ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
صفحه ۸۴- ۷۷

خصوصیات فنوتیپی و الگوی بیان ژنهای *FRY1* و *GST1* در گیاهان موتانت سبز آرابیدوپسیس تحت تنش سرما

Phenotype characterizations and *FRY1* and *GST1* gene expression levels in response to cold stress in green mutant plant of *Arabidopsis*

علی مبارکی[۱]، رضا شیرزادیان‌خرم‌آباد*[۱]، بابک ربیعی[۱]، محمدمهدی سوهانی[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استادیاران، دانشیار، دانشگاه گیلان

Mobaraki M[1], Shirzadian-Khorramabad R*[1], Rabiei B[1], Sohani MM[1]

1. MSc Student, Assistant Professor, Associate Professor, University of Guilan, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: R.Shirzadian@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳۰)

چکیده

سرما یکی از تنش‌های غیرزیستی و محدود کننده‌ی رشد گیاهان می‌باشد. گیاهان برای سازگاری به سرما از فرایندهای پیچیده فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده می‌کنند. شناسایی این مکانیسم‌ها جهت دست یابی به ارقام سازگار با سرما ضروری می‌باشد. در این تحقیق خصوصیات فنوتیپی و فیزیولوژیکی و الگوی بیان ژن-های *FRY1* و *GST1* در گیاهچه‌های موتانت سبز با گیاهچه‌های وحشی در شرایط تنش سرما مقایسه شد. گیاهچه‌ها به‌مدت ۱۷ روز با شرایط طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۳ °C رشد یافته و سپس تا رسیدن به رشد نهایی و بذر دهی در شرایط طول روز ۱۶ ساعت و دمای ۴ °C نگهداری شده و از نظر صفات طول ساقه اصلی، وزن تر شاخساره، وزن تر ریشه و طول دوره رشدی ارزیابی شدند. داده‌های بدست‌آمده در قالب طرح آزمایشی مناسب و با نرم‌افزار SAS تجزیه شد. نتایج بیانگر افزایش طول دوره رشد و کاهش عملکرد و افزایش حساسیت به سرما در گیاهچه‌های جهش‌یافته نسبت به گیاهچه‌های وحشی L*er*-0 بود. ژن *FIERY1* (*FRY1*) از جمله ژن‌هایی است که نقش مهمی در فرایند تنظیم واکنش گیاهان تحت تنش سرما و تنظیم واکنش گیاهان برعلیه تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. *GST1* یک ژن نشانگر در تنش اکسیداتیو بوده و بیان آن در شرایط تنش اکسیداتیو بالا می‌رود. جهت اندازه‌گیری الگوی بیان ژن‌های *FRY1* و *GST1* پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، میزان بیان نسبی ژن‌های فوق با استفاده از روش Real Time RT-PCR اندازه‌گیری شد. بیان ژن‌های *GST1* و *FRY1* در گیاهچه‌های جهش‌یافته با کاهش قابل توجهی همراه بود. بنابراین ممکن است کاهش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی در گیاهان موتانت موجب افزایش حساسیت این گیاهان به تنش سرما شده است.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
تنش سرما
موتانت آرابیدوپسیس
FRY1
GST1

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

رشد و بقا گیاهان عموما تحت تاثیر تنش‌های محیطی چون خشکی، شوری، درجه حرارت تغییر می‌کند. سرما بعنوان یکی از تنش‌های محیطی در گسترش جغرافیایی گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گیاهان از مکانیسم‌های متعدد فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی جهت سازگاری به سرما استفاده می‌کنند (Rahaii et al. 2010). این مکانیسم‌ها نه‌تنها به طول دوره تنش بستگی دارد، بلکه به مرحله نموی و پارامترهای مورفولوژیکی- آناتومیکی گیاه در زمان تنش نیز وابسته است (Achard et al. 2008). شناسایی و بررسی عملکرد ژن‌های القا شونده با تنش[1] که در فرایند تنظیم تحمل گیاه به تنش‌های محیطی موثر است، در شناخت بیولوژی مولکولی و به‌نژادی گیاهان زراعی و رسیدن به تولید پایدار از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ژن (*FRY1*) *FIERY1* نقش مهمی در تنظیم واکنش گیاهان برعلیه تنش‌های محیطی از قبیل تنش شوری، خشکی و تنش سرما دارد. ژن *FRY1* رمز کننده یک آنزیم با دو کارکرد شامل ۳، ۲ و ۵ بیس فسفات نوکلئوتیداز[2] و اینوزیتول پلی فسفات ۱- فسفاتاز[3] می‌باشد (Xiong et al. 2004). *FRY1* از جمله ژن‌های موثر بر بیان ژن‌های تنظیم‌کننده رونویسی واکنش به سرما در گیاه آرابیدوپسیس به‌شمار می‌رود. مطلب فوق با بررسی میزان بیان ژن‌های *CBF*[4] در گیاهان موتانت *hos2*[5] و وحشی *FRY1/HOS2* به اثبات رسیده‌است (Xiong et al. 2004).

