ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ٤، زمستان ١٣٨٩
صفحه ٩٨-٨٧

ارزیابی کمی الگوی بیان ژن‌های بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز تحت تنش سرما در گیاه نخود

محمدرضا نظری*[1]، رضا معالی‌امیری[2]، سیده‌ساناز رمضانپور[3]

۱و۲- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mrnazari@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۸)

چکیده

گیاهان در فرایند سازگاری به کمک تنظیم فعالیت ژن‌ها و متابولیسم سلولی به دماهای پایین تحمل نشان می‌دهند. در این پژوهش، میزان کمی رونوشت بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز به عنوان ژن‌های دخیل در تنش‌های دمایی و میزان نشت الکترولیتی به‌عنوان شاخص خسارت غشای سلولی، در فواصل زمانی متعدد در تنش سرما و یخ‌زدگی، در دو نوع نخود کابلی و دسی ارزیابی گردید. نتایج حاکی از وجود تفاوت در الگوی بیان دو ژن در ژنوتیپ‌ها بود. کاهش بیان هر دو ژن در ژنوتیپ جم و تغییر ناپایدار ژنوتیپ ٤٣٢٢ در دمای سازگاری، الگوی کلی پاسخ این دو ژن را به صورت کاهش بیان در این گیاهان نمایان کرد که با شاخص خسارت کمتر غشاء در ژنوتیپ جم همراه بود. انتقال گیاهچه‌های سازگار شده به دمای زیر صفر که با افزایش شدید شاخص نشت الکترولیتی در ٤٣٢٢ و عدم تغییر آن در جم همراه بود، ارتباط ژن-های مذکور را در پاسخ گیاه جم به تنش سرما و عدم وجود ساز و کارهای سازگاری در ژنوتیپ ٤٣٢٢ را نشان داد. به طور کلی این مطالعه نشان داد که کاهش بیشتر بیان ژن‌های بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز که با پایداری بیشتر بیان و خسارت غشایی کمتر ژنوتیپ جم در مقایسه با ژنوتیپ ٤٣٢٢ همراه بود، ممکن است به‌عنوان یکی از فرایندهای دخیل در ساز وکارهای تحمل محسوب شود.

واژه‌های کلیدی

بتاگالاکتوزیداز،
بتاگلوکوزیداز،
بررسی بیان ژن،
تنش انجماد،
سازگاری،
نشت الکترولیتی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]

مقدمه

تنش سرما از تنش‌های مهم غیر زنده و از عوامل اصلی کاهش میزان تولید گیاهان زراعی در طول فصل رشد است (۳). رویارویی با دماهای پایین صفر تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد در فصل زراعی برای گیاهان معمول است و چنین شرایطی می‌تواند ایجاد تنش نموده و بر عملکرد گیاهان تاثیر بگذارد (۴۳). از جمله دلایل این خسارت از بین رفتن بسیاری از پروتئین‌های سلولی و به تبع آن اختلال در سوخت و ساز سلول و تغییرات در پایداری و نفوذ پذیری غشا می‌باشد، که اثر آن در درجه اول در غشای سلولی مشاهده می‌شود (۱۳) و تنش ابتدا توسط گیرنده‌های غشایی دریافت شده و منجر به تولید پیک‌های اولیه و ثانویه می‌شود. این پیک‌ها یک برهم‌کنش پروتئینی وابسته به کلسیم را راه اندازی کرده که با فسفریلاسیون ملکول‌های مختلف منجر به هدف قرار دادن ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش یا عوامل رونویسی کنترل کننده‌ی این ژن‌ها می‌شود (۲۱، ۱۴). در این بین برخی از ژن‌ها سریع‌تر و برخی دیرتر نسبت به تنش وارده پاسخ می‌دهند. برخی از تقسیم بندی‌ها پاسخ ژن تا ۱۲ ساعت پس از شروع تنش را جزء پاسخ زودهنگام و بعد از آن را جزء پاسخ دیرهنگام طبقه بندی نموده‌اند (۳۲). گیاهان با ساز و کارهای متعدد به تنش سرما پاسخ داده و بنابراین درجه‌های متفاوتی از تحمل را نشان می‌دهند (۴۳، ۱۲). این اختلاف در بین گیاهان در زمینه‌ی تحمل به دماهای مختلف از پاسخ وسیع در سطوح دیواره‌ی سلولی، غشای سلولی، اندامک‌ها، ریز ملکول‌ها و درشت ملکول‌ها منشاء می‌گیرد و در نهایت بیان متفاوت ژن‌های مرتبط را به‌همراه خواهد داشت (۹). یکی از فرایندهای مهم در مقاومت گیاهان به تنش سرما به عنوان سازگاری[1] شناخته می‌شود. در این فرایند، ساز و کارهای درونی گیاه سبب افزایش مقاومت به تنش انجماد، پس از قرارگیری در دماهای پایین بالای صفر می‌شود (۱۱). شناخت ساز و کارهای گیاهان در ایجاد تحمل به تنش سرما طی سازگاری و همچنین ارتقای تحمل گیاهان به سرما یکی از تلاش‌های اصلی محققان بوده است (۱۰، ۳۸). هرچند برخی از ژن‌ها و تنظیم کننده‌های دخیل در فرایند سازگاری توسط محققان شناخته شده است، اما هنوز ارتباط اساسی بین تغیرات رخ داده و مقاومت القا شده در گیاهان به خوبی شناخته نشده است (۳۸، ۳۵). شناخت پاسخ گیاهان به تنش، نیازمند درک عمیق از پاسخ ژن‌های مورد نظر به هنگام رویارویی با دمای پایین و ارزیابی دقیق القای آنها تحت تنش می‌باشد (۱۹، ٦). سنجش میزان اثر عوامل مختلف در تحمل به تنش‌های غیر زنده با روش‌های متعددی از جمله اندازه-گیری سطوح رونویسی ژن‌ها (۲۲) و مطالعات فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی گیاه (٤٤) انجام می‌پذیرد. در مطالعه‌ای مشاهده شده است که گیاهان نخود، تنوع وسیع مورفولوژیکی در کنار تنوع کم ژنتیکی از خود نشان داده‌اند که این موضوع ایجاد لاین‌هایی با تحمل پایدار در برابر تنش‌ها را دشوار می‌سازد بنابراین در بسیاری از موارد ارتباط قوی بین تغییرات در سطوح ملکولی با سطوح فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مشاهده می‌شود (۳٦). روش‌های مختلف مطالعه‌ی پاسخ گیاه به سازگاری، گزارشگر پاسخ‌های پیچیده و برهم کنش‌های فراوان این مسیر است (۱۶). آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز[2] و بتاگالاکتوزیداز[3] از جمله آنزیم‌های گلیکوزید یک هیدرولاز[4] هستند که پیوند گلیکوزیدی بین ترکیبات مختلف را می‌شکنند (۱۵). این ژن‌ها در بسیاری از فعالیت‌های سلولی از جمله تجزیه‌ی پیوند دی‌ساکاریدها، الیگوساکاریدها، ترکیبات دیواره‌ی سلولی، فعال‌سازی هورمون-های گیاهی از ترکیب غیر فعال گلیکوزیله شده و مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده نقش ایفا می‌کنند (۳۱). برخی مطالعات در گیاهان نشان داده است تنش سرما سبب تغییر میزان بیان ژن-های بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز می‌شود (۷، ۲۲). بررسی پاسخ این ژن‌ها تحت دمای سازگاری بسیار محدود است. بنابراین روشن شدن مکانیزم تنظیم این ژن‌ها تحت تنش سرما یک هدف مهم در درک سازگاری به سرما است (۱۷). نخود (*Cicer Arietinum* L.) یکی از گیاهان مهم زراعی است که همانند بسیاری از گیاهان مناطق معتدله و گرم و خشک، حساس به سرما بوده و پراکنش آن تحت تاثیر دما قرار می‌گیرد (۳۳). به طور کلی نخود در دو نوع دسی و کابلی وجود دارد که هر دو نوع آن در

