology, 117: 787-795.
32. Pearce, R. S. (1999) Molecular analysis of acclimation to cold. Plant Growth Regulation, 29: 47-76.
33. Pollock, C. J. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. New Phyto 1., 104: 1-24.
34. Pomeroy, M. K. and D. Siminovitch, 1970. Seasonal biochemical changes in the living bark and needles of red pine (Pinus resinosa) in relation to adaptation to freezing. Can. J. Bot., 48: 953-967.
35. Prochia, A. C., D. F. Fiol, G. L. Saleron; 1999. Differential synthesis of sucrose and trehalose in Euglena gracilis cells during growth and salt stress. Plant Sci., 149: 43-49.
36. Robertson, A. J., A. Weninger, R. W. Wilen, P. Fu, and L. V. Gusta, 1994. Comparison of dehydring gene expression and freezing tolerance in Bromus inermis and Secale cereale grown in controlled environments, hydroponics, and the field. Plant Physiol., 16: 171-179.
37. Rudolph, A. S. and J. H. Crowe, 1985 Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiology, 22: 367-377.
38. Sakai, A and W. Larcher, 1987. Frost survival of plants: Responses and adaptation of freezing stress. Springer – Verlag, Berlin.
39. Sambrook, J., E. F. Fritch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

www.SID.ir

Archive of SID

40.Sasaki, H., K. Ichimura, and M. Oda, 1996. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabage seedlings. Annals of Bot., 78: 365-369.
41.Steponkus, P. L., M. Uemura, and M. S. Webb, 1993. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat: Two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In: Steponkus, P. L. ed. Advances in low – temperature biology, vol. 2, JAI Press LTD, London, pp 211-312.
42.Stushnoff, C. R. L. Remmele Jr., V. Essensee, and M. McNeil, 1993. Low temperature induced biochemical mechanisms: Implications for cold acclimation and deacclimation. In: Jackson, M. B. and C. R. Black, eds, Interacting stresses on plants in a changing climate, NATO ASI Series 1: Global Environmental Change, Vol. 16, Springer – Verlag, New York, pp 647-657.
43. Tabaei–Aghdaei, S. R., 1997. Studies of stress responses in gramineae (Poaceae) using biotechnological methods. PhD thesis, New castle Univ., UK.
44.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 Environ., 23: 561-571.
45.Tanino, K. K. and B. D. McKersie, 1985. Injury within the crown of winter wheat seedlings after freezing and icing stress. Can. J. Bot., 63: 432-436.
46.Trunova, T. I. 1982. Mechanisms of winter wheat hardening at low temperature. In: Li, P.H. and A. Sakai, eds. Plant Cold hardiness and freezing stress, Vol. 2, Academic Press, New York, pp 41-54.
47.Tysdal, H. M. 1933. Influence of light, temperature and soil moisture on the hardening process in alfalfa. J. Agric. Res., 46:483-515.
48.Vagujfalvi, I., I. Kerespi, G. Galiba, T. Tischner, and J. Sutka, 1999. Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. Plant Sci., 144 (2): 85-92.
49.Van der Luit, A. H., C. Olivari, A. Haley, M. r. night and A. J. Trewavas , 1999. Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. Plant Physiol., 121 (3): 705-714.
50.Van Zee, K., F. Q. Chen, P. M. Hayes, T. J. Close , and T. H. H. Chen, 1995. Cold Specific induction of adehydring gene family member in barley. Plant Physiol., 108: 1233-1239.
51.Veluthambi, K. and B. W. Pooviah, 1984. Calcium – promoted protein phosphorylation in plants. Science, 223: 167-169.
52.Wadsworth, G. J., M. G. Redinbagh, 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.
53.White, A. J., M. A. Dunn and M. A. Hughes. 1994. Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley. J. Exp. Bot., 45: 1885-1892.
54.Winters, A. L. J. H. H. Williams, D. S. Thomas and C. J. ollock, 1994. Changes in gene – expression in response to sucrose accumulation in leaf tissue of Lolium temulentum L., New Phyto 1., 128: 591-600.
55.Yamada,M. 1992.Lipid transfer proteins in plants and microorganisms.Plant and Cell Physiol.,33:1-64.
56.Yoshida, S. and A. Sakai, 1967. The frost hardening process of woody plants. XII. Relation between frost resistance and various substances in stem bark of black locust trees. Low Temperature. Scince, Series B. Biological Sciences, 25: 29-44.
57. Yu, S. M. 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. Plant Physiol., 121(3): 687-693.

www.SID.ir

Archive of SID

Combined Effects of Low Positive Temperature and Sucrose Concentration on Cold Hardening and Expression of Cold – Inducible Genes in Cell and Callus Cultures of Barley (*Hordeum vulgare* L.)

S. R. TABAEI-AGHDAEI
Assistant Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.
Accepted Jan.10, 2001

SUMMARY

The purpose of this work was to examine changes in expression of cold – inducible genes and frost hardiness as cell responses to combinations of sucrose and low positive temperatures. Barley calli induced from immature embryos were grown in an MS based medium without agar at 25°C. The cultures were then subcultured into the same medium but containing. 0.1 or 3% sucrose, and exposed to 6°/2°C (10/14h) for either 5 or 10 days. Following frost test, Cold hardiness was determined either by assessment of survival or estimated by electrolyte leakage test (cell damage). Total RNA was extracted from control as well as treated calli and Northern blotting was performed to examine the mRNA levels of HmGlt4, HmAPlt2,2 and dhn1. The results showed the effect of low temperature (6°/2°C) in increasing cold hardening. Also, 3% sucrose improved the freezing tolerance in both control and cold treated cultures as compared to 0.1%. This was accompanied by accumulation of transcripts from the tested cold-inducible genes. Also, The enhancement of freezing tolerance and gene expression, as a result of increase in sucrose concentration (from 0.1 to 3%) even at non–inductive temperature (25°C) was much higher than that resulted from changing growth temperature from 25°C to 6°/2°C. Thus, sugar concentration could be the critical factor during cold acclimation rather than temperature.

Key words: Cold hardiness, Gene exprssion, Sucrose concentration, Cold-inducible genes, mRNA accumulation, Northern blotting, Callus.

www.SID.ir