پروتئین GST1[6] یکی از اعضای خانواده آنزیم‌های چند عملکردی[7] می‌باشد که اتصال تری‌پپتیدی (*γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-L-glycine*) را به مولکول‌های الکترون‌دوست کاتالیز می‌کنند. در مجموع وظیفه اصلی پروتیین‌های GST سم‌زدایی سلول به‌وسیله تخریب عوامل سمی درونی و بیرونی است تا جایی که القای بیان *GSTs* در گیاهان مختلف به محض ایجاد خسارت و همچنین در واکنش به تیمار اُزن، پرکسید هیدروژن، گلوتاتیون، آفات زنده، هورمون‌های گیاهی، فلزات سنگین، شوک حرارتی، خشکی، زخم و پیری گزارش شده‌است. نقش حیاتی پروتئین‌های GST به وسیله حضور گسترده آنها در سلول‌های یوکاریوت و پروکاریوت نشان داده شده است (Edwards et al. 2000). اعضای خانواده ژنی *GST* در واکنش به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به صورت انفرادی و متفاوت از هم تنظیم می‌شوند. این موضوع بر نقش‌های متفاوت آن‌ها در متابولیسم‌های درونی گیاه اشاره دارد (Maxwell et al. 1999). *GST1* از جمله اعضای مهم این خانواده محسوب می‌شود که افزایش فعالیت آن در واکنش به تنش اکسیداتیو به اثبات رسیده است (Love et al. 2005).

گیاهان موتانت سبز[8] *sgm164* (*Stay green Mutant 164*) از یک جمعیت موتانت های EMS[9] در آرابیدوپسیس شناسایی و انتخاب شد (Shirzadian-Khoramabad et al. 2010). بر اساس بررسی‌های انجام شده موتاسیون مذکور یک صفت منوهیبرید و مغلوب است. موقعیت مکانی موتاسیون فوق در ژنوم آرابیدوپسیس با استفاده از روش MAP-Based Cloning (Jander et al. 2002) و با بهره‌گیری از مارکرهای ملکولی SSLP[10]، CAPS[11] و SNP[12] در قسمت پایین و انتهایی کروموزوم شماره ۵ گیاه آرابیدوپسیس و در لینکاژ با ژن *FRY1* که یک ژن کلیدی در واکنش به تنش های محیطی در آرابیدوپسیس محسوب می‌شود مکان‌یابی شد. فنوتیپ پیری برگ در گیاهان موتانت که تحت تیمار تنش اتیلن قرار گرفته‌اند به نحو معنی داری در مقایسه با گیاهان وحشی Landsberg *erecta* (L*er*-0) به تاخیر افتاد. لذا به این گیاهان موتانت سبز اطلاق شد. احتمالا وقوع موتاسیون در یکی از ژن‌های کنترل کننده پیری در آرابیدوپسیس موجب تاخیر روند پیری در برگهای گیاهان موتانت شده است (Shirzadian-Khoramabad et al. 2010). در این تحقیق برخی خصوصیات فنوتیپی از قبیل وزن تر

[1] Stress-induced genes
[2] 3'(2') 5'-bisphosphate nucleotidase
[3] Inositol polyphosphate 1-phosphatase
[4] C-repeat binding factors
[5] High expression of osmotic stress-regulated gene expression2
[6] Glutathione S-transferases1
[7] Multiple function
[8] Stay green mutant plants
[9] Ethyl methanesulfonate
[10] Simple sequence length polymorphism
[11] Cleaved amplified polymorphic sequences
[12] Single nucleotide polymorphism