[1] Acclimation

[2] Beta Glucosidase
[3] Beta Galactosidase
[4] Glycosidic Hydrolase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]

ایران کشت می‌شوند ولی سطح زیر کشت ارقام کابلی از دسی بیشتر است. ژنوتیپ‌های مختلف نخود دسی که تحت شرایط متفاوت محیطی رشد می‌کنند می‌توانند به عنوان منبع غنی ژنتیکی در راستای فعالیت‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند (۴۲). لذا در این مطالعه پاسخ دو ژن بتاگلوکوزیداز و بتاگالاکتوزیداز تحت شرایط دمای سازگاری و تنش در فواصل زمانی متعدد به همراه ارزیابی فیزیولوژیکی گیاه در دو نوع نخود دسی و کابلی در برابر سازگاری بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

شرایط رشد گیاهان و اعمال تنش

در این پژوهش دو نوع ژنوتیپ نخود دسی و کابلی به نام‌های ۴۳۲۲ (از ژنوتیپ‌های انتخابی از مناطق سردسیر کشور از اردبیل) و جم (از ژنوتیپ‌های زراعی محلی رایج در کشور (۱))، بترتیب از کلکسیون بذر حبوبات بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران و موسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه تهیه شدند. بذور با هیپوکلریت سدیم تجاری ده درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در ظروف پتری با رطوبت لازم قرار گرفتند. ظروف پتری در شرایط بدون نور و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان منتقل شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد با نور ۲۰۰ میکرومول بر انیشتن و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار داده شدند. گیاهچه‌های هر ژنوتیپ به دو قسمت تقسیم شده نیمی از آنها در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط ذکر شده نگهداری شده و نیمی دیگر به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد (که بر اساس گزارشات پیشین (۲۴) و پژوهش‌های مولفین تعیین شده بود) منتقل شدند. نمونه‌گیری از برگ گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای انجام گرفت. در فاصله‌های زمانی ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت پس از شروع تنش از قسمت‌های میانی گیاهان، نمونه‌گیری برگ مرکب انجام شد. بعد از ٢٤ ساعت یک گیاهچه از تیمار دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین یک گیاهچه دیگر نیز از شرایط نرمال ۲۳ درجه به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. برای جلوگیری از یخ‌زدگی سلول‌ها در تیمار دمایی زیر صفر، دمای اتاقک رشد به تدریج کاهش یافت و گیاهان به مدت ۱۵ دقیقه در معرض این دما قرار گرفتند و سپس نمونه‌گیری انجام شد. رژیم سرمای مورد نظر (ترکیب دما و دوره زمان) در آزمایشات اولیه تعیین گردید. نمونه‌های شاهد از هر گیاه و برای هر تیمار از گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در همان لحظه‌ی نمونه‌گیری از گیاهان تحت تنش انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و جهت نگهداری به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج RNA

به منظور استخراج RNA کل با روش بایوزول[5] (فرژن‌پویش، ایران، تهران)، ۸۰ میلی گرم از بافت مورد نظر که با کمک هاون چینی استریل به خوبی در نیتروژن مایع کوبیده شده بود در یک میلی‌لیتر بافر قرار داده شد و پس از چند ثانیه ورتکس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن افزوده شد و پس از چند بار تکان دادن با کمک دست، به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. تیوب‌های حاوی نمونه ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند، سپس فاز بالایی به تیوب‌های جدید منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. پس از چند بار تکان دادن، تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن تیوب‌ها ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی حذف و یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد. نمونه‌ها تکان داده شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه و سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. مجددا مایع رویی حذف شد و پس از خشک شدن الکل، رسوب RNA در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC[6] حل شد. غلظت RNAی هر استخراج به کمک اسپکتروفتومتر تعیین گردید. جهت تعیین کمیت RNA، بخشی از RNA به نسبت ۱:۱۰۰ با آب رقیق شده و با دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید، مقدار جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر از روی دستگاه خوانده شد و

[5] Biozol
[6] Diethylpyrocarbonate

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]

مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم در میکرولیتر محاسبه شد. از آنجایی که OD_{320} میزان جذب زمینه و آلودگی‌های احتمالی را مشخص می‌کند بنابراین از OD_{260} و OD_{280} کسر شد تا نتایج نزدیک‌تر به واقعیت باشند.

$$RNA_{(ng/\mu l)}=(OD_{260}- OD_{320}) \times \text{dilution factor} \times 4$$
$$\text{Yield} = OD_{(260-320)} /OD_{(280-320)}$$

همچنین جهت تعیین کیفیت RNA مقدار ۵ میکروگرم از هر نمونه (براساس نتایج اسپکتروفتومتری محاسبه شدند) روی ژل ۱/۵ درصد آگارز، الکتروفورز شد تا نسبت به کیفیت بالای آن اطمینان حاصل شود. پس از اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی ۱۸s و ۲۸s، تیمار DNase برای تمامی نمونه‌ها بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز اعمال شد. برای این منظور دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNaseI و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه گردید و به مدت۱۰دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. تیوب‌ها جهت نگهداری، در دمای۸۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

