

بررسی بیان ژن *ein2* در گیاه اطلسی (*Petunia×hybrida*) و مطالعه نقش تنظیم‌کنندگی آن در مسیر انتقال پیام اتیلن

امین میرشمسی کاخکی^{۱*}، احمدرضا بهرامی^۲، فرج‌ا... شهریاری احمدی^۱ و جولی‌گری^۳

^۱ مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

^۲ مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۳ انگلستان، دانشگاه شفیلد، گروه بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۸

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۱۶

چکیده

هورمون گیاهی اتیلن طیف گسترده‌ای از فرایندهای گیاهی را نظیر رشد، جوانه‌زنی بذور، گلدهی، ریزش اندامها، تشکیل ریشه‌های جانبی، توسعه بافت برگ، رسیدگی میوه و پیری بافت برگ بعد از لقاح را تنظیم می‌کند. پیری بافت گل یکی از فرایندهای تکاملی است که اتیلن در آن نقش کلیدی بازی می‌کند. افزایش کلیماکتریک مقادیر درون‌زاد اتیلن در گلهای، یک نقش تنظیمی در حوادث متعاقب منجر به مرگ در برخی بافتهای زایشی دارا می‌باشد. تغییر در پاسخ دهی به اتیلن در زمان تکوین گیاه، عمدتاً با تغییر در مسیر انتقال پیام میانجی‌گری می‌گردد، که بخش اصلی مجموعه حوادث منجر به پیری بافت زایشی را شامل می‌شود. موتاسیون غیر کارکردی *ein2* عدم حساسیت به اتیلن را در مطالعات اخیر نشان داده که این امر بیانگر نقش ضروری *ein2* در مسیر انتقال پیام اتیلن است. از آنجایی که *ein2* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت نقشی محوری در مسیر انتقال پیام اتیلن ایفاء می‌کند، در مطالعه حاضر الگوی بیان این ژن در بافتهای رویشی و زایشی گیاه اطلسی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز بیان ژن نشان داد که رونوشتهای *ein2* در بافتهای مختلف گیاهی حضور داشته، و بیشترین سطح بیان ژن در خامه+کلاله و تخمدان قابل مشاهده است. همچنین آنالیز بیان ژن با هدف بررسی نقش فاکتورهای مانند گرده‌افشانی، قندها، اسید آسبیزیک، ACC در مسیر بیوسنتز و انتقال پیام اتیلن در اطلسی انجام شد. نتایج نشان داد که قند گلوکز یک نقش مهم در تنظیم فرآیند پیری مرتبط با اتیلن در بافت گل بازی می‌کند. در مجموع نتایج نشان‌دهنده این واقعیت است که *ein2* در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک در زمان تکوین گیاه نقش اساسی داشته و با برخی تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر ABA دارای اثرات متقابل می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *ein2*، اتیلن، پیری بافت گل، گرده افشانی، مسیر انتقال پیام.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۰-۰۵۱۱۸۷۹۵۶۱۶۰، پست الکترونیکی: mirshamsi@ferdowsi.um.ac.ir

مقدمه

گرده‌افشانی در گیاهان کلیماکتریک یک افزایش سریع در سنتز اتیلن مشاهده می‌شود که بسیاری از فرایندهای مرتبط با پیری و مرگ سلولی را در گیاهان هماهنگ می‌کند (۷). مطالعه بسیاری از گونه‌های گیاهی نشان داده که مسیر بیوسنتز، دریافت و انتقال پیام اتیلن کاملاً محافظت شده بوده و با واسطه سازوکارهای تنظیمی مناسب در طول

اتیلن یک مولکول دوکربنی ساده گازی است که در بسیاری از جنبه‌های تکوینی و رشد گیاه دخالت دارد (۲). پیری بافت گل فرآیندی است که اتیلن نقش کلیدی در آن ایفاء می‌کند. در بسیاری از محصولات با ارزش به لحاظ اقتصادی، سنتز اتیلن در پاسخ به تنشهای مختلف و فرایندهای تکوینی القاء می‌شود. همچنین در زمان

احتمالاً پروتئینهای MAPKK، SIMKK، MAPK و MAPK6 و ... را درگیر می‌کند (۳۴). با این حال بررسیهای اخیر نشان داده که موتانت‌های MPK6، نقص قابل‌سنجش در مسیر انتقال پیام اتیلن بروز نمی‌دهند که این موضوع احتمالاً ناشی از کارکرد موازی سایر اجزا مسیر انتقال پیام می‌باشد. مطالعات قبلی نیز به نقش کلیدی ACC به‌عنوان سیگنال احتمالی اولیه در آغاز فرآیند پیری اشاره کرده‌اند (۴۹، ۵۰ و ۵۱).

اعتقاد بر این است که آبخار MAPK به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم، پروتئین غشایی EIN2 را فعال می‌کند (۳۴). پروتئین EIN2 دارای یک ناحیه N ترمینال هیدروفوب می‌باشد که دارای ۱۲ هلیکس بین‌غشایی با همولوژی به خانواده پروتئینی NRAMP می‌باشد. بخش C ترمینال پروتئین ein2، (به جز یک موتیف Coiled-coil) کاملاً منحصر به فرد بوده و هیدروفیلیک می‌باشد، که نشان‌دهنده محلول بودن و سیتوزولی بودن آن می‌باشد. علاوه بر این به نظر می‌رسد این ناحیه در اثرات متقابل پروتئین-پروتئین در سایر ارگانوسمها نیز نقش دارد (۳). البته تا به امروز ژن ein2 از گیاهان آرابیدوپسیس (۳)، برنج (۲۵)، اطلسی (۳۷)، توتون (میرشمسی و همکاران، مقاله در دست چاپ)، و ذرت (۱۵) جداسازی شده است. کارکرد ein2 در انتقال پیام اتیلن کاملاً شناخته شده نیست. تنها از طریق مقایسات انجام شده با پروتئینهای NRAMP چنین فرض شده است که ناحیه درون‌غشایی پروتئین EIN2 به‌عنوان یک ترانسپورتر کاتیونهای دو ظرفیتی عمل می‌کند (۳). با این حال، تا به امروز خصوصیات مبنی بر اتصال به کاتیونهای فلزی یا ویژگی انتقال یونهای فلزی در این پروتئین شناخته نشده است. موتانت‌های نول ein2 غیرحساس به اتیلن بوده، درحالی‌که موتانت‌هایی که ناحیه C ترمینال ein2 در آنها بیش بیان شده بود، پاسخ سه‌گانه دائم به اتیلن نشان دادند (۳ و ۲۰). این داده‌ها نشان می‌دهد که ein2 انتقال پیام اتیلن را موجب شده و تنها زمانی فعال است که اتیلن به رسپتورهای اتیلن باند شده باشد (۳). ناحیه N ترمینال و

چرخه زندگی گیاه به دقت تنظیم می‌شوند. تا به امروز بررسیها نشان داده که عوامل مختلفی دارای نقش تنظیمی روی فرآیند پیری القاء شده توسط اتیلن می‌باشند. با این حال اگرچه وجود این نقش تنظیمی اثبات شده است اما سازوکار عمل این فاکتورها در فرآیند پیری در بافت گلبرگ یا اندامهای زایشی گل به‌ویژه بعد از گرده‌افشانی مورد مطالعه قرار نگرفته و هنوز به درستی روشن نشده است. بررسی و مطالعات مولکولی اخیر منجر به شناسایی و درک سازوکار تنظیم تعدادی از ژنهای درگیر در واکنش‌های متقابل بین اتیلن با مسیر انتقال پیام سایر هورمونها و فاکتورهایی نظیر قندها، ABA (۵، ۱۶، ۱۷، ۳۲ و ۳۶)، اکسین (۶، ۴۲ و ۵۲)، سیتوکینین (۹، ۱۱ و ۴۳) و نور (۵۵) گردیده است.