Archive of SID
www.SID.ir

کل، وزن تر شاخساره، وزن تر ریشه و .... و همچنین میزان بیان نسبی ژن‌های *GST1* *FRY1* در گیاهان موتانت سبز در واکنش به تنش سرما بررسی و با گیاهان وحشی (*Ler*-0) مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۹۱ انجام شد. جهت رشد و نمو آرابیدوپسیس در شرایط کنترل شده، بذور آرابیدوپسیس در خاک مناسب کشت و بعد از ۳ روز نگه‌داری در تاریکی و دمای ۴ ºC به شرایط طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۲ ºC در اتاقک رشد منتقل شده و به‌مدت ۱۷ روز در این شرایط نگهداری شدند. به‌منظور بررسی فنوتیپی گیاهان موتانت سبز (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010) و وحشی *Ler*-0 تحت تنش سرما، گیاهچه‌ها به شرایط دمای ۴ ºC و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی انتقال و تا رسیدن به مرحله‌ی پایانی رشد در این شرایط نگهداری شدند و مدت زمان لازم جهت کامل شدن مراحل مختلف رشدی بر اساس روش تجزیه مورفولوژیکی آرابیدوپسیس بر مبنای مراحل رشد (Boyes et al. 2001) (جدول۱) تعیین و اندازه‌گیری شد. خصوصیات ظاهری و مورفولوژیکی گیاهان مورد بررسی در هر یک از مراحل مختلف رشدی مطابق با مقاله فوق اعمال شد. در طول مدت رشد گیاهچه‌ها در شرایط تیمار سرما، خصوصیات فنوتیپی گیاهچه‌ها از قبیل وزن تر شاخساره، وزن تر ریشه، طول ساقه گل‌دهنده و طول دوره رشد، در سه نوبت ۱۸، ۶۵ و ۱۰۷ روز بعد از تیمار سرما در سه تکرار بررسی شد. تجزیه داده‌های آزمایشی به‌صورت اسپلیت پلات در زمان بر پایه طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SAS 9 و Excel 2010 انجام شد. جهت مطالعه میزان بیان ژن‌های مورد نظر در زمان‌های صفر، ۳ و ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار سرما (۴ ºC) از برگهای گیاهچه‌ها نمونه‌گیری شد و سپس جهت استخراج RNA از نمونه‌ها از کیت RNX-plus ™ (سینا ژن) استفاده شد. نسخه-های تک‌رشته‌ای cDNA با استفاده از 200U RevertAid H-minus MMuLV transcriptase (Fermentase) و یک آغازگر الیگو dT ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی مطابق (جدول۲) جهت انجام Real Time RT-PCR با استفاده از نرم‌افزار PerlPrimer v.1.1.10 طراحی و جهت ساخت توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) سفارش داده شد. هر واکنش تکثیر Real Time حاوی ۲۵ µl بود و حاوی ۱۲/۵ µl Master MIX (SYBG Green Fermentase)، ۲ µl از cDNA و مقدار ۲ µl از آغازگرهای اختصاصی ژنهای *FRY1* (*AT5G63980*) *GST1* (*AT1G02930*) و *ACTIN2* (*AT3G1878*) و مابقی آن آب دوبار تقطیر بود. از ژن رفرنس *ACTIN2* جهت نرمال‌سازی داده-ها استفاده شد. جهت تجزیه و نرمال‌سازی داده‌ها و رسم گراف-ها از نرم افزار genex 2004 متعلق به شرکت BIORAD (USA) استفاده شد. دستگاه مورد استفاده جهت انجام واکنش تکثیر CFX96-BIORAD (USA) مورد استفاده قرار گرفت. برنامه PCR در این واکنش‌ها به‌صورت وارشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه در چرخه اول و سپس در ۴۰ چرخه بعدی وارشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و مرحله طویل شدن در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۵ ثانیه انجام شد. سپس منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- کد بندی مراحل مختلف رشد (Boyes et al. 2001)

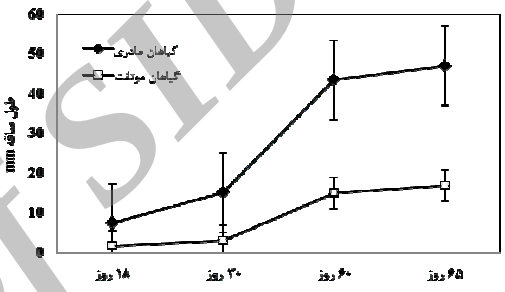
کد رشد	مشخصات
1.00	باز شدن کامل کوتیلدون‌ها
3.20	حجم روزت به ۲۰ درصد از حجم نهایی رسیده باشد.
5.10	اولین غنچه‌ی گل قابل دیدن باشد.
6	رشد غنچه‌ی گل
6.00	باز شدن اولین گل
6.10	۱۰ درصد از گل‌های تولیدی باز شده‌باشند.
6.90	گل‌دهی کامل شده باشد.
8	اولین غلاف باز شود.

نتایج و بحث

تجزیه داده‌های به‌دست آمده از مقایسه طول ساقه اصلی گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی *Ler*-0 که به‌مدت ۱۷ روز در دمای ۲۳ ºC و طول روز ۱۶ ساعت و سپس به مدت ۶۵ روز در دمای ۴ ºC نگه‌داری شدند نشان داد که طول ساقه اصلی

Archive of SID
www.SID.ir

ژنوتیپ جهش‌یافته نسبت به ژنوتیپ وحشی L*er*-0 به طور معنی‌داری در مراحل مختلف رشد کاهش‌یافته است. تفاوت طول ساقه اصلی گیاهان وحشی L*er*-0 با گیاهان موتانت با افزایش دوره رشد و نمو و سن گیاهان ادامه و افزایش می‌یابد. به‌طوری که اختلاف طول ساقه اصلی گیاهان وحشی L*er*-0 با گیاهان موتانت بعد از ۶۰ و ۶۵ روز به میزان ۳۲ میلی‌متر رسید (شکل۱ و ۲) (جدول تجزیه واریانس به‌علت محدودیت فضای مقاله نشان داده نشده است). روند کاهشی اندازه طول ساقه و سرعت رشد در گیاهان موتانت نشان‌دهنده حساسیت بیشتر این گیاهان به تنش سرما است.