ساخت cDNA

جهت ساخت cDNA، از روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. اولین رشته‌ی cDNA با کمک آغازگر الیگو دی‌تی ساخته شد. مقدار ۵ میکرولیتر از RNA ای که با DNase تیمار گردیده بود، همراه با ۰/۵ میکروگرم آغازگر الیگودی‌تی مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از آن به‌سرعت روی یخ سرد گردید. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر دی-اکسی‌نوکلئوتری‌فسفات با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد (u) RNase inhibitor به هر تیوب افزوده گردید و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به محلول فوق اضافه شد و پس از مخلوط نمودن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس به منظور غیرفعال نمودن واکنش، تیوب-ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

طراحی آغازگر برای کمیت سنجی با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[7]

طراحی آغازگرها برای ژن‌های بتاگالاکتوزیداز، بتاگلوکوزیداز و ژن خانه دار اکتین[8] بااستفاده از نرم افزار پرایمر ۳ انجام شد. توالی، شماره دسترسی مورد استفاده در سایت NCBI و خصوصیات آغازگر ژن اختصاصی و ژن خانه دار در جدول (۱) ارائه شده است.

[7] Polymerase Chain Reaction
[8] Actin

جدول ۱- نام، توالی و مشخصات ژن‌های اختصاصی و ژن خانه‌دار اکتین برای انجام Real time PCR

نام ژن	توالی آغازگر ژن	دمای اتصال	طول محصول	شماره دسترسی
بتاگالاکتوزیداز	5′-CTACCGCGAAGGAAGTTGTC-3′ 5′-GGTGCAAATGGCCTCTACTG-3′	59.88 60.66	160	AJ006771.1
بتاگلوکوزیداز	5′- GGTCAAAGGGCTGCTTCATT-3′ 5′- CGGCTTCTTCTATCGGAAGTGT-3′	61.52 61.95	157	AJ630653.1
اکتین	5'-CTACGAATTGCCTGATGGAC-3' 5'-CCTCCTGAAAGGACGATGTT-3'	58.17 59.14	189	EU529707.1

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]

انجام روش QRT-PCR[9]

در این تحقیق از دستگاه iQ5 شرکت BioRAD و کیت حاوی رنگ فلورسنس SYBR BioPars (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) برای ارزیابی کمی استفاده گردید. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR BioPars، یک میکرولیتر از هریک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA مورد بررسی بود. برای هر واکنش ۳ تکرار در نظر گرفته شد. پس از آماده نمودن مخلوط واکنش پلیت مورد نظر به دستگاه iQ5 منتقل گردید و با شرایط زیر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز انجام شد: ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (دمای Tm آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد. در روش qRT-PCR می‌توان ارزیابی‌های فلورسنت را هم در مرحله دوم (مرحله اتصال)[10] و هم در مرحله سوم (مرحله توسعه)[11] انجام داد که در این مقاله از ارزیابی در مرحله سوم استفاده شده است. بیان نسبی ژن‌ها با روش $(2^{-\Delta\Delta CT})$[12] محاسبه گردید (۲۸) به این صورت که هر تیمار با گیاهان شاهد مربوط به زمان خود بر اساس تغییرات نسبت به ژن خانه‌دار مقایسه گردید. جهت تجزیه-ی داده‌ها از نرم افزار REST[13] (۲۹) استفاده شد.

اندازه‌گیری تحمل به سرما براساس قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی گیاه

تحمل به سرما بر اساس شاخص نشت الکترولیتی[14] بافت‌های خسارت دیده نخود بعد از تیمار سرما اندازه‌گیری شد. شرایط رشد در بالا توضیح داده شد. نمونه گیری از برگ‌ها به ترتیب در شرایط کنترل (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، بعد از ۲۴ ساعت سازگاری و پس از اعمال تنش انجماد در گیاهان سازگار شده انجام شد. ۸۰ میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی-لیتر آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلاء هوای درون محیط خارج شده و لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر قرار گرفتند. سپس میزان نشت الکترولیتی نمونه‌ها (EC_1)[15] با استفاده از دستگاه EC متر (آلمان ,Inolab) اندازه‌گیری شد. محتوی لوله آزمایش پس از قرار گرفتن در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، در دستگاه شیکر قرار گرفته و بلافاصله میزان هدایت الکترولیتی (EC_2) تعیین شد و درنهایت مقدار شاخص خسارت براساس فرمول $I=(EC_1/EC_2)\times 100$ محاسبه گردید (۳۰).

نتایج و بحث

بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز از جمله ژن‌هایی هستند که در تنظیم سوخت و ساز سلولی در طول رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده حائز اهمیت می‌باشند. در این پژوهش، دو ژنوتیپ نخود ۴۳۲۲ و جم، سه هفته بعد از جوانه-زنی تحت تنش کوتاه‌مدت ۱۰ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها که پس از اطمینان از تکثیر اختصاصی ژن و همچنین عدم وجود آلودگی‌های RNA انجام شد (شکل ۱). نشان داد که دو ژنوتیپ از الگوی کلی تقریبا مشابهی در پاسخ ژن‌های بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز به دمای سازگاری و تنش انجماد پیروی می‌کنند، اما تنوع پاسخ در دو ژنوتیپ که به صورت افزایش یا کاهش میزان بیان در ساعات و شرایط مختلف دیده شد، حاکی از وجود تنوع ژنتیکی و قدرت پاسخ و تحمل به سرمای متفاوت در این دو ژنوتیپ بود. همچنین تغییر کمی قابل ملاحظه در بعضی از ساعات قرارگیری تحت تنش، مدت زمان تنش را به عنوان عنصر کلیدی در پاسخ این گیاهان به تنش سرما تعیین نمود. در این مطالعه پاسخ زود هنگام گیاه در بیان ژن با افزایش نسبی بیان هر دو ژن در هر دو ژنوتیپ از ساعت سوم پس از شروع تنش مشاهده گردید، که در ژن بتاگالاکتوزیداز در ژنوتیپ جم حدود ۲/۵ برابر و در ۴۳۲۲ حدود ۶ برابر افزایش بیان رخ داده است (شکل ۲). بیان ژن

