

ارزیابی کمی الگوی بیان ژن سوکروز سینتاز تحت تنش سرما

در گیاه نخود

محمد رضا نظری^{۱*}، رضا معالی امیری^۲، سیده ساناز رمضانپور^۳

۱- به ترتیب 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: ۸۹/۶/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

دمای پایین یکی از عوامل محدود کننده‌ی رشد و پراکنش موجودات است. گیاهان در فرایند سازگاری به کمک تغییرات متابولیسم سلولی که در نتیجه تغییر بیان ژن‌ها حاصل می‌شود، نسبت به سرما پاسخ می‌دهند. در این پژوهش، میزان کمی رونوشت ژن سوکروز سینتاز به عنوان آنزیم مهم در پاسخ به تنش‌های غیر زنده و سوخت و ساز سلول، در کنار میزان نشأت الکترولیتی به عنوان شاخص خسارت غشای سلولی، در سه دمای ۱۰، ۲۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد و زمان‌های مختلف، در دو نوع نخود کابلی و دسی ارزیابی گردید. نتایج حاکی از تفاوت معنی‌دار بیان این ژن در زمان‌های قرارگیری نمونه‌ها در ۱۰ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین انتقال گیاهچه‌ها به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد، پس از ۲۴ ساعت سازگاری، تفاوت در پاسخ ژن و میزان خسارت غشایی در دو نوع ژنوتیپ را نشان داد. به طور کلی افزایش بیان ژن سوکروز سینتاز در دمای سازگاری که در بیشتر موارد با خسارت کمتر غشاء همراه بود و کاهش بیان آن در دمای انجماد، اهمیت سوکروز سینتاز را به عنوان یکی از ژن‌های موثر در فرایند سازگاری نمایان می‌سازد. بنابراین در دو ژنوتیپ نخود، وجود ارتباط بیان بیشتر ژن مذکور با خسارت کمتر غشاء محتمل است. این آزمایش، علاوه بر آشکار نمودن تفاوت در پاسخ ژنوتیپ‌های جم و ۴۳۲۲ در شرایط تنش، مدت زمان سازگاری را به عنوان عامل کلیدی در پاسخ این گیاهان مشخص کرد. همچنین تحت تنش سرما پاسخ پایدارتر و خسارت کمتر در ژنوتیپ جم نسبت به ژنوتیپ ۴۳۲۲ در سطح گلخانه‌ای مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

بیان کمی ژن،
تنش سرما،
سازگاری،
سوکروز سینتاز،
شاخص نشأت الکترولیتی

مقدمه

دمای پایین یکی از عوامل محدود کننده‌ی رشد و پراکنش گیاهان بوده و کیفیت و کمیت تولید گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳۶). رویارویی با دماهای پایین صفر تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد در طول فصل رشد برای گیاهان معمول است و چنین شرایطی می‌تواند ایجاد تنش نموده و بر عملکرد گیاهان تاثیر بگذارد (۳۷). تنش سرما سبب تغییر در ساختار غشاء و پروتئین‌ها و افزایش مواد محلول سمی می‌شود (۲۱). گیاهان با سازوکارهای متعددی به تنش‌ها پاسخ داده و بنابراین درجه‌های متفاوتی از تحمل را نشان می‌دهند (۱۲، ۳۶). این اختلاف فراوان در بین گیاهان در زمینه‌ی تحمل به دماهای مختلف از پاسخ وسیع در سطوح دیواره‌ی سلولی، غشای سلولی