مطالعات ژنتیکی موتانت‌های آرابیدوپسیس به‌ویژه مطالعات اپستازی نشان داده که رسپتورهای *etr1* *etr2* *ein4*، به همراه همولوگ آنها یعنی *ers1* *ers2* بالادست ژن *ctr1* و بعکس *ein2*، *ein3*، *ein5* و *ein6* در پایین دست مسیر انتقال پیام و ژن *ctr1* عمل می‌کنند (۴۱). آنالیز دقیق این موتانت‌ها، به علاوه جداسازی و تعیین خصوصیات برخی ژنهای مربوطه در حال حاضر یک دید کلی از ماهیت پیچیده مسیر انتقال پیام اتیلن در گیاهان فراهم نموده است. عقیده بر این است که رسپتورهای اتیلن در یک مسیر پیچیده مسیر انتقال پیام با *ctr1* به‌عنوان یک کایناز احتمالی در ارتباط می‌باشد (۱۹). به نظر می‌رسد فعالیت کاینازی *ctr1* مربوط به ناحیه C ترمینال پروتئین بوده که با سرین/ترئونین پروتئین کاینازهای خانواده پروتئینی Raf تشابه دارد (۲۶). مشابه نقشی که Raf کاینازها در پستانداران دارد، *ctr1* احتمالاً یک MAP کایناز کایناز (MAPKKK) بوده و مهار سیگنال اتیلن احتمالاً از طریق یک آبخار MAPK و MAPKK پیچیده صورت می‌گیرد (۲۶ و ۳۰). شواهد اخیر نشان داده که تیمار با پیش ماده اتیلن (ACC) منجر به تحریک آبخار MAPK در آرابیدوپسیس و فعال شدن *ctr1* می‌گردد. این آبخار

بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک خصوصاً گلدهی و پیری را نشان می‌دهد (۱۲ و ۳۶ و ۳۹ و ۵۶). شواهد موجود نشان‌دهنده نقش تنظیم‌کنندگی گلوکز به‌عنوان یک آنتاگونیست در مسیر بیوسنتز و انتقال پیام اتیلن می‌باشد (۲۲ و ۵۶). با این حال تقریباً تداخل عمل اجزای پایین‌دست مسیر انتقال پیام گلوکز ناشناخته می‌باشد.

کاربرد خارجی قندها به طور قابل توجهی فرآیند پیری را در گل‌هایی که فرآیند پیری در آنها حساس به اتیلن است، کند می‌کند و به تأخیر می‌اندازد (۴۴ و ۴۵). در گل میخک، تغذیه گیاه با قند اثر کاربرد اتیلن خارجی را کاهش داد (۲۸). بخشی از چنین تأثیراتی احتمالاً ناشی از مهار سنتز اتیلن در گلبرگ‌ها به دنبال تیمار با قندها می‌باشد. در گل‌های میخک، ساکارز افزایش فراوانی mRNA تقریباً تمام ژن‌های مرتبط با پیری را با تأخیر همراه ساخت. حداقل بخشی از اثر قند علاوه بر مهار ژن‌های بیوسنتزی می‌تواند از طریق کاهش فراوانی mRNA ژن *eil3* و پروتئین مرتبط با آن توجیه شود (۲۱). همچنین بررسی‌ها نشان داده که وجود مقادیر بالای قند می‌تواند تجزیه فاکتورهای رونویسی *ein3* را در پروتئوزوم‌ها تشدید کند (۵۴). علاوه بر ساکارز و گلوکز، سایر قندها نظیر ترهالوز، مانیتول و انیوزیتول نیز موجب تأخیر فرآیند پیری در برخی گونه‌های گیاهی می‌شوند. مطالعات انجام شده روی لاله (۲۴)، گلابول (۴) و ۳۳ و ۵۳ تأثیر این نوع قندها را در تأخیر فرآیند پیری نشان داده است. کاربرد قندهای خارجی روی فرآیند پیری گل‌های غیرحساس به اتیلن، با تأخیر در بیان ژن‌های درگیر در جا به جایی مجدد اسیدهای چرب و پروتئین همراه می‌باشد (۱۳).

در این تحقیق سعی گردیده تا با مطالعه بیان ژن *ein2* در گیاه، نقش و اهمیت *ein2*، و عوامل احتمالی مؤثر در کنترل چندگانه هورمونی یک فرآیند فیزیولوژیک نظیر پیری و تداخل مسیرهای انتقال پیام آنها با اتیلن مورد بررسی قرار گیرد. البته نحوه بیان این ژن در بافتهای زایشی و رویشی،

ناحیه C ترمینال پروتئین *Ein2* برای کارکرد این پروتئین ضروریست. این نتایج مبین آن است که ناحیه N ترمینال پروتئین *Ein2* برای درک پیام اتیلن از اجزای بالادست مسیر انتقال پیام ضروریست. بعکس ناحیه C ترمینال برای انتقال این سیگنال به اجزای پایین‌دست مسیر انتقال پیام اتیلن ضروری و کافی است (۳). بررسی‌های انجام شده نشان داده که *ein2* از طریق یک مکانیسم ناشناخته، فاکتورهای رونویسی خانواده ژنی *ein3* را فعال می‌کند. ژن القاء شونده توسط اتیلن *erf1* به‌عنوان تنها هدف شناخته شده برای *ein3* محسوب می‌شود. دایمرهای *ein3* با یک ناحیه پالیندرومیک تکراری منحصر به فرد در پروموتور *erf1* اثر متقابل نشان می‌دهند و به صورت فعال کننده و مهار کننده رونویسی عمل می‌کنند (۴۰). مطالعه و بررسی روی موتانت‌هایی نظیر *ein2* نشان داده که مسیر انتقال پیام اتیلن احتمالاً با سایر مسیرهای انتقال پیام مرتبط با پیری نظیر اکسین (۱۴)، سیتوکینین (۱۰) و جاسمونیک اسید (۳۵)، آبسزیک اسید (۱۷) هم اثر متقابل دارد. مطالعات انجام شده روی برخی موتانت‌های آرابیدوپسیس نظیر *abi-1*، *era3-3*، *era3-1* و شناسایی آللهای موتانت *ctr-1* و *ein2* شواهدی را فراهم نموده که نشان‌دهنده وجود اثرات متقابل مسیر انتقال پیام اتیلن با ABA است (۵ و ۱۷). اگرچه نقش ABA در زمان فرآیند پیری گلبرگ در گیاهان حساس به اتیلن نیز هنوز به درستی شناخته نشده است. با این حال در مجموع به نظر می‌رسد کاربرد ABA خارجی، از طریق القاء سنتز اتیلن در ژینوسایوم عمل می‌کند (۳۱) و (۳۸). علاوه بر این شواهد به دست آمده اخیر نشان می‌دهد که سازوکارهای مرتبط با قندها، یک نقش مهم به‌ویژه در تنظیم اثرات ABA و اتیلن در زمان جوانه‌زنی بذور، رشد ریشه و فرایندهای درگیر در پیری و مرگ سلولی بازی می‌کنند (۱۶ و ۳۶).

آنالیز ژنتیکی موتانت‌های *gin* و *glo* مسیر انتقال پیام گلوکز را در آرابیدوپسیس و تداخل عمل بین مسیر انتقال پیام هورمون‌های گیاهی و گلوکز به‌عنوان یک سیگنال اولیه در

شناخت اثرات متقابل با عوامل مختلف و سازوکارهای تنظیمی احتمالی در تصمیم‌گیری و طراحی راهبرد مناسب در مراحل بعدی این مطالعه تعیین‌کننده خواهد بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: بذور اطلسی (*Petunia×hybrida*) در شرایط استاندارد گلخانه، در دمای $24/16^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) و دوره نوری $16/8^{\circ}\text{C}$ (تاریکی/نور) در جعبه‌های پلاستیکی حاوی مخلوط ۳۰ درصد پیت و پرلیت، ۳۰ درصد ماسه و ۴۰ درصد خاک غنی شده کشت داده شدند. برای تعیین الگوی بیان و مقایسه مقادیر mRNA ژن *ein2* در بخشهای مختلف رویشی و زایشی گیاه نمونه‌برداری از بافت برگ، ساقه، ریشه، بخش تحتانی گلبرگ، بخش فوقانی گلبرگ، پرچم، تخمدان، خامه/کلاله و کاسبرگ انجام شد.

گرده‌افشانی: گل‌های باز شده یک روز قبل از گرده‌افشانی اخته گردید و روز بعد کلاله به طور مصنوعی با انتقال گرده از پرچم گل گرده‌دهنده گرده‌افشانی شد. زمان گرده‌افشانی به‌عنوان صفر نمونه‌برداری برای مطالعه مقایسه‌ای تغییرات تجمعی mRNA ژن *ein2* در بافتهای گلبرگ و خامه/کلاله در گیاهان گرده‌افشانی شده و غیر گرده‌افشانی شده در نظر گرفته شد.

تیمار ACC: گل‌ها یک روز قبل از گرده‌افشانی از گیاه جدا و بلافاصله بعد از انتقال به تیوبهای حاوی ACC ($100\ \mu\text{M}$) میکرومولار، در شرایط محیطی کنترل شده (دمای $25/18^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) و $100\ \mu\text{M}$) نگهداری شدند. نمونه‌برداری از بافت گلبرگ گیاهان تحت تیمار ACC و شاهد در بازه‌های زمانی ۰، ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار با حداقل ۲ تکرار (سه گل در هر تکرار) انجام شد. برای بررسی نقش مهارکنندگی AgNO_3 از غلظت ۵۰ میکرومولار به‌عنوان کنترل در این آزمون استفاده گردید.