[9] Quantitative Reverse Transcript PCR
[10] Annealing
[11] Extension
[12] Threshold Cycle: منظور از چرخه آستانه چرخه ای است که در آن اولین افزایش قابل تشخیص در فلورسنت توسط دستگاه تشخیص داده شده و ثبت می‌شود.
[13] Relative Expression Software Tool
[14] Electrolyte Leakage Index (ELI)
[15] Electric Conductivity

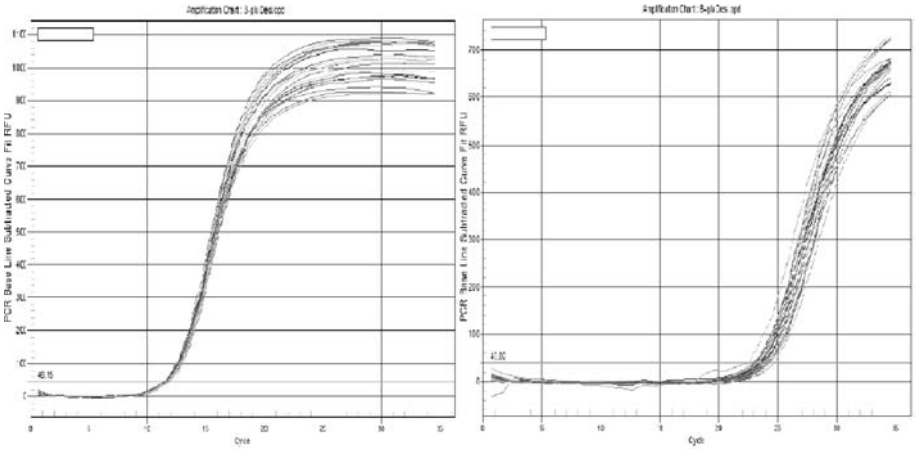
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]

بتاگلوکوزیداز نیز در گیاه جم حدود دو برابر و در ۴۳۲۲ حدود شش برابر افزایش داشت (شکل ۳). این نوع بیان ژن در محدوده پاسخ سریع گیاه قرار می‌گیرد (۳۲). پس از گذشت شش ساعت از شروع تنش، کاهش بیان در هر دو ژن و ژنوتیپ مشاهده شد. در ژن بتاگالاکتوزیداز، روند کاهش بیان تا ۴۸ ساعت پس از شروع تنش و در ژن بتاگلوکوزیداز ۳۶ ساعت پس از شروع تنش مشاهده گردید. علی‌رغم معنی‌دار نبودن این کاهش‌ها در بعضی از زمان‌های نمونه‌گیری، کاهش در میزان رونوشت هر دو ژن در ژنوتیپ جم، در ساعت ۱۲ تنش چشمگیر بود. در ۴۳۲۲ میزان رونوشت بتاگالاکتوزیداز بجز ساعات ۳ و ۲۴ که به‌ترتیب حدود ۶ برابر افزایش و کاهش مشاهده شد، در بقیه ساعات با تغییرات اندک حدود ۱ تا ۲ برابر تغییر نسبت به شاهد ادامه یافت. اما در مورد ژن بتاگلوکوزیداز الگوی خاصی در طی ساعات اعمال تنش ملاحظه نشد، به طوری که در ساعات ۳، ۱۲ و ۳۶ تنش سه افزایش معنی‌دار بیان مشاهده شد و در سایر ساعات کاهش اندک وجود داشت. تاکنون گزارشات متفاوتی از میزان بیان این ژن‌ها در دمای تنش و سازگاری به سرما ارائه گردیده است (۴۰،۳۴،۲۵). با توجه به این که نقش اصلی این دو آنزیم در سوخت و ساز و فعالیت‌های سلولی، شکستن پیوندهای گلیکوزیله شده با سایر قندها، گلیکولیپیدها، گلیکوپروتئین‌ها، گلیکوزآمین گلیکان‌ها، هورمون‌های گیاهی و متابولیت‌های دیگر است (۴۱،۳۱،۲) و شرایط دمایی متفاوت، پاسخ‌های مختلفی نیز در پی خواهد داشت، می‌توان به دلایل نتایج ضد و نقیض در گزارشات تحقیقاتی متعدد پی برد (۴۰،۲۶). افزایش اولیه رونوشت این دو آنزیم ممکن است به دلیل نیاز گیاه به آماده سازی و فعال‌سازی سایر ژن‌ها به کمک هیدرولیز کردن پیوند ABA و فعال‌سازی آن، یا افزایش مواد محلول سلولی در مقابله با تنش سرما باشد که این فرضیه توسط محققان نیز تایید شده است (۵،۷). کاهش نسبی رونوشت پس از ساعت سوم نیز ممکن است به دلیل نیاز بیشتر گیاه به دی ساکاریدها نسبت به مونوساکاریدها باشد (۲۲). همچنین کاهش بیان این ژن‌ها به دلیل ممانعت گیاه از تجزیه پیوندهای گلیکوزیله توسط این دو ژن در واکنش تجزیه دیواره و بعضی از گلیکوپروتئین‌ها، می‌تواند به پایداری دیواره سلولی و برخی از گلیکوپروتئین‌های دخیل در سوخت و ساز سلول کمک کند (۲۳، ۳۹، ۴). اگرچه روابط تغییرات بیان ژن‌های مورد بررسی در راستای تحمل به تنش سرما و انجماد هنوز به طور کامل شناخته نشده است و نیازمند بررسی‌های بیشتر است، برای مثال هنوز اختصاصی بودن عمل گلیکوزید هیدرولازی چون بتاگلوکوزیداز بر روی پیوند ABA گلوکوپیرانوزید به‌طور کامل در همه گیاهان شناخته نشده است (۷، ۱۸)، اما اکثر گزارشات پیشین حاکی از کاهش بیان این دو ژن در راستای تحمل تنش سرما است (۲۲، ۲۶، ۲۷). به منظور بررسی تکمیلی پاسخ این ژن‌ها به سرما، گیاهان تحت تنش کوتاه مدت انجماد قرار گرفتند. این آزمایش با انتقال گیاهانی که در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سازگار شده بودند و همچنین گیاهان سازگار نشده موجود در دمای ۲۳ درجه، به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتایج حاکی از تفاوت در پاسخ دو ژن نسبت به تنش انجماد و تفاوت در میزان رونوشت تحت این تنش بود، به طوری که مشاهده شد در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد، رونوشت ژن بتاگالاکتوزیداز در مقایسه با گیاهانی که در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند، در هر دو ژنوتیپ افزایش معنی‌داری نشان داد. در گیاهان سازگار نشده نیز، افزایش بیان در هر دو ژنوتیپ نسبت به گیاهان موجود در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. هر چند این مقدار در ژنوتیپ جم سازگار شده بیشتر بود (شکل ۴). این اتفاق در مورد ژن بتاگلوکوزیداز عکس بود و کاهش میزان رونوشت ژن موردنظر در هر دو ژنوتیپ و هر دو شرایط مشاهده گردید، که این کاهش در گیاهان سازگار شده شدیدتر دیده شد (شکل ۵). گزارش شده است که پاسخ ژن‌های درگیر در تنش سرما می‌تواند به طور اختصاصی در دمای بالای صفر یا زیر صفر رخ دهد (۳۷). نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که ژن‌های بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز در این گیاهان، در برابر تنش انجماد، به ترتیب پاسخی به صورت افزایش و کاهش بیان نشان داده‌اند. به نظر می‌رسد که سازگاری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت منجر به بروز پاسخ شدیدتر و سریعتر در رویارویی با تنش انجماد می‌شود. با توجه به این که تحت دماهای بسیار پایین علاوه بر ممانعت از رونویسی و تولید پروتئین‌های جدید، RNA