شکل۱- مقایسه طول ساقه گل‌دهنده در زمان‌های مختلف تحت تنش تنش سرما در آرابیدوپسیس

شکل۲- فنوتیپ گیاه L*er*-0 و موتانت بعد از ۶۵ روز تیمار سرما ۴ °C

بررسی وزن‌تر گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی (L*er*-0) با توجه به این‌که گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی L*er*-0 از لحاظ طول ساقه تفاوت معنی‌دار داشتند و نتایج آزمایش قبلی نیز حاکی از کاهش رشد گیاهچه‌های جهش‌یافته از لحاظ طول‌ساقه می‌باشند، لذا جهت بررسی اثر موتاسیون بر میزان وزن گیاه، گیاهچه‌های رشدیافته در شرایط تنش سرمای ۴ °C در زمان‌های ۱۸ ، ۶۵ و ۱۰۷ روز پس از اعمال تیمار سرما برای ۳ صفت وزن‌تر کل گیاهچه‌ها، وزن تر شاخساره و وزن تر ریشه ارزیابی و با گیاهچه‌های وحشی L*er*-0 که فاقد موتاسیون نقطه‌ای *sgm164* هستند مقایسه شدند.

با افزایش سن گیاهان، وزن‌تر کل در گیاهچه‌های هر دو ژنوتیپ با شیب مناسبی افزایش یافت، ولی همواره مقدار وزن‌تر کل در ژنوتیپ وحشی (L*er*- 0) از گیاهان موتانت بیشتر است (شکل۳-الف) (جدول۳). به نحوی که میانگین وزن‌تر گیاهچه‌های وحشی L*er*-0 در زمان ۶۵ روز با میانگین وزن‌تر گیاهچه‌های موتانت در زمان ۱۰۷ روز (۱۵۰۰ میلی‌گرم) برابر بود. داده‌های جدول۴ نشان می‌دهد که صفت وزن تر کل دارای اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد برای متغیر ژنوتیپ است. همچنین صفت فوق اختلاف معنی داری در سطح یک درصد را برای متغیر زمان نمونه‌برداری نشان می‌دهد. نتیجه فوق اثبات می‌کند که موتاسیون نقطه‌ای مذکور در گیاهچه‌های جهش‌یافته موجب کاهش عملکرد وزنی این گیاهچه‌ها در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی L*er*-0 تحت تنش سرما می‌شود. این نتایج با مطالعات انجام شده که به بررسی فنوتیپ موتاسیون *hos2* تحت تنش سرما پرداخته‌اند، مطابقت دارد (Xiong et al. 2004).

وزن تر شاخساره در گیاهان وحشی L*er*-0 و موتانت با افزایش سن گیاه بطور چشمگیری افزایش می‌یابد (شکل۳-ب). این در حالی‌است که بین وزن تر شاخساره ژنوتیپ های مورد بررسی شامل گیاهان وحشی L*er*-0 و گیاهان موتانت در بازه‌های زمانی مختلف اختلاف چشمگیر و معنی‌داری وجود دارد (جدول۴). به‌طوری که متوسط وزن شاخساره گیاهان وحشی L*er*-0 بعد از ۱۰۷ روز به میزان ۱۲۰۰ میلی‌گرم رسید، ولی وزن شاخساره گیاهان موتانت در سن مشابه حدود ۶۰۰ میلی‌گرم به این معنی که وزن تر شاخساره گیاهان موتانت در سن ۱۰۷ روزگی نصف وزن تر شاخساره گیاهان وحشی L*er*-0 است. بنابراین فعالیت سیستم‌های سنتز کننده مواد غذایی در گیاهان موتانت به نحو قابل توجهی دچار کاهش شده است. لذا با توجه به کاهش چشمگیر وزن شاخساره گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان وحشی در تنش سرما اعمال شده می‌توان موضوع حساسیت قابل توجه گیاهان موتانت به تنش سرما مجددا مورد تایید قرار می‌گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این آزمایش

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (°C)
FIERY1-Forward	۵′-ATGGCACTAAAGGATTTCTGA-۳′	۲۵۹	۶۱/۱۸
FIERY1-Reverse	۵′-GAGATACACAACTCTTAGGACT-۳′		۵۸/۱۹
GST1-Forward	۵′-CAGCCACTAGAAGAGTTCTCAT-۳′	۱۵۲	۶۰/۰۷
GST1-Reverse	۵′-GGAAACTTCTACCTCTGAAGTTC-۳′		۵۹/۹۸
ACTIN2-Forward	۵′-TCTCCGCTTTGAATTGTCTC-۳′	۱۶۴	۵۸/۶۳
ACTIN2-Rewerse	۵′-TATGAGCTTGGAAAGAAAGAG-۳′		۵۸/۶