تیمار گلوکز: در یک آزمایش جداگانه گل‌ها در زمان گرده‌افشانی از گیاه جدا و بلافاصله به تیوبهای $1/5$ میلی‌لیتری حاوی آب مقطر یا گلوکز ۵ درصد منتقل و در شرایط محیطی کنترل شده مشابه تیمارهای فوق نگهداری شدند. آب مقطر و محلول گلوکز به صورت روزانه تعویض و محلول تازه در طول آزمایش جایگزین گردید. نمونه‌برداری از بافت گلبرگ گیاهان تحت تیمار گلوکز و گیاهان شاهد در بازه‌های زمانی ۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت بعد از تیمار انجام شد.

تیمار آبسزیک اسید (ABA): گل‌های اطلسی در مرحله گرده‌افشانی از گیاه جدا شده و بلافاصله تحت تیمار ABA ($100\ \mu\text{M}$) قرار گرفته و در بازه‌های زمانی ۰، ۲، ۴ و ۶ ساعت بعد از تیمار، نمونه‌برداری از بافت گلبرگ گیاهان تحت تیمار آبسزیک اسید انجام شد.

استخراج RNA و آنالیز کمی بیان ژن: به‌منظور بررسی الگوی بیان *ein2* به‌عنوان یک فاکتور از مسیر MAP کینازی و نقش آن در فرآیند پیری، الگوی بیان ژن *ein2* در بافتهای رویشی و زایشی و تحت تیمارهای مختلف به همراه ژنهای مسیر بیوسنتزی *acs2* و *acs4* و فاکتور رونویسی *eil1* در پایین‌دست مسیر انتقال پیام اتیلن مورد آنالیز قرار گرفت. استخراج RNA از نمونه‌های بافت برگ، ساقه، ریشه، کاسبرگ، گلبرگ (ناحیه فوقانی و تحتانی)، تخمدان، کلاله، میله پرچم، بساک در گیاه اطلسی با استفاده از کیت استخراج RNA (RNeasy Plant Mini Kit QIAGEN) انجام شد. به‌منظور جلوگیری از تکثیر احتمالی DNA ژنومی مرتبط با *ein2* در واکنش‌های شبه کمی RT-PCR، نمونه‌های RNA استخراج شده با RNase I (DNase I Free) در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند. مخلوط واکنش سپس با استفاده از فنل-کلروفرم تخلیص و با اتانل مطلق رسوب داده شد. کمیت RNA استخراج شده با استفاده از سنجش جذب نوری در طول موج $260\ \text{nm}$ اندازه‌گیری و به‌منظور تعیین خلوص

دوره‌های ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۷ و ۳۰ در تمام آزمایشات انجام شد. افزایش خطی محصول PCR تا چرخه ۲۷ در واکنشها مشاهده گردید. بنابراین در تمام آزمایشات از ۲۷ دوره در برنامه PCR استفاده شد. از کنترل داخلی *Ubi3* (مربوط به یوبیکوتین) در کمی‌سازی و مقایسات استفاده شد. همچنین از نمونه‌های RNA تیمار شده با DNaseI به‌عنوان کنترل منفی در واکنشهای PCR شبه کمی به‌منظور تأیید عدم آلودگی با DNA ژنومی استفاده گردید.

با استفاده از توالیهای ثبت شده ژن *ein2* در بانک ژن مربوط به آرآبیدوپسیس (*AtEIN2*, AF141202)، برنج (*zmEIN2*, AY359584)، ذرت (*OsEIN2*, AY396568)، گوجه‌فرنگی (*LeEIN2*, AY566238)، یک جفت آغازگر رفت و برگشت ۱۸ مری با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier v.3.5 طراحی گردید. این جفت آغازگر یک قطعه ۳۲۶ جفت بازی حدفاصل نواحی ۲۷۹۲ و ۳۱۱۷ انتهای ژن را تکثیر می‌نماید.

توالی آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده در این مطالعه برای ژنهای

<i>ein2</i> : 5'-ATTAGCAGGTCTTGGTCG-3'	و	5'-GCTCCTTCGGGACTCTAT-3'
<i>eil1</i> : 5'-AGGAAATGGGGTTCTGTG-3'	و	5'-GGTAGGACCAACTGGATTAGA-3'
<i>acs2</i> : 5'-TAACCCAAAAGCCTCCAT-3'	و	5'-AAGACCGTAGCAGCATAAAT-3'
<i>acs4</i> : 5'-CTACCGTATTCAATCCTCC-3'	و	5'-AGTTTCCAAAGTGACATCTC-3'
<i>ubi3</i> : 5'-CAGCAGAAGGAAGGGAT-3'	و	5'-ACCGCACTCAGCATTAG-3'

می‌باشد.

بروماید ۰/۵ µg/ml رنگ‌آمیزی شده و در دستگاه عکس‌برداری از ژل مورد بررسی قرار گرفتند. کمی‌سازی محصولات PCR به وسیله آنالیز دیجیتال تصاویر و براساس شدت باندهای تکثیر شده روی ژل آگارز با استفاده از نرم‌افزار (Total lab software Phoretix, 1.10) انجام شد.

نتایج

مقایسه بیان ژن *ein2* در بافتهای مختلف اطلسی: مقایسه بیان ژن *ein2* با استفاده از روش RT-PCR شبه کمی در

آن از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد بافر TBE (0.5×) و ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد.

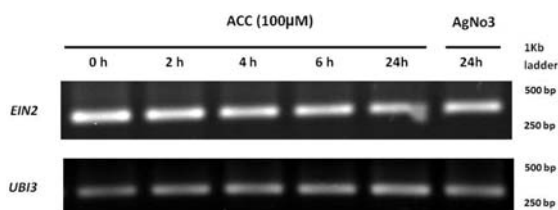
با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس M-MuLV، رشته cDNA در واکنشهای ۲۰ میکرولیتری با ترکیب ۲ میکروگرم RNA کل نمونه‌های گیاهی، ۱۰۰ پیکومول Oligo (dT)₁₈، ۲ میکرولیتر dNTP mix ۱۰ میلی مولار (غلظت نهایی ۱ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر (۲۰ واحد) بازدارنده RNase، ۲۰۰ واحد آنزیم M-MuLV و ۴ میکرولیتر بافر واکنش (۵×) و آب مقطر دیونیزه تا حجم ۲۰ میکرولیتر ساخته شد. واکنشهای PCR در دستگاه ترموسایکلر بیومترا مدل Personal، در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مقادیر موازنه شده از مخلوط واکنش ساخت رشته اول cDNA به هر واکنش PCR وارد شد. برای آنکه شدت باند تکثیر شده در هر واکنش PCR متناسب با مقدار الگوی وارد شده به واکنش باشد، این واکنشها قبل از پایان مرحله تصاعدی تکثیر خاتمه داده شدند. به‌منظور یافتن تعداد دوره مناسب برای تکثیر خطی، واکنشهای PCR با

توالی آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده در این مطالعه برای ژنهای

دنا تورا سیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه برای دوره اول و در دوره‌های دوم به بعد به مدت ۱ دقیقه، دمای مرحله اتصال آغازگر با توجه به نوع آغازگرها انتخاب شد و زمان اتصال در تمام چرخه‌ها ۱ دقیقه در نظر گرفته شد، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۵ ثانیه و در دوره آخر به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات واکنش PCR تکثیر اختصاصی قطعات DNA مورد نظر را در ژل آگارز ۱/۲ درصد و بافر ۰/۵× TBE، با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. قطعات DNA تفکیک شده در ژل آگارز در محلول اتیدیوم

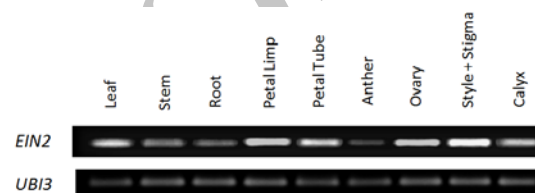
تغییر بیان ژن *ein2* به صورت بافت-اختصاصی با عمل کرده افشانی: در این بررسی نقش گرده افشانی به‌عنوان یک عامل مهم در فرآیندهای تکاملی و خصوصاً پیری بافت زایشی، در تغییر میزان بیان ژن *ein2* مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۲). نتایج نشان داد که بیان ژن *ein2* در بافت گلبرگ ۲۴ ساعت بعد از گرده افشانی اختلاف قابل توجهی با گیاهان گرده افشانی نشده نشان نداد. با این حال، تغییرات بیان ژن *ein2* در بافت خامه+کلاله کاملاً چشمگیر بود، به طوری که بعد از گرده افشانی میزان بیان ژن در خامه+کلاله کاهش پیدا کرد (شکل ۲).