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]

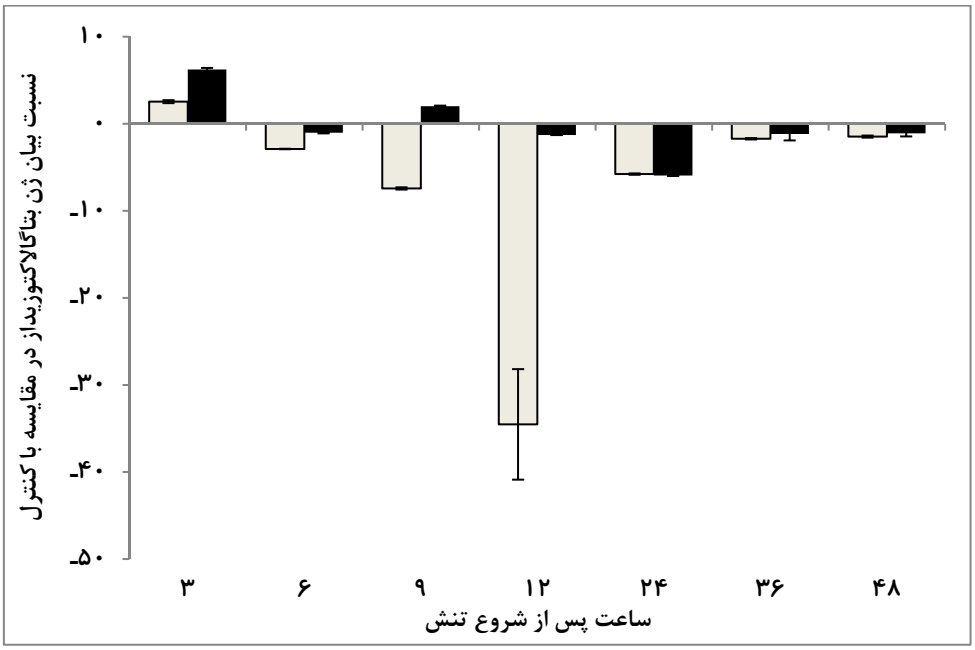
و پروتئین‌های موجود نیز در معرض خطر از بین رفتن قرار می‌گیرند (۸)، می‌توان میزان رونوشت و خسارت ناشی از تنش انجماد را به چگونگی آماده سازی گیاه در دمای ۱۰ درجه نسبت داد. هرچند قرارگیری طولانی مدت در معرض دمای سازگاری می‌تواند تغییرات زیادی را در گیاهان نشان دهد اما برخی از ساز و کارهای تحمل در طی زمان کوتاهی پس از شروع اعمال دمای سازگاری نیز می‌تواند به میزان کمتر منجر به تحمل به سرما شود (۲۰). با توجه به این مطالب می‌توان به تاثیر سازگاری به سرما حتی در دوره زمانی کوتاه ۲۴ ساعت پی برد. با توجه به گزارشات متفاوت در خصوص واکنش گیاهان در بیان ژن‌های گلوکوزیدیک هیدرولاز، بخصوص دو ژن مورد بررسی در این آزمایش، بررسی میزان تحمل تنش سرما در این دو ژنوتیپ و تعیین ارتباط آن با تفاوت موجود در روند بیان ژن ضروری است. مطالعات قبلی ما بر روی این دو گیاه به طرز معنی‌داری نشان‌دهنده تحمل بیشتر جم نسبت به ۴۳۲۲ بود (داده‌های گزارش نشده). با توجه به‌این‌که در موارد زیادی می‌توان به کمک داده‌های فیزیولوژیک نتایج ملکولی را تفسیر کرد از شاخص نشت الکترولیتی در جهت تکمیل مطالعات استفاده شد. نتایج نشت الکترولیتی به عنوان شاخص آسیب غشا، حاکی از افزایش در هر دو ژنوتیپ پس از ۲۴ ساعت سازگاری بود به‌طوری که این عدد در جم حدود ۳۷/۵ درصد بود و در ۴۳۲۲ به ۴۲/۵ درصد رسید (شکل ۶). پس از قرار دادن بوته‌ها در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد، افزایش شدید نشت الکترولیتی در ۴۳۲۲ مشاهده شد، درحالی‌که این شاخص برای جم تقریبا بدون تغییر باقی ماند و در حدود ۳۷/۶۳ درصد حفظ شد که نشان‌دهنده آماده‌سازی بیشتر جم در طی ۲۴ ساعت برای رویارویی با تنش انجماد است. در مطالعات قبلی مولفین نیز فعالیت ضد اکسیداسیونی بیشتر و پراکسیداسیون غشایی کمتر در ژنوتیپ جم در مقایسه با ۴۳۲۲ مشخص شده بود (که دلیل بر قدرت تحمل بیشتر این ژنوتیپ می‌باشد). بنابراین احتمالا بتوان نوع پاسخ جم را که با کاهش بیشتر بیان ژن در مقایسه با ۴۳۲۲ همراه بوده، در راستای آماده‌سازی بیشتر گیاه قلمداد کرد. هرچند ارتباط وسیع ژن‌ها و متابولیت‌ها منجر به بروز پاسخ‌هایی از نوع مقاومت یا حساسیت در گیاهان می‌شود اما نتایج این تحقیق نشان داد روند منظم کاهش بیان ژن‌های مورد نظر در طی ۲۴ ساعت سازگاری در کنار سایر عوامل موثر، موجب کاهش آسیب غشایی در ژنوتیپ جم در حین تنش گردیده است. به‌طورکلی نتایج این تحقیق پاسخ‌های متفاوت ژن‌ها و گیاهان را در رویارویی با تنش سرمای بالای صفر و زیرصفر درجه سانتی‌گراد در سطوح فیزیولوژیکی و RNA مشخص می‌نماید و احتمالا کاهش بیان ژن‌های گلیکوزید-هیدرولاز را در جهت پاسخ و تحمل گیاه به تنش دمای پایین معرفی می‌کند. اما باتوجه به وجود تغییرات پس از رونویسی و پس از ترجمه، و عدم همبستگی بین رونویسی و ترجمه در بسیاری از مواقع، لزوم بررسی‌های گسترده در سطوح پروتئینی و فیزیولوژیکی- بیوشیمیایی در این گیاه به موازات مطالعه دیگر ژن‌های درگیر در شرایط تنش سرما بیش از پیش احساس می‌شود.