جدول ۳- تجزیه واریانس بررسی وزن‌تر کل در گیاهچه‌های جهش یافته و وحشی (*Ler-0*) تحت تیمار سرمای ۴ °C در زمان‌های مختلف

منبع تغییر	درجه آزادی	SS	MS	F
تکرار	۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۴	۰/۰۶^{ns}
ژنوتیپ	۱	۱/۰۱۴	۱/۰۱۴	۱۳/۹۶*
تکرار× ژنوتیپ	۲	۰/۱۰۴	۰/۰۵	۰/۷۲^{ns}
زمان	۲	۷/۸۲	۳/۹۱	۵۳/۸۱**
ژنوتیپ × زمان	۲	۰/۲۸	۰/۱۴	۱/۹۹^{ns}
تکرار × زمان	۴	۰/۰۸۶	۰/۰۲۱	۰/۳^{ns}
خطای آزمایش	۴	۰/۲۹	۰/۰۷۲	
کل	۱۷	۹/۶۱		

ns، * و ** به‌ترتیب عدم تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطوح پنج درصد و یک درصد.

جدول ۴- تجزیه واریانس بررسی وزن‌تر شاخساره در گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی (*Ler-0*) تحت تیمار سرمای ۴ °C در زمان‌های مختلف

منبع تغییر	درجه آزادی	SS	MS	F
تکرار	۲	۰/۰۰۳۶	۰/۰۰۱	۰/۱^{ns}
ژنوتیپ	۱	۰/۳۲	۰/۳۲	۱۸/۹*
تکرار× ژنوتیپ	۲	۰/۰۲۲	۰/۰۱۱	۰/۶۵^{ns}
زمان	۲	۲/۴۹	۱/۲۴	۷۱/۹۳**
ژنوتیپ × زمان	۲	۰/۱۹	۰/۰۹۸	۵/۶۶*
تکرار × زمان	۴	۰/۰۳	۰/۰۰۷	۰/۴۳^{ns}
خطای آزمایش	۴	۰/۰۶۹	۰/۰۱۷	
کل	۱۷	۳/۱۴		

ns، * و ** به‌ترتیب عدم تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطوح پنج درصد و یک درصد.

مقایسه گیاهچه‌ها از لحاظ وزن‌تر ریشه روند تغییرات در رشد وزن‌تر ریشه نیز همانند الگوی وزن‌تر کل و وزن‌تر شاخساره می‌باشد و میزان وزن‌تر ریشه همواره در گیاهچه‌های موتانت کمتر از وزن‌تر ریشه‌ی گیاهچه‌های وحشی *Ler-0* می‌باشد (شکل۳-ج) (جدول۵). این در حالی‌است که بین وزن تر ریشه ژنوتیپ‌های مورد بررسی شامل گیاهان وحشی *Ler-0* و گیاهان موتانت در بازه‌های زمانی مختلف اختلاف چشمگیر و معنی-داری وجود دارد (جدول۵). بنابراین وقوع موتاسیون موجب کاهش توسعه و رشد ریشه و کاهش تحمل گیاهچه‌ها در مواجهه با تنش سرما شده است. لذا گسترش ریشه در زمینه استقرار مناسب گیاهان و جذب مواد غذایی سهم و اهمیت زیادی در میزان تحمل گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی دارد. احتمالا وقوع موتاسیون بطور مستقیم و یا غیر مستقیم برفعالیت ژن‌های موثر بر توسعه ریشه موثر است.

همان‌طور که در قسمت‌های (الف)، (ب) و (ج) از شکل ۳ مشاهده می‌شود، وزن‌تر ژنوتیپ وحشی (*Ler-0*) همواره بیشتر از ژنوتیپ موتانت است. ولی این روند در نمودار قسمت (د) متفاوت می‌باشد (شکل۳). بدین معنی که روند نسبت وزن‌تر شاخساره بر وزن‌تر ریشه در گیاهان جهش‌یافته در مقایسه با گیاهان وحشی *Ler-0* افزایشی است. به بیان ساده‌تر جهش موجب کاهش وزن ریشه شده و در واقع علت کاهش وزن‌تر ریشه احتمالا به‌علت کاهش میزان ریشه‌های فرعی در گیاهان موتانت است که این وضعیت در موتاسیون *ron1-1* نیز مشاهده می‌شود (Robles et al. 2010).