نتایج بررسی تغییرات بیان فاکتور رونویسی *eil1* نیز به‌عنوان یکی از همولوگهای خانواده ژنی *ein3* نشان داد که تجمع سطوح mRNA ژن *eil1* ۲۴ ساعت بعد از گرده افشانی در بافت گلبرگ اطلسی در مقایسه با گیاهان گرده افشانی نشده افزایش یافت (شکل ۲). هر چند سطح بیان این ژن در بافت خامه/کلاله نیز افزایش نشان داد، ولی این میزان افزایش چندان قابل توجه نبود. علاوه بر این، گرده افشانی موجب افزایش بیان ژن *acs2* در خامه/کلاله گردید، با این حال تغییرات جدی در بافت گلبرگ مشاهده نگردید (شکل ۲). از طرفی نتایج نشان داد که برخلاف نقش گرده افشانی در تنظیم بیان ژن *ein2* در گل‌های اطلسی، سطح بیان *ein2* تحت تأثیر کاربرد خارجی تیمار با ACC (۱۰۰ میکرومولار) و $AgNO_3$ (۵۰ میکرومولار) قرار نمی‌گیرد (شکل ۳).

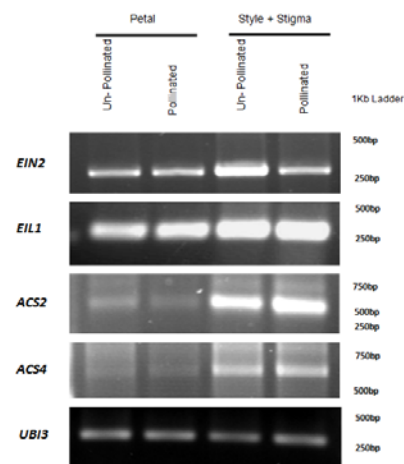


شکل ۳- مقایسه بیان ژن *ein2* تحت تیمار ACC (۱۰۰ میکرومولار) و $AgNO_3$ (۵۰ میکرومولار) در زمانهای ۰، ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار (ردیف پایین نمایانگر باند حاصل از بیان ژن *ubi3* به‌عنوان شاهد استفاده مساوی از mRNA ها در RT-PCR است).

بافت‌های زایشی و رویشی اطلسی حضور مقادیر مختلف mRNA ژن *ein2* را در سطوح مختلف در این بافتها تأیید نمود (شکل ۱). به طور کلی نتایج حکایت از تجمع بالاتر مقادیر این ژن در بافت‌های زایشی نسبت به بخش‌های رویشی نظیر برگ، ساقه و ریشه داشت. بررسی و مقایسه بیان ژن *ein2* در بافت‌های مختلف گل نیز حکایت از سطوح بیان بالاتر mRNA ژن *ein2* در ژینوسیوم (شامل خامه، کلاله و تخمدان) نسبت به سایر بافت‌های گل اطلسی داشت. در بین بافت‌های زایشی میزان تجمع نسخه‌های mRNA ژن *ein2* در پرچم در مقایسه با سایر بافت‌های زایشی کمترین بیان را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه الگوی بیان ژن *ein2* در بافت‌های رویشی و زایشی اطلسی در مرحله گرده‌افشانی (ردیف پایین نمایانگر باند حاصل از بیان ژن *UBI3* به‌عنوان شاهد و استفاده مساوی از mRNA ها در RT-PCR است).



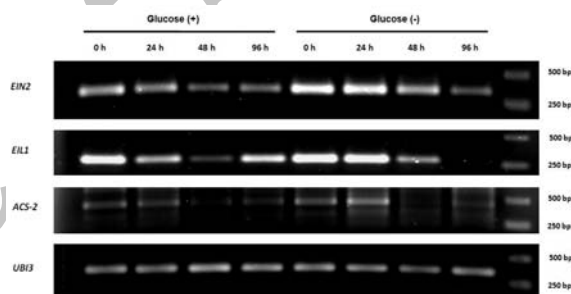
شکل ۲- تغییر بیان ژنهای *ein2*، *eil1*، *acs2* و *acs4* در بافت گلبرگ و خامه/کلاله ۲۴ ساعت بعد از گرده‌افشانی

حاصل از بیان ژن *ubi3* به‌عنوان شاهد استفاده مساوی از mRNA ها در RT-PCR است).

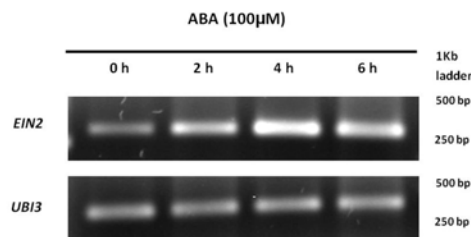
این امر که آیا گلوکز می‌تواند نقش تنظیم‌کننده‌ای در مسیر بیوسنتز اتیلن در گیاه اطلسی داشته باشد نیز با بررسی بیان ژن *acs2* مورد مطالعه قرار گرفت. در گلبرگ گل‌های تیمار شده با گلوکز بیان ژن *acs2* ۲۴ ساعت بعد از تیمار در مقایسه با شاهد کاهش یافت. اختلاف قابل توجهی در الگو و سطح بیان ژن *acs2* در سایر بازه‌های زمانی در گل‌های تیمار شده با گلوکز در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده نگردید. میزان بیان ژن *acs2* تقریباً ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار به حداقل خود رسید و متعاقب آن دوباره در ۹۶ ساعت بعد از تیمار، در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده یک پیک کوچک نشان داد. در گل‌های شاهد، بالاترین سطح تجمع mRNA ژن *acs2* ۲۴ ساعت بعد از تیمار روی داد که مطابق با زمان گرده افشانی گل می‌باشد. بعکس به دنبال تیمار گلها با گلوکز ۵ درصد، یک افت در میزان تجمع نسخه‌های *acs2* در گلبرگ در مقایسه با کنترل مشاهده شد. با این حال، اختلاف قابل توجهی در سطح mRNA ژن *acs2* در گلبرگ‌های گرده افشانی شده در زمانهای ۴۸ و ۹۶ ساعت دیده نشد (شکل ۴).

به دنبال تیمار گلها با گلوکز ۵ درصد، تغییرات جدی در سطح و الگوی بیان فاکتور رونویسی *eil1* در گلبرگ‌ها مشاهده شد (شکل ۴). به نظر می‌رسد کاهش موقت در سطح بیان ژن *eil1* در گلبرگ‌ها به دنبال تیمار گلوکز، به طور مثبت با سطح تجمع نسخه‌های *acs2* و *ein2* رابطه دارد. علاوه‌براین الگوی بیان ژن *eil1* به وسیله تیمار گلوکز تحت تأثیر قرار گرفت. برخلاف کاهش آهسته و تدریجی بیان در گیاهان شاهد، میزان بیان این ژن به سرعت تا ۴۸ ساعت در گیاهان تحت تیمار کاهش یافت و ۹۶ ساعت بعد از تیمار دوباره افزایش نشان داد. افزایش سریع ثانویه در میزان بیان ژن *eil1* منجر به تغییر در پیک تجمع mRNA و تغییر الگوی بیان به ۹۶ ساعت بعد از تیمار

نقش گلوکز و ABA در تنظیم بیان ژن‌های مسیرهای انتقال پیام و بیوسنتز اتیلن: تیمار بافت‌های زایشی اطلسی با گلوکز منجر به کاهش سریع در بیان ژن *ein2* ۲۴ ساعت بعد از تیمار گردید (شکل ۴). میزان بیان ژن *ein2* تقریباً ۴۸ ساعت بعد از تیمار با گلوکز به حداقل میزان خود رسیده و سطح بیان ژن در یک سطح پایین در تمام طول مدت تیمار باقی ماند. با این حال، میزان mRNA مربوط به ژن *ein2* در گلبرگ گل‌هایی که تنها با آب مقطر تیمار شده بودند به طور قابل توجهی بالاتر از گل‌های تیمار شده بود. علاوه‌براین یک رابطه مثبت بین سطح mRNA ژن *ein2* و کاهش تولید اتیلن بعد از گرده افشانی (میزان بیان *acs2*) در گلبرگ‌های تیمار شده با گلوکز مشاهده گردید.