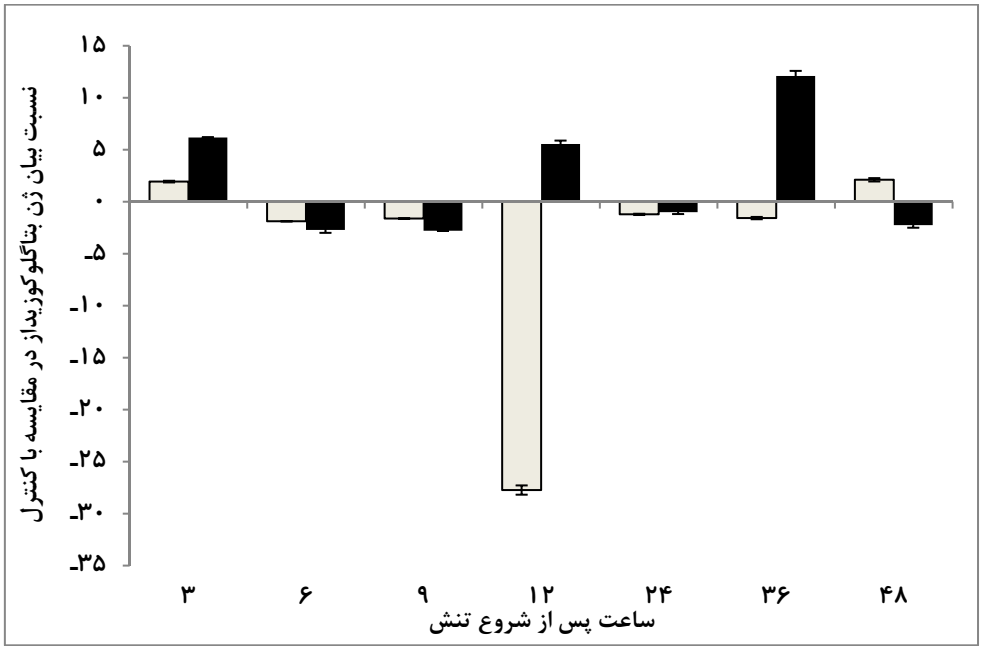
۱- منحنی تکثیر ژن خانه دار اکتین (سمت چپ) و ژن اختصاصی بتاگلوکوزیداز (سمت راست).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]



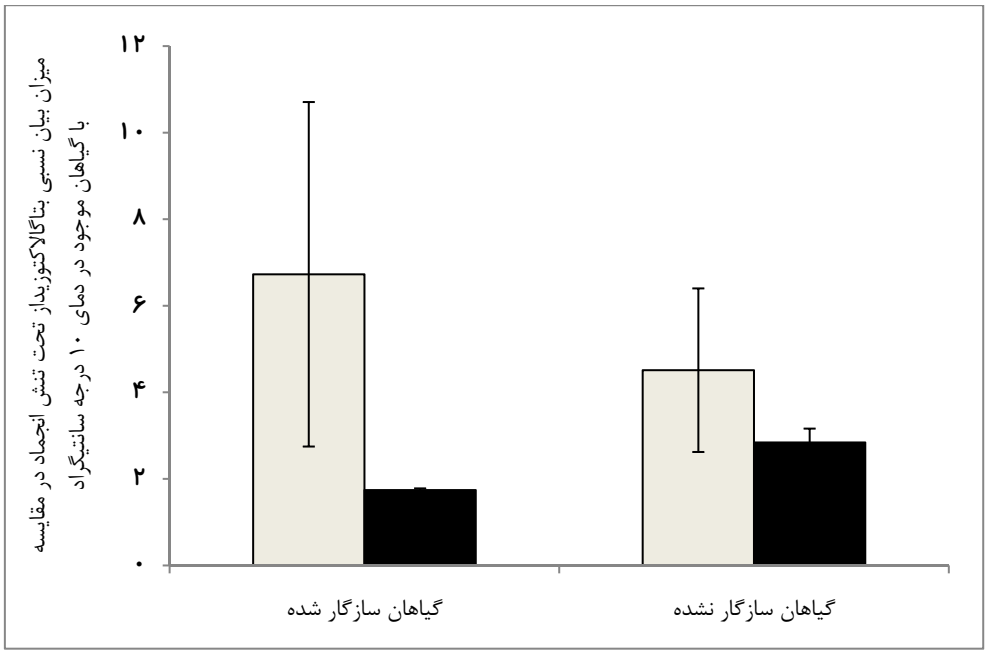
شکل ۲- بیان نسبی ژن بتاگالاکتوزیداز در دو ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ نخود. ستون‌های با رنگ روشن و تیره به ترتیب نشان دهنده ژنوتیپ‌های جم و ۴۳۲۲ می‌باشند.