مقایسه نتایج بررسی فنوتیپی گیاهچه‌ها از لحاظ طول عمر و سرعت رشد و نمو در شرایط طول روز ۱۶ ساعت و دمای ۴ °C تا مرحله‌ی پایانی رشد گویای این مطلب است که الگوی رشدی گیاهچه‌های جهش یافته بر اساس تجزیه مرفولوژیکی

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۵- تجزیه واریانس بررسی وزن‌تر ریشه در گیاهچه‌های جهش یافته و وحشی (L*er*-0) تحت تیمار سرمای ۴ ^{o}C در زمان‌های مختلف

منبع تغییر	درجه آزادی	SS	MS	F
تکرار	۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۲	۰/۱۱^{ns}
ژنوتیپ	۱	۰/۲۰	۰/۲۰	۹/۲۵*
تکرار×ژنوتیپ	۲	۰/۰۳۵	۰/۰۱۷	۰/۷۹^{ns}
زمان	۲	۱/۴۷	۰/۷۳	۳۲/۴۲**
ژنوتیپ × زمان	۲	۰/۰۳	۰/۰۱۵	۰/۶۶^{ns}
تکرار×زمان	۴	۰/۰۲۲	۰/۰۰۵	۰/۲۵^{ns}
خطای آزمایش	۴	۰/۰۹	۰/۰۲۲	
کل	۱۷	۱/۸۶		

ns، * و ** به‌ترتیب عدم تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطوح پنج درصد و یک درصد.

آرابیدوپسیس بر مبنای مراحل رشد (Boyes et al. 2001) نسبت به گیاهچه‌های وحشی L*er*-0 متفاوت است. همان گونه که در شکل۴ مشاهده می‌شود سرعت رشد گیاهچه‌های جهش‌یافته نسبت به گیاهچه‌های وحشی کمتر بوده، به‌نحوی که گیاهچه‌های جهش‌یافته برای کامل کردن مراحل نمو به زمان بیشتری نیاز دارند (شکل۴). مرحله‌ی گل‌دهی گیاهچه‌های جهش‌یافته ۱۸ - روز دیرتر رخ می‌دهد و مجموعا گیاهچه‌های جهش‌یافته ۳۵ روز نسبت به گیاهچه‌های وحشی جوان‌تر هستند. با توجه به این‌که گیاهان موتانت در شرایط طول روز ۱۶ ساعت و دمای ^{o}C ۲۲ و تحت تنش اتیلن از ژنوتیپ L*er*-0 جوان‌تر بوده و روند رشد و توسعه در این گیاهان کندتر است (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010)، لذا موتاسیون نقطه‌ای *sgm164* در ژنی رخ داده که تغییر فعالیت آن در اثر موتاسیون موجب کندی رشد و افزایش حساسیت گیاهان موتانت به شرایط تنش سرما شده‌است (شکل۴). روند مشابهی در زمینه کاهش رشد و نمو و حساسیت بیشتر گیاهان موتانت *hos2* که حاوی یک موتاسیون نقطه ای در*FRY1* به تنش سرما رخ داد (Xiong et al. 2004).

بررسی میزان نسبی بیان ژنهای *FRY1* و *GST1* با استفاده از روش QPCR[1] با توجه به این‌که ژن *FRY1* از جمله ژن‌های واکنش‌گر به تنش می‌باشد و تغییر میزان بیان و فعالیت آن در گیاهان موتانت بر واکنش گیاهان به تنش‌های محیطی بطور چشمگیری موثر است (Xiong et al. 2004). تغییر در میزان بیان فعالیت این ژن موجب تغییر میزان بیان طیف گسترده‌ای از ژن-های واکنش‌گر به تنش‌های سرما از قبیل *CBFs* (Xiong et al. 2004) می‌شود. لذا میزان بیان این ژن در گیاهچه‌های وحشی L*er*-0 و موتانت در شرایط نرمال و زمان‌های مختلف پس از تیمار سرما مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان این ژن در گیاهان موتانت در زمان شاهد و ۱۲ ساعت پس از تیمار سرما از کاهش چشمگیری در مقایسه با گیاهان وحشی برخوردار است. همچنین بعد از گذشت ۷ روز تیمار سرما میزان بیان آن در گیاهچه‌های وحشی L*er*-0 به میزان دو برابر بیشتر از گیاهچه-های جهش‌یافته رسید (داده‌ها نشان داده نشده) که این میزان در مقایسه با میزان بیان ژن قبل از اعمال تیمار سرما بسیار بیشتر بود (شکل۵). لذا بیان ژن *FRY1* در زمان‌های مختلف تیمار سرما با تغییرات قابل توجهی همراه بود. این مطلب با نتایج تحقیقات انجام شده که گویای فعالیت پروتئین FRY1 در واکنش‌های کوتاه مدت و بلند مدت گیاه به تنش سرما است (Xiong et al. 2004) است.