شکل ۴- مقایسه بیان ژن‌های *ein2*، *eil1* و *acs2* در سطح mRNA (با روش RT-PCR) در بافت گلبرگ تیمار شده با آب و گلوکز ۵٪ در زمانهای ۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت بعد از تیمار (ردیف پایین نمایانگر باند حاصل از بیان ژن *UBI3* به‌عنوان شاهد استفاده مساوی از mRNA ها در RT-PCR است).



شکل ۵- مقایسه بیان ژن *ein2* در سطح mRNA (به روش RT-PCR) در گلبرگ‌های تحت تیمار ABA (۱۰۰ میکرومولار) در زمانهای ۰ (شاهد)، ۲، ۴ و ۶ ساعت بعد از تیمار (ردیف پایین نمایانگر باند

گل‌های بالغ و نابالغ بیشتر از سایر بافتهای مورد مطالعه است (۲۵). احتمالاً اختلاف سطح بیان ژن *ein2* بین بافتهای زایشی و رویشی با نقش آن به‌عنوان یک جزء از مسیر انتقال پیام اتیلن در تکامل بافت گل ارتباط نزدیکی دارد.

گرده افشانی به‌عنوان یک عامل مهم در فرآیندهای پیری، موجب الگوی تغییر بیان متفاوت ژن *ein2* در بافتهای زایشی گردید. احتمالاً کاهش سطوح mRNA ژن *ein2* بعد از گرده افشانی در بافت خامه+کلاله نشان‌دهنده وجود یک فیدبک مهار کننده در تنظیم بیان *ein2* باشد. همچنین به نظر می‌رسد سطح بیان تقریباً مشابه فاکتور رونویسی *eil1* قبل و بعد از گرده افشانی در بافت خامه+کلاله، وجود یک ازوکار تنظیمی پس از ترجمه وابسته به پروتئوزوم را برای این ژن پیشنهاد می‌کند. افزایش سطح mRNA ژن *acs2* در بافت خامه+کلاله بعد از گرده افشانی نیز با توجه به اینکه یکک ثانویه تولید اتیلن در گیاه اطلسی ۲۴ ساعت بعد از گرده افشانی است، قابل انتظار می‌باشد. هر چند میزان بیان *acs4* در بافت خامه/کلاله بیشتر از گلبرگ بود، اما با این حال به نظر می‌رسد که بیان این ایزوفورم ACC سنتتاز با گرده افشانی حداقل در ۲۴ ساعت بعد از گرده افشانی تنظیم نمی‌شود. از طرفی برخی یافته‌ها در آراییدوپسیس نشان داده که *acs4* به طور اختصاصی به وسیله اکسین القاء شده که توجیه کننده نتایج فوق است (۱).

با این حال نتایج کاربرد خارجی تیمار با ACC نشان‌دهنده این واقعیت است که بیان *ein2* به طور مستقیم با ACC تنظیم نشده، بلکه این تنظیم از طریق اتیلن کلیماکتریک تولید شده و به صورت بافت اختصاصی تنظیم می‌شود. فرآیند پیری گل خصوصاً برای گرده افشانی موفق و به دنبال آن تشکیل بذر در گونه‌هایی که فرآیند پیری بافت زایشی حساس به اتیلن است، حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین، احتمالاً این نحوه تنظیم و الگوی بیان می‌تواند حکایت از وجود یک سیستم تنظیم حساسیت به اتیلن در

گردید. اگرچه میزان mRNA ژن *eil1* در گلبرگ گیاهان شاهد نیز در طول زمان کاهش نشان داد و الگوی آن تا ۴۸ ساعت مشابه گلبرگهای تیمار شده بود، اما با این حال، کاهش در میزان mRNA در گیاهان شاهد نسبت به گیاهان تحت تیمار بسیار آهسته‌تر بود. به بیان دیگر، در گلبرگهای تیمار شده با گلوکز نسخه‌های *eil1*، در ۴۸ ساعت بعد از تیمار بعد از کاهش شدید اولیه به حداقل میزان خود رسید. بعکس، در گیاهان شاهد حداقل میزان بیان *eil1* در ۹۶ ساعت مشاهده شد (شکل ۴).

علاوه‌براین، بررسی نقش مهار کننده گلوکز از طریق بیوستز ABA روی مسیر انتقال پیام و کاهش حساسیت به اتیلن، افزایش تدریجی رونوشت‌های ژن *ein2* بعد از تیمار با ABA را نشان داد (شکل ۵).

بحث

به‌طورکلی نتایج مقایسه بیان ژن *ein2* در بافتهای زایشی و رویشی اطلسی حکایت از تجمع بالاتر مقادیر این ژن در بافتهای زایشی نسبت به بخشهای رویشی نظیر برگ، ساقه، ریشه داشت. میزان بیان بالای این ژن به‌عنوان یک جزء محوری و اصلی در مسیر انتقال پیام اتیلن به لحاظ نقش و حساسیت بیشتر در بافتهای زایشی قابل انتظار می‌باشد. با این حال سطح پایین‌تر بیان این ژن در برخی بافتهای رویشی نظیر ریشه را نمی‌توان به اهمیت کمتر این ژن در فرآیندهای تکاملی یا فیزیولوژیک نسبت داد. شیبویا و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که بیان ژن *ein2* در تشکیل ریشه‌های جانبی در اطلسی کاملاً ضروریست (۳۷). به نظر این نوع الگوی بیان ژن و همچنین بیان بالاتر mRNA ژن *ein2* در ژینوسایوم نشان‌دهنده وجود یک سازوکار تنظیم بیان اختصاصی برای این ژن در بافتهای رویشی و زایشی است. ژون و همکاران (۲۰۰۴) با مقایسه بیان ژن *ein2* در برنج نشان دادند که این ژن در بافت برگ، غلاف برگ، ریشه، گل‌های بالغ و نابالغ و طی جوانه‌زنی بذر بیان می‌شود. همچنین آنها نشان دادند که میزان بیان این ژن در

در حوادث مرتبط با بعد از گرده افشانی دارد. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که برخی از این اثرات احتمالاً به دلیل مهار سنتز اتیلن و کاهش در حساسیت به اتیلن در گلبرگها به دنبال تیمار با گلوکز می‌باشد. اگرچه نتایج اثرات متقابل بین گلوکز و کاهش بیان *ein2* را نشان می‌دهد، اما با این حال نقش گلوکز در فرآیندهای پیری و کاهش بیان *ein2* احتمالاً وابسته به فاکتورهای دیگر است. افزایش تولید اتیلن در زمان پیری بافت گلبرگ در اطلسی و کاهش چشمگیر کارکرد غشاها منجر به فقدان سازماندهی اجزای سلولی می‌گردد. علائمی نظیر افزایش چشمگیر نشت یونها، الکترولیت‌ها، آنتوسیانین‌ها از غشاء بیانگر آغاز مرگ سلولی است (۴۵) که این افزایش در نفوذپذیری غشاء از طریق دو عامل یعنی عمل اتیلن و گرسنگی سلولی نیز تحریک می‌گردد. بنابراین پایین بودن سطح قند سلولی احتمالاً جا به جایی مجدد مواد و مرگ سلولی را در گلبرگ گل‌های شاخه بریده تشدید می‌کند. از طرفی هم در سلولهای در حال پیری و هم در بافتهای دچار گرسنگی، قندها بیان بسیاری از ژنهای درگیر در جا به جایی مجدد مواد را مهار می‌کنند (۴۶). با این حال هنوز به درستی روشن نیست که این شباهتها انعکاس‌دهنده یک سندرم مشابه است یا یک رابطه علت و معلولی بین کمبود کربوهیدرات (گرسنگی)؟ اما نکته این است که کاهش سطوح قند سلولی احتمالاً القاء‌کننده پیری زودرس از طریق گرسنگی و افزایش حساسیت به اتیلن است. نتایج حاضر نشان داد که جایگاه احتمالی این اثر متقابل با مسیر انتقال پیام گلوکز، پروتئین *EIN2* در سلول می‌باشد. اگرچه این نتایج احتمالاً نشان‌دهنده نقش گلوکز در فرآیندهای پیری گل در گیاهان حساس به اتیلن است، با این حال هنوز روشن نیست که چگونه گلوکز ماندگاری گل و عدم پاسخدهی به اتیلن را افزایش می‌دهد. نقش پیشنهادی آبسزیک اسید (*ABA*) در این نوع از سازوکار پیری و ارتباط احتمالی بین مسیر انتقال پیام گلوکز و *ABA* احتمالاً بتواند پاسخی برای این سؤال باشد. لئون و شین، (۲۰۰۳)

گلها از طریق کنترل بیان *ein2* باشد. شیویا و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که کاربرد *ACC* تأثیری در میزان بیان ژن *ein2* در گیاهچه‌های اطلسی نداشت (۳۷). نتایج به دست آمده همچنین با نتایج ژون و همکاران (۲۰۰۴) در برنج مطابقت داشت (۲۵).