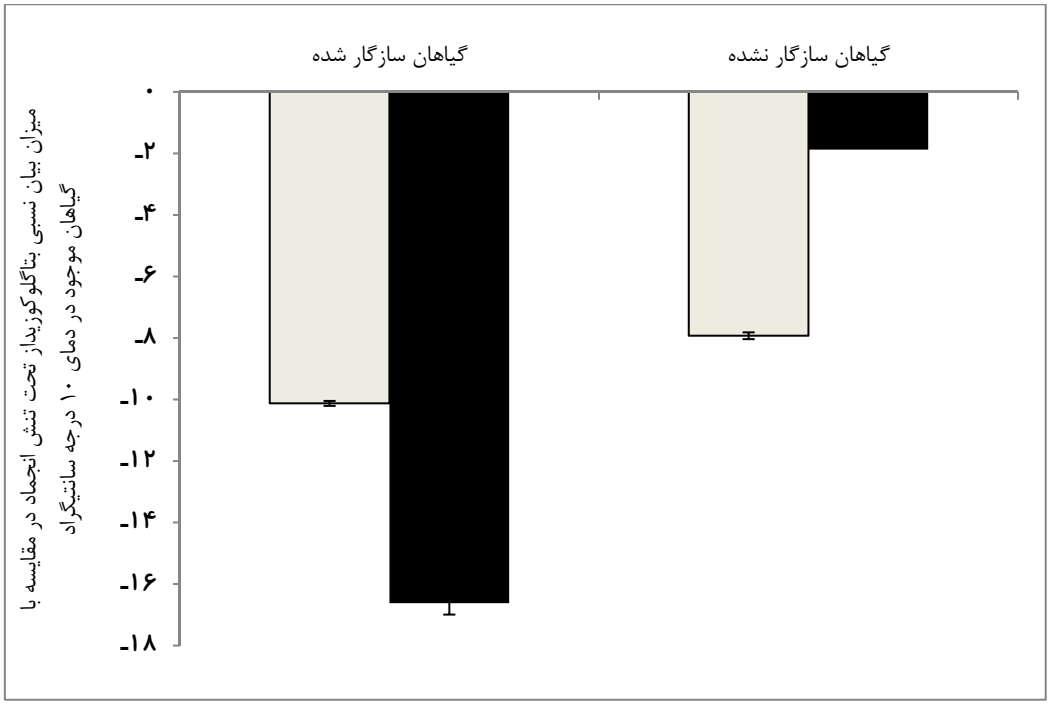
شکل ۳- بیان نسبی ژن بتاگلوکوزیداز در دو ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ نخود. ستون‌های با رنگ روشن و تیره به ترتیب نشان دهنده ژنوتیپ‌های جم و ۴۳۲۲ می‌باشند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]

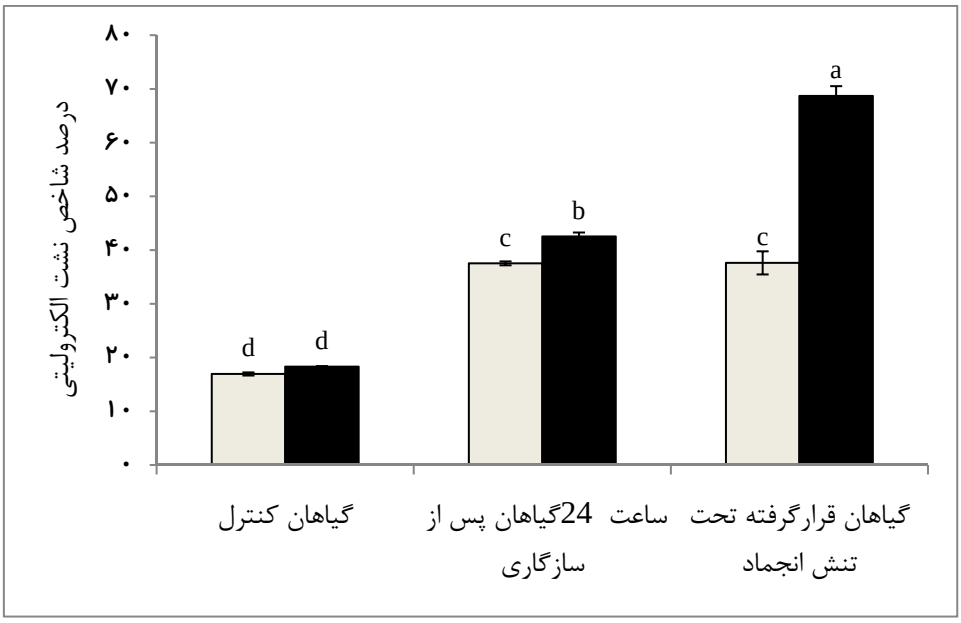


شکل ٤- سطح رونوشت ژن بتاگالاکتوزیداز در گیاهچه‌های انتقال یافته به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد در مقایسه با گیاهچه‌های حاضر در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت. ستون‌های با رنگ روشن و تیره به ترتیب نشان دهنده ژنوتیپ‌های جم و ٤٣٢٢ می‌باشند.



شکل ۵- سطح رونوشت ژن بتاگلوکوزیداز در گیاهچه‌های انتقال یافته به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد در مقایسه با گیاهچه‌های حاضر در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت. ستون‌های با رنگ روشن و تیره به ترتیب نشان دهنده ژنوتیپ‌های جم و ۴۳۲۲ می‌باشند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]



شکل۶- میزان شاخص نشت الکترولیتی در سه حالت شاهد، ۲۴ ساعت قرارگیری در دمای ۱۰ درجه و تحت تنش انجماد پس از ۲۴ ساعت سازگاری در دمای ۱۰ درجه. ستون‌های با رنگ روشن و تیره به ترتیب نشان دهنده ژنوتیپ‌های جم و ۴۳۲۲ می‌باشند.

منابع

۱. زعفرانیه م، نظامی ا، پارسا م، پرسا ح و باقری ع (۱۳۸۸) ارزیابی ژنوتیپ‌های نخود درکشت پاییزه در شرایط آبیاری تکمیلی در منطقه مشهد: ۲-اجزای عملکرد و عملکرد. مجله پژوهشهای زراعی ایران، جلد ۷، شماره۲: ۴۸۳-۴۹۲.

2. Ahn YO, Shimizu BI, Sakata K, Gantulga D, Zhou Z, Bevan DR and Esen A (2010) Scopolin hydrolyzing beta-glucosidases in roots of Arabidopsis. Plant and Cell Physiology Advance. Plant Cell Physiol. 51(1): 132-143.

3. Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. Science. 218: 443-448.

4. Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany, 55: 2331-2341.

5. Byun YJ, Kim HJ and Lee DH (2009). Long SAGE analysis of the early response to cold stress in Arabidopsis leaf. Planta, 229: 1181-1200.

6. Cushman JC and Bohnert HJ (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. Curr. Opin. Plant Biol, 3: 117-124.

7. Dietz KJ, Sauter A, Wichert K, Messdaghi D and Hartung W (2000). Extracellular B-glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. Journal of experimental botany, 51: 937-944.