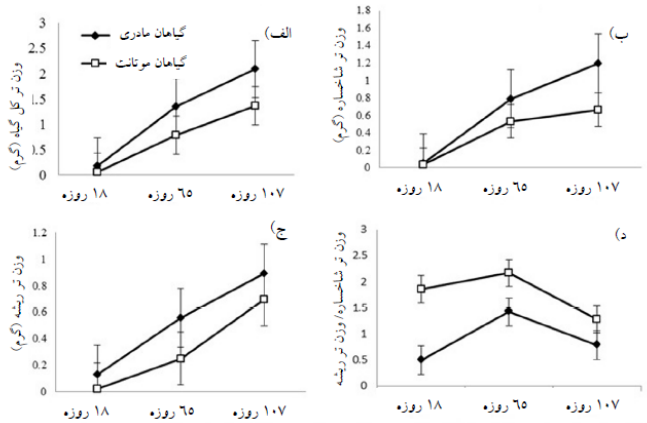
نتایج مقایسه بیان ژن *GST1* در زمان‌های یاد شده به روشنی بیانگر تاثیر موتاسیون *sgm164* بر میزان بیان ژن *GST1* است (شکل ۶). به نحوی که در زمان شاهد میزان بیان ژن *GST1* در ژنوتیپ وحشی L*er*-0 به میزان ۱۲ برابر مقدار آن در گیاهان موتانت بود. بیان این ژن در نمونه‌های وحشی در دیگر ساعات پس از تیمار سرما شامل ۳ و ۱۲ ساعت بطور قابل توجهی در مقایسه با نمونه‌های موتانت بیشتر بوده است. با توجه به این نکته که ژن *GST1* از جمله ژن‌های نشانگر در تنش اکسیداتیو است، لذا موتاسیون نقطه‌ای سبب کاهش تنش اکسیداتیو در شرایط نرمال و تنش سرما در گیاهان موتانت شده است. (شکل۶).

نتیجه‌گیری

بررسی داده‌های بدست آمده نشان می‌دهد که حساسیت گیاهان جهش‌یافته تحت تنش سرما در مقایسه با گیاهان وحشی L*er*-0 افزایش یافته است. لذا موتاسیون نقطه‌ای *sgm164* بر میزان سازگاری گیاهان موتانت به سرما اثر منفی داشته است. میزان بیان ژن *FRY1* تحت تیمار سرما همواره با تغییرات چشمگیری

[1] Quantitative real time PCR

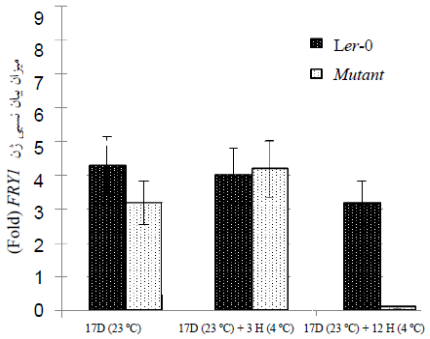
Archive of SID
www.SID.ir



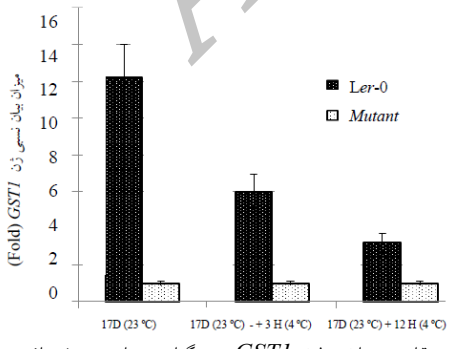
شکل۳- مقایسه ۳ صفت مرفولوژیکی گیاهچه ها در روزهای بعد از تیمار سرما الف) وزن تر کل گیاهچه؛ ب) وزن تر شاخساره گیاهچه؛ ج) وزن تر ریشه‌ی گیاهچه و د) نسبت وزن تر شاخساره گیاهچه به وزن تر ریشه. محور افقی تعداد روزهای بعد از اعمال تیمار سرما در گیاهچه‌های ۱۷ روزه را نشان می‌دهد. تعداد تکرار در هر نمونه برداری ۴ می باشد.

شکل۴- مقایسه مدت زمان طی شده در مراحل رشد و نمو از کد رشدی (1.00 تا 8.00) در شرایط طول روز ۱۶ ساعت و دمای ۴ ° C؛ عددهای داخل مستطیل‌ها نشان‌دهنده‌ی تعداد روز طی‌شده مرحله است (جدول۴). ارزیابی فوق بر اساس روش آنالیز مرفولوژیکی آرابیدوپسیس بر مبنای مراحل رشد (Boyes et al. 2001) بررسی شد. تعداد تکرار برای هر نمونه در هر کد رشدی ۴ بوده است.

همراه بوده است. این تغییر در بیان ژن *FRY1* نشان‌دهنده اهمیت این ژن در واکنش‌های کوتاه مدت و بلند مدت گیاه به تنش سرما است. تاثیر جهش نقطه‌ای فوق در کلیه زمان‌های بعد از تیمار سرما و نیز قبل از تیمار سرما سبب کاهش بیان ژن *FRY1* در گیاهچه جهش‌یافته شد. همچنین بعد از گذشت ۷ روز از تیمار سرما، میزان بیان آن در گیاهچه‌های موتانت به میزان دو برابر در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی L*er*-0 کاهش یافت. این میزان در مقایسه با میزان اختلاف بیان این ژن در دوره قبل از اعمال تیمار سرما بسیار بیشتر و قابل توجه‌تر بود (شکل ۵). لذا وقوع جهش نقطه‌ای در گیاهان موتانت موجب کاهش میزان بیان ژن *FRY1* و احتمالا از جمله دلایل موثر بر افزایش حساسیت گیاه، کاهش طول ساقه اصلی، کاهش وزن‌تر کل، افزایش طول دوره رشد و کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهان جهش یافته می‌باشد. نتایج مقایسه‌ای بیان ژن *GST1* در زمان‌های یاد شده به روشنی بیانگر اثر موتاسیون بر میزان بیان ژن *GST1* بود. به نحوی که در زمان صفر میزان بیان ژن *GST1* در ژنوتیپ



شکل ۵- مقایسه بیان ژن *FRY1* در گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی L*er*-0 در نمونه های شاهدکه به‌مدت ۱۷ روز در دمای ۲۳ ° C نگهداری و سپس در زمان‌های مختلف تحت تیمار ۴ °C سرما؛ H) ساعت؛ D) روز.



شکل ۶- مقایسه بیان ژن *GST1* در گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی L*er*-0 در نمونه های شاهدکه به‌مدت ۱۷ روز در دمای ۲۳ ° C نگهداری و سپس در زمان‌های مختلف تحت تیمار ۴ °C سرما؛ H) ساعت؛ D) روز.

Archive of SID
www.SID.ir

وحشی L*er*-0 به میزان ۱۲ برابر موتانت بود. با توجه به این نکته که ژن *GST1* یک ژن نشانگر تنش اکسیداتیو است (Love et al. 2005)، لذا وجود موتاسیون باعث کاهش تنش اکسیداتیو در شرایط نرمال و تنش سرما در گیاهان موتانت شده است. مضافا اینکه در تیمارهای سرما میزان بیان ژن *GST1* در گیاهان وحشی L*er*-0 در مقایسه با گیاهان موتانت افزایش یافته است (شکل۶). کاهش بیان ژن *GST1* نشان می‌دهد که موتاسیون نقطه‌ای فوق سبب کاهش سطح عوامل اکسیداتیو در گیاه شده‌است. از آنجایی‌که کاهش میزان عوامل اکسیداتیو موجب کاهش فعالیت آبشار کینازی MAPK می‌شود (Kovtun et al. 2000) و کاهش فعالیت این آبشار کینازی موجب کاهش بیان ژن‌های دخیل در سازگاری گیاه به تنش‌ها می‌شود (Teige et al. 2004). لذا احتمال دارد تحت تنش سرما، گیاه آرابیدوپسیس با افزایش بیان ژن *FRY1* موجب افزایش عوامل اکسیداتیو و سپس فعال شدن آبشار کینازی MAPK و در نهایت فعال شدن ژن‌های دخیل در ایجاد سازگاری شده و از این طریق موجب افزایش مقاومت گیاه به تنش سرما شود.

منابع

Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P (2008) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. Plant Cell 20: 2117-2129.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCASKILL AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth stage–based phenotypic analysis of Arabidopsis a model for high throughput functional genomics in plants. Plant Cell 13:1499-1510.

Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000) Plant glutathione-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends in Plant Science 5: 193-198.

Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 2940-2945.

Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL (2002) Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era. Plant Physiology 129: 440-450.

Love AJ, BW Yun, V Laval, GJ Loake, JJ Milner (2005) Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. Plant Physiology 139: 935-948.

Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96:8271-8276.

Robles P, Fleury D, Candela H, Cnops G, Alonso-Peral MM, Anami S, Falcone A, Caldana C, Willmitzer L, Ponce MR, Lijsebettens MV, Micol JL (2010) The RON1/FRY1/SAL1 gene is required for leaf morphogenesis and venation patterning in Arabidopsis. Plant Physiology 152: 1357-1372.

Shirzadian-Khorramabad R, Jing HC, Hille J, Dijkwel PP (2010) Identification of *Arabidopsis* stay-green mutants with a functional ethylene-response pathway. In: Agronomy Society of New Zealand Special Publication No. l3 / Grassland Research and Practice Series No. 14, McGill and Rowarth ed., pp. 119-129.

Rahaii M, Naghavi M, Alizade H, Malbobi MA, Abdmishani S, Shang P (2010) Assessment of the MYB gens exprtion modle in wheat (*Triticum aestivum* L.) in short time stress of salinity and cold using quantitative RT- PCR approach. Iranian Journal of Field Crop Science 41: 433-446 (In Farsi).

Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. Molecular Cell 15: 141-152.

Xiong L, Lee H, Huang R, Zhu JK (2004) A single amino acid substitution in the Arabidopsis FIERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance. Plant Journal 40: 536-545.

Archive of SID

www.SID.ir