به‌طورکلی نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌کند که این ژن در تنظیم میزان حساسیت پاسخهای احتمالی بافتهای زایشی بعد از گرده افشانی نقش دارد. رفتار متفاوت تنظیمی این ژن در بافت گلبرگ و خامه/کلاله این مسئله را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که نخست تنظیم *ein2* در سطح نسخه‌برداری بوده و در ثانی به صورت بافت اختصاصی تنظیم می‌شود. از طرفی مدلهای پیشنهادی برای پیری بافت گل در گیاهان با گرده افشانی مؤید همین مسئله می‌باشد. اگرچه گرده افشانی در گیاهان حساس به اتیلن منجر به القاء مرگ سلولی و پیری در بافت گلبرگ می‌شود، از طرف دیگر رشد و تکامل مادگی و تخمدان را موجب می‌گردد. بنابراین کاهش سریع تجمع mRNA ژن *ein2* در خامه/کلاله به نوعی نشان‌دهنده القاء عدم حساسیت به اتیلن و جلوگیری از فعال شدن اجزای پایین‌دست مسیر انتقال پیام اتیلن می‌باشد. از سوی دیگر از آنجایی که حذف گلبرگها، به دلیل جلوگیری از جذب مجدد گرده افشانان طبیعی و علف خواران ضروریست، طبیعتاً حساسیت به اتیلن در بافت گلبرگ به عنوان یک ضامن بقاء و تکامل در گیاه مطرح خواهد بود. این مسئله می‌تواند توجیه‌کننده منطق حاکم بر نحوه تنظیم ژن *ein2* در بافت گل اطلسی باشد.

کاربرد قندها خصوصاً ساکارز و گلوکز از گذشته، تأخیر در پیری و افزایش ماندگاری از طریق کاهش حساسیت به اتیلن نشان داده است (۴۵ و ۴۶). کاهش سریع بیان ژن *ein2* در بافتهای زایشی تیمار شده با گلوکز نیز حکایت از نقش مهم ژن *ein2* در تداخل مسیر انتقال پیام هورمون اتیلن با حوادث میانجی‌گری شده توسط قندها، خصوصاً

پیری را القاء می‌کند (۲۹). در مجموع، به نظر می‌رسد که ژن *ein2* به طور معنی‌داری از طریق گلوکز تنظیم می‌شود. همچنین احتمالاً *ein2* یک جزء مهم در تداخل بین مسیرهای انتقال پیام اتیلن و گلوکز در تکامل گل و پیری می‌باشد. با این حال سازوکار و نحوه اثر گلوکز روی بیان *ein2* و سایر اجزای پایین‌دست، نیاز به بررسی و مطالعه بیشتری دارد. الگوی پیچیده بیان *ein2* و سایر اجزاء مسیر انتقال پیام و بیوستتز اتیلن نشان‌دهنده وجود یک رابطه غیرخطی با سایر مسیرهای هورمونی و تحت تأثیر عوامل مختلف و رخدادهای تکوینی در اطلسی است.

کاهش سطوح mRNA ژن *ein2* در گلبرگهای گیاه شاهد تقریباً در ۹۶ ساعت بعد از تیمار احتمالاً نشان‌دهنده یک نقش فیدبک ممانعت‌کننده در تنظیم بیان ژن *ein2* می‌باشد. شیبویا و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که کاربرد خارجی اتیلن روی گلبرگهای پتونیا موجب کاهش بیان *ein2* می‌شود (۳۷). فرآیند پیری گلبرگ به طور خاص برای گرده‌افشانی موفقیت‌آمیز و متعاقب آن تشکیل بذر در گونه‌های گیاهی که فرآیند پیری در آنها تحت تنظیم هورمون اتیلن است، حائز اهمیت است. بنابراین، احتمالاً یک سیستم تنظیم‌کننده حساسیت به اتیلن در گلها از طریق کنترل بیان *ein2* در گیاه وجود دارد. همچنین این احتمال نیز وجود دارد که کاهش در میزان mRNA ژن *ein2* در دوره‌های زمانی پایانی تیمار نتیجه فرآیند پیری القاء شده توسط اتیلن در گلبرگها باشد و پیشنهاد می‌کند که بیان *ein2* در گل‌های اطلسی مسئول حساسیت به اتیلن در خلال فرآیند پیری است.

اخیراً چائو و همکاران (۲۰۰۶) یک نقش فیزیولوژیک مهم دیگر برای *ein2* در سازگاری به تنش‌های اسمزی پیشنهاد کرده‌اند (۸). در مطالعه حاضر، کاهش اولیه در بیان ژن *ein2* در گلبرگهای اطلسی بعد از تیمار با گلوکز نیز اهمیت نقش *ein2* را در سازگاری سریع سلول با تغییرات اسمزی تأیید کرد. این کاهش سریع در بیان *ein2* منجر به افزایش

در آرابیدوپسیس نشان دادند که محصول ژن *gin1* در مسیر انتقال پیام گلوکز نقش محوری در مهار گلوکز و تکوین گیاهچه‌ها دارد. بررسیها نشان داده که مکان ژنی *gin1* معادل SDR (دهیدروژناز/ردکتاز زنجیر کوتاه) آخرین آنزیم مسیر بیوستتز ABA می‌باشد (۲۷).

اگرچه نتایج بررسی حاضر با نتایج به دست آمده توسط وانگ و همکاران (۲۰۰۷) که کاهش بیان ژن *ein2* را تحت تیمار ABA در گیاهچه‌های ۶ روزه آرابیدوپسیس نشان داد، در تناقض است (۴۸)، اما با این حال به نظر می‌رسد احتمالاً اثرات متقابل و نحوه عمل اتیلن و ABA، وابسته به غلظت هورمونی و بافت مورد آنالیز باشد. ون دورن (۲۰۰۴) نیز نشان داد که غلظتهای بالای ABA خارجی می‌تواند عکس این روند را موجب گردد (۴۵)، که می‌تواند تأیید‌کننده نتایج به دست آمده در این مطالعه باشد. با این حال، این نتایج مشاهدات قبلی را که حکایت از کارکردهای متنوع و سازوکارهای پیچیده تنظیمی برای این ژن است را مورد تأیید قرار می‌دهد (۵ و ۱۷).

با توجه به نتایج مطالعات ژنتیکی انجام شده خصوصاً روی موتانت‌های آرابیدوپسیس (۲۷)، و نتایج به دست آمده از مطالعه نقش گلوکز در کاهش بیان ژن *ein2* روی اطلسی (۲۹)، میرشمسی و همکاران (۲۰۰۹) یک مدل ساده توجیه‌کننده سازوکار عمل گلوکز در کاهش حساسیت به اتیلن را پیشنهاد کردند که احتمالاً این مدل می‌تواند توجیه‌کننده نقش گلوکز در کاهش حساسیت به اتیلن در گل‌های شاخه بریده در فرآیند پیری باشد (۲۹). با توجه به اینکه *ein2* یک جزء اساسی مشترک بین دو مسیر هورمونی اتیلن و آبسبزیک اسید است (۱۷)، به نظر می‌رسد که نقش آنتاگونیستی گلوکز از طریق ABA، با تأثیر مستقیم روی ژن *ein2* کاهش حساسیت به اتیلن را منجر می‌شود. مدل احتمالی عمل گلوکز در مسیر انتقال پیام اتیلن، نشان می‌دهد که سطوح پایین ABA به‌عنوان آنتاگونیست مسیر انتقال پیام اتیلن عمل کرده و این مدل به طور مشابهی

موجب توسعه رنگ سبز ناحیه دم میوه و مهار تکامل رنگ میوه گردید (۲۲).