8. Fernandez P, Rienzo JD, Fernandez L, Hopp HE, Paniego N. and Heinz RA (2008). Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. BMC Plant Biology, 8, 11 doi:10.1186/1471-2229-8-11.

9. Filippi DL, Fournier M, Cameroni E, Linder P, Virgilio CD, Foti M and Deloche O (2007) Membrane stress is coupled to a rapid translational control of gene expression in chlorpromazine-treated cells. Curr Genet, 52: 171-185.

10. Fowler S and Thomashow MF (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway, Plant Cell, 14: 1675-1690.

11. Gusta LV, Trischuk R and Weiser CJ (2007) Plant cold acclimation: The role of abscisic acid. J Plant Growth Regul, 24: 308-318.

12. Guy C. (1999). Molecular Responses of Plants to Cold Shock and Cold Acclimation. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1(2): 231-242.

13. Harding MM, Ward LG and Haymet ADJ (1999) Type I `antifreeze' proteins: Structureactivity studies and mechanisms of ice growth inhibition. Eur. J. Biochem, 264: 653-665.

14. Heidarvand L and Maali Amiri R (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress? Acta Physiol Plant, 32: 419-431.

15. Hidaka M, Fushinobu S, Ohtsu N, Motoshima H, Matsuzawa H, Shoun H and Wakagi T (2002) Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 b-galactosidase from thermus thermophilus a4 and the structure of its complex with galactose. J. Mol. Biol, 322: 79-91.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]

16. Jan N, ul-Hussain M and Andrabi KL (2009) Cold resistance in plants: A mystery unresolved. Electronic Journal of Biotechnology, doi: 10.2225/vol12-issue3-fulltext-3.
17. Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D and Bohnert HJ (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. The Plant Cell, 13: 889-905.
18. Ketudat Cairns JR and Esen A (2010) b-Glucosidases. Cell. Mol. Life Sci, 67:3389-3405.
19. Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X and Harper JF (2002) Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. Plant Physiology, 130: 2129-2141.
20. Kume S, Kobayashi F, Ishibashi M, Ohno R, Nakamura C and Takumi S (2005) Differential and coordinated expression of Cbf and Cor/Lea genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance. Genes & Genet. Systems, 80: 185-197.
21. Mahajan S and Tuteja N (2006) Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444: 139-158.
22. Mantri NL, Ford R, Coram TE and Pang ECK (2007) Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. Bio Med Cenral Genomics, 8: 303.
23. Minic Z (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases. Planta, 227: 723-740.
24. Nayyar H, Bains TS and Kumar S (2005). Chilling Stressed chickpea seedling: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environmental and Experimental Botany, 54: 275-285.
25. Oono Y, Seki M, Satou M, Iida K, Akiyama K, Sakurai T, Fujita M, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2006) Monitoring expression profiles of Arabidopsis genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. Funct Integr Genomics, 6: 212–234.
26. Opassiri R, Pomthong B, Akiyama T, Nakphaichit M, Onkoksoong T, Cairns Mk and Cairns JRK (2007) A stress-induced rice (Oryza sativa L.) β-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain. Biochem. J, 408: 241-249.
27. Park SJ, Huang Y and Ayoubi P (2006) Identification of expression profiles of sorghum genes in response to greenbug phloem-feeding using cDNA subtraction and microarray analysis. Planta, 223: 932-947.
28. Pfaffl MW (2007) Relative quantification in: Real-time PCR, Dorak M.T. (ed). Taylor and Francis Group. U.K.
29. Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res, 30(9): 36-46.
30. Popov VN, Orlova IV, Kipaikina NV, Serebriiskaya TS, Merkulova NV, Nosov AM, Trunova TI, Tsydendambaev VD and Los DA (2005) The effect of tobacco plant transformation with a gene for acyl- lipid Δ9-desaturase from Synechococcus vulcanus on plant chilling tolerance. Russian J. Plant Physiol 52: 664–668.
31. Riliang G, Li Z, Ying Z, Xiaoping C, Juan B, Jinfeng Z, Zhangying W, Junjie F, Tingsong L, Jianhua W and Guoying W (2006) Isolation of a maize beta-glucosidase gene promoter and characterization of its activity in transgenic tobacco. Plant Cell Rep, 25: 1157-1165.
32. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozakiy K and Sekiz M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Current Opinion in Plant Biology 6: 410-417.
33. Singh KB (1990) Winter chickpea: problems and potential in the Mediterranean region. Options Méditerranéennes - Série Séminaires, 9: 25-34.
34. Sperotto RA, Boff T, Duarte GL and Fett JP (2008) Increased senescence-associated gene expression and lipid peroxidation induced by iron deficiency in rice roots. Plant Cell Rep, 27: 183-195.
35. Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50: 571–599.
36. Udupa S, Sharma A, Sharma R and Pai R (1993) Narrow genetic variability in Cicer arietinum L. as revealed by RFLP analysis. J Plant Biochem Biotechnol, 2: 83-86.
37. Usadel B, Blasing OE, Gibon Y, Poree F, Hohne M, Gunter, M, Trethewey R, Kamlage B, Poorter H and Stitt M (2008) Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in Arabidopsis rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. Plant Cell and Environment, 31: 518-547.
38. Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG and Thomashow MF (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. Plant J, 41: 195-211.
39. Wang L, Li X, Zhao Q, Jing S, Chen S and Yuan H (2009) Identification of Genes Induced in Response to Low-Temperature Treatment in Tea Leaves. Plant Mol Biol Rep, 27: 257-265.
40. Wong CE, Labbe YLA, Guevara D, Nuin P, Whitty B, Diaz C., Brian Golding G, Gray GR, Weretilnyk EA, Griffith M and Moffatt BA (2006). Microarray Analysis of Abiotic Stress Responses. Plant Physiology Preview, DOI:10.1104/pp.105.070508.
41. Wu Z and Burns JK (2004) A b-galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of 'Valencia' orange (Citrus sinensis). Journal of Experimental Botany, 55: 1483-1490.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]

42. Yadav SS, Kumar J, Yadav SK, Singh S, Yadav VS, Turner NC and Redden R (2006) Evaluation of helicoverpa and drought resistance in desi and kabuli chickpea. Plant Genetic Resources, 4: 198-203.
43. Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA and Sun WN (2005) Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. Copyright 2005 by The american society for biochemistry and molecular biology, Inc.
44. Zhang SG, Han SY, Yang WH, Wei HL, Zhang M and Qi LY (2010) Changes in H_2O_2 content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of Larix leptolepis. Plant Cell Tiss Organ Cult, 100: 21-29

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.10.7]