بنابراین به نظر می‌رسد کاهش در سطح mRNA ژن *eil1* در گیاهان اطلسی شاهد نشان‌دهنده یک سازوکار تکوینی است که در تجمع رونوشت‌های *eil1* نقش بازی می‌کند. بررسیها و مطالعات اخیر انجام شده در گیاه آرابتدوپسیس، وجود یک اثر متقابل نزدیک بین قندهای ساکارز، گلوکز و مسیر انتقال پیام اتیلن را نشان داده است که نتایج این مشاهدات را تأیید می‌کند (۱۸، ۲۷ و ۳۹). یوردچسکو و ورلیندن (۲۰۰۵) دریافتند که گل‌های میخک که به طور مداوم با ساکارز تیمار شده‌اند، حداقل در یکی از ژن‌های خانواده *ein3* در زمان تکوین گلبرگ‌ها کاهش بیان نشان داده‌اند (۲۳). یاناگیساوا و همکاران (۲۰۰۳) نیز دریافتند که قند گلوکز تخریب فاکتور رونویسی *ein3* در پایین‌دست *ein2* را تشدید کرده و اتیلن تخریب مداوم *ein3* را در سلول مهار می‌کند، بنابراین بیان ژن‌های پایین‌دست فعال می‌شود (۱۹ و ۵۴).

در مجموع نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر در خصوص مطالعات بیان ژن و بررسی عوامل مؤثر احتمالی در تنظیم ژن *ein2*، به‌عنوان یک جزء محوری از مسیر انتقال پیام اتیلن، نشان داد که فرآیند پیری در بافت گلبرگ یک فرآیند ژنتیکی به دقت تنظیم شده می‌باشد و ژن *ein2* در انتقال پیام اتیلن، تأثیرپذیری و ایجاد پاسخ مناسب در بازه‌های تکوینی خاص در گیاه نقش مؤثر ایفاء می‌کند. از طرفی نتایج نشان داد که این پروتئین به دلیل اثرات احتمالی با برخی مسیرهای هورمونی و گلوکز می‌تواند نقش تنظیمی در مسیر انتقال پیام اتیلن از طریق کاهش بیان ژن *ein2* داشته و نقشی محوری در تنظیم فرآیندهای پیری در بافت زایشی گل داشته باشد.

مقایسات بیان این ژن در بافت‌های مختلف، وجود یک سازوکار تنظیم بیان اختصاصی را در بافت‌های گیاه تأیید نمود و اهمیت ژن *ein2* را به‌عنوان یک جزء از مسیر انتقال

در سطوح ABA سلولی می‌گردد که این امر احتمالاً تولید اتیلن را کاهش داده و منجر به کاهش حساسیت به اتیلن و حفظ کارکرد سلول در خلال فرآیند پیری گل می‌گردد. فرآیندهای سلولی متعدد، نظیر تغییرات کانال‌های یونی احتمالاً منجر به پاسخهای اولیه سریع می‌گردد. براساس ساختار منحصر به فرد پروتئین EIN2، این احتمال وجود دارد که *ein2* کارکردی مشابه ترانسپورترهای یونی داشته باشد که سلولها را از صدمه ناشی از عدم تعادل یونی از طریق حفظ هموستازی محافظت می‌کند. اما تاکنون گزارشی مبنی بر فعالیت مشابه ترانسپورترهای یونی شناسایی نشده است.

به طور کلی به دنبال یک گرده‌افشانی موفق دو پیک ناگهانی افزایش تولید اتیلن، یکی ۱۲ ساعت بعد از گرده‌افشانی و پیک بزرگتر ۲۴ ساعت بعد از گرده‌افشانی روی می‌دهد. بنابراین نتایج به دست آمده نشان‌دهنده این واقعیت است که گلوکز علاوه بر کاهش حساسیت به اتیلن، تولید اتیلن را بعد از گرده‌افشانی به طور موقت مهار می‌کند. به نظر می‌رسد که افت مقادیر بیان *acs2* احتمالاً نتیجه اثر گلوکز روی بیوستز اتیلن بعد از گرده‌افشانی باشد. نتایج به دست آمده با نتایج سایر محققان هماهنگی نشان می‌دهد. تجمع رونوشت‌های ACC سنتتاز و ACC اکسیداز زمانی که گلها قبل از آغاز فرآیند پیری با ساکارز تیمار شدند کاهش پیدا کرد (۴۵ و ۴۷). هونگ و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که کاربرد گلوکز خارجی می‌تواند موجب تأخیر تولید اتیلن کلیماکتریک در گوجه‌فرنگی در حال رسیدگی گردد. همچنین آنها دریافتند که کاهش در محتوی گلوکز موجود در لوکولهای میوه یک فاکتور مهم در انتقال پیام و آغاز رسیدگی می‌باشد، از این جهت فرض شده که احتمالاً گلوکز از طریق تأثیر روی مسیر بیوستز اتیلن رسیدگی را کنترل می‌کند. در غلظتهای بالای گلوکز حتی تکامل رنگ در میوه هم دچار تأخیر می‌گردد. تیمار میوه‌های بالغ سبز گوجه فرنگی با گلوکز

مطالعات اخیر از مسیر انتقال پیام اتیلن، اثرات متقابل *ein2* با سایر مسیرهای هورمونی و عواملی نظیر قندها در مراحل ابتدایی قرار دارد و شناخت کارکردهای فیزیولوژیک *ein2* نیاز به مطالعات بیشتر دارد. واقعیت امر این است که تا زمان شناخت کامل نقش و سازوکارهای تنظیمی اجزاء دخیل در مسیر انتقال پیام و آگاهی از تداخل‌های احتمالی با سایر تنظیم‌کننده‌ها امکان انتخاب یک راهبرد مؤثر و کاربردی برای افزایش ماندگاری با تکیه بر مسیر انتقال پیام اتیلن وجود نخواهد داشت.

پیام اتیلن در فرآیندهای تکوینی نشان داد. تغییرات بیان ژن در بافتهای زایشی بعد از گرده افشانی، وجود یک فیدبک مهارکننده در تنظیم بیان ژن *ein2* را نشان داد. همچنین، نتایج بیانگر این واقعیت است که حساسیت به اتیلن در بافتهای زایشی از طریق یک سازوکار تنظیمی پیچیده و با کنترل بیان *ein2* صورت گرفته و این ژن نقش اساسی در تنظیم میزان حساسیت پاسخهای احتمالی بعد از گرده افشانی دارد که به نوعی می‌تواند به‌عنوان یک عامل تضمین‌کننده گرده افشانی موفق، بقاء و تکامل در گیاهان گلدار مطرح باشد. با این حال به نظر می‌رسد شناخت و درک

منابع

1. Abel, S., Nguyen, M.D., Chow, W. and Theologis, A. 1995. ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 19093–19099.
2. Abeles, F.B., Morgan, P.W. and Saltveit, M.E. 1992. *Ethylene in Plant Biology* Ed 2. Academic Press, San Diego, CA.
3. Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J.R. 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, 284: 2148–2152.
4. Arora, A. and Singh, V.P. 2006. Polyols regulate the flower senescence by delaying programmed cell death in *Gladiolus*. *J. Plant Biochem. Biotech*, 15: 139–142.
5. Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F. and Giraudat, J. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell*, 12: 1103–1115.
6. Beckman, E.P., Saibo, N.J.M., Di Cataldo, A., Regalado, A.P., Ricardo, C.P. and Rodrigues-Pousada, C. 2000. Differential expression of four genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Lupinus albus* during germination and in response to indole-3-acetic acid and wounding. *Planta*, 211: 663–672.
7. Borochoy, A. and Woodson, W.R. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Horticultural Reviews*, 11: 15-43.
8. Cao, W.H., Liu, J., He, X.J., Mu, R.L., Zhou, H., Chen, S.Y. and Zhang, J.S. 2006. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology*, 143: 707–719.
9. Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M. and Lo, Schiavo, F. 2003. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 216: 413–421.
10. Cary, A.J., Liu, W. and Howell, S.H. 1995. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology*, 107: 1075–1082.
11. Chang H., Jones M.L., Banowitz G.M. and Clark D.G. 2003. Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with PSAG12-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiology*, 132: 2174–2183.
12. Cheng, W. H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H. C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., and Sheen, J. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell*, 14: 2723–2743.
13. Eason, J.R., Ryan, D.J., Pinkney, T.T. and O'Donoghue, E.M. 2002. Programmed cell death during flower senescence: isolation and characterization of cysteine proteinases from *Sandersonia aurantiaca*. *Functional Plant Biology*, 29: 1055–1064.
14. Fujita, H. and Syono, K. 1996. Genetic analysis of the effects of polar auxin inhibitors on root

- growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 37: 1094–1101.
15. Gallie, D.R. and Young, T.E. 2004. The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Mol. Genet. Genomics*, 271: 267–281.
 16. Gazzarrini, S. and McCourt, P. 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 387–391.
 17. Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y. and McCourt, P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12: 1117–1126.
 18. Gibson, S.I., Laby, R.J. and Kim, D. 2001. The sugar-insensitive1 (*sis1*) mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280: 196–203.
 19. Guo, H. and Ecker, J.R. 2003. Plant Responses to Ethylene Gas Are Mediated by SCFEBF1/EBF2-Dependent Proteolysis of EIN3 Transcription Factor. *Cell*, 115: 667–677.
 20. Guzman, P. and Ecker, J.R. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 2: 513–523.
 21. Hoerberichts, F.A., van Doorn, W.G., Vorst, O., Hall, R.D. and van Wordragen, M.F. 2007. Sucrose prevents upregulation of senescence-associated genes in carnation petals. *Journal Experimental of Botany*, 58: 2873–2885.
 22. Hong, J.H., Cowan, A.K. and Lee, S.K. 2004. Glucose Inhibits ACC Oxidase Activity and Ethylene Biosynthesis in Ripening Tomato Fruit. *Plant Growth Regulators*, 43: 81–87.
 23. Iordachescu, M. and Verlinden, S. 2005. Transcriptional regulation of three EIN3-like genes of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Improved White Sim) during flower development and upon wounding, pollination, and ethylene exposure. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2011–2018.
 24. Iwaya-Inoue, M. and Nonami, H. 2003. Effects of trehalose on flower senescence from the view point of physical states of water. *Environment Control in Biology*, 41: 3–15.
 25. Jun, S.H., Han, M.J. Lee, S., Seo, Y.S., Kim, W.t. and An, G. 2004. OsEIN2 is a positive component in ethylene signaling in rice. *Plant Cell Physiology*, 45: 281–289.
 26. Kieber, J.J., Rothenburg, M., Roman, G., Feldmann, K.A. and Ecker, J.R. 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 72: 427–441.
 27. Leon, P. and Sheen, J. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science*, 8: 110–116.
 28. Mayak, S. and Dilley, D. 1976. Effect of sucrose on response of cut carnation flowers to kinetin, ethylene and abscisic acid. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 101: 583–585.
 29. Mirshamsi Kakhki, A., Shahriri, F., Bahrami, A.R. and Gray, J. 2009. Expression of EIN2 gene in *Petunia* flowers is down-regulated during glucose treatment. *Horticultural Environmental and Biotechnology*, 50(3): 247–252.
 30. Novika, G.V., Moshkov, I. E., Smith, A. R. and Hall M.A. 2000. The effect of ethylene on MAPkinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 474(1): 29–32.
 31. Nukui, H., Kudo, S., Yamashita, A. and Satoh, S. 2004. Repressed ethylene production in the gynoceium of long-lasting flowers of the carnation 'White Candle': role of the gynoceium in carnation flower senescence. *Journal Experimental of Botany*, 55: 641–650.
 32. Onoue, T., Mikami, M., Yoshioka, T., Hashiba, T. and Satoh, S. 2000. Characteristics of the inhibitory action of 1,1-dimethyl-4-semicarbazide (DPSS) on ethylene production in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *Plant Growth Regulators*, 30:201–207.
 33. Otsubo, M. and Iwaya-Inoue, M. 2000. Trehalose delays senescence in cut gladiolus spikes. *HortScience*, 35: 1107–1110.
 34. Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourteux, D. and Hirt, H. 2003. A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO Journal*, 22(6):1282–1288.
 35. Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P. and Brokeart, W.F. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 2103–2113.
 36. Rolland, F., Moore, B. and Sheen, J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, 14 (suppl.), S185–S205.

37. Shibuya, K., Barry, K.G., Ciardi, J.A., Loucas, H.M., Underwood, B.A., Nourizadeh, S., Ecker, J.R., Klee, H.J. and Clark, D.G. 2004. The central role of PhEIN2 in ethylene responses throughout plant development in petunia. *Plant Physiology*, 136: 2900–2912.
38. Shibuya, K., Yoshioka, T., Hashiba, T. and Satoh, S. 2000. Role of the gynoecium in natural senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *J. Exp. Bot.* 51: 2067–2073.
39. Smeeckens, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 49-81.
40. Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. and Ecker, J.R. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development*. 12: 3703-3714.
41. Stepanova, A.N. and Ecker, J. R. 2000. Ethylene Signaling: from mutants to molecules. *Current Opinion of Plant Biology*, 353-360.
42. Swarup, R., Parry, G., Graham, N., Allen, T. and Bennett, M. 2002. Auxin cross-talk: integration of signaling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology*, 49: 411–426.
43. Taverner, E.A., Letham, D.S., Wang, J. and Cornish, E. 2000. Inhibition of carnation petal inrolling by growth retardants and cytokinins. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 357–362.
44. van Doorn, W.G. and Stead, A.D. 1994. The physiology of petal senescence which is not initiated by ethylene. In: Scott RJ, Stead AD, eds. *Molecular and cellular aspects of plant reproduction*. Cambridge: Cambridge University Press, 239–254.
45. van Doorn, W.G. 2004. Is petal senescence due to sugar starvation? *Plant Physiology*, 134: 35–42.
46. van Doorn, W.G. and Woltering, E.J. 2008. Physiology and molecular biology of petal senescence. *Journal Experimental of Botany*, 59 (3): 453–480.
47. Verlinden, S. and Garcia, J.J. 2004. Sucrose loading decreases ethylene responsiveness in carnation (*Dianthus caryophyllus* cv. White Sim) petals. *Postharvest Biology and Technology*, 31: 305–312.
48. Wang, Y., Liu, C., Li, K., Sun, F., Hu, H., Li, X., Zhao, Y., Han, C., Zhang, W., Duan, Y., Liu, M. and Li, X. 2007. Arabidopsis EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Molecular Biology*, 64: 633-644.
49. Whitehead, C. S., Fujino, D. W. and Reid, M. S. 1983. Identification of the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), in pollen. *Sci. Hortic.* 21: 291-297.
50. Whitehead, C. S., Fujino, D. W. and Reid, M. S. 1983. The roles of pollen ACC and pollen tube growth in ethylene production by carnations. *Acta Hortic.* 141: 221-227.
51. Whitehead, C.S., Halevy, A.H. and Reid, M.S. 1984. Roles of ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in pollination and wound-induced senescence of Petunia hybrid flower. *Physiol. Plant*, 61: 643-648.
52. Woeste, K.E., Vogel, J.P. and Kieber, J.J. 1999. Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 105: 478–484.
53. Yamada, T., Takatsu, Y., Manabe, T., Kasumi, M. and Marubashi, W. 2003. Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of gladiolus. *Plant Sci.*, 4: 213–221.
54. Yanagisawa, S., Yoo, S.D. and Sheen, J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, 425: 521–525.
55. Yi, H.C., Joo, S., Nam, K.H., Lee, J.S., Kang, B.G. and Kim, W.T. 1999. Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Molecular Biology*, 41: 443–454.
56. Zhou, L., Jang, J.-C., Jones, T.L. and Sheen, J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 95: 10294–10299.

Analysis of *EIN2* gene expression in *Petunia* (*Petunia*×*hybrida*) and study of its regulatory role in ethylene signaling pathway

Mirshamsi Kakhki A.^{1,*}, Bahrami A.R.², Shahriari Ahmadi F.¹ and Gray J.³

¹ Biotechnology and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, I.R. of Iran

² Biology Dept., Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, I.R. of Iran

³ Molecular Biology and Biotechnology Dept., University of Sheffield, Sheffield, UK

Abstract

The plant hormone ethylene regulates a variety of processes, such as growth, seed germination, flower initiation, organ abscission, adventitious root formation, leaf expansion, fruit ripening, and petal senescence after fertilization. Flower senescence is one of the developmental processes in which ethylene plays a key role. The climacteric rise of endogenous ethylene in these flowers has been shown to play a regulatory role in the events leading to death of some of the floral organs. In recent studies, loss-of-function ETHYLENE INSENSITIVE2 (*EIN2*) mutation showed ethylene insensitivity which indicated an essential role of *EIN2* in ethylene signaling. As the *EIN2* gene, a positive regulator, plays a central role in ethylene signal transduction, we characterized its expression pattern in *Petunia*. The results showed that *EIN2* transcript was present in all of tissues, with highest levels in style/stigma and ovary opened *petunia* flowers. Also, expression analysis was carried out to evaluate the effects of pollination, glucose, ABA, ACC on ethylene biosynthesis and signaling in *petunia* flower. The results indicate that glucose may play an important role in ethylene-associated regulation of flower senescence. These results demonstrate that *NtEIN2* mediates ethylene signals in wide range of physiological processes and also cross-talk with other hormones like ABA in environmental stresses.

Key words: Antisense, *ein2*, Ethylene, Flower Senescence, Pollination, Signal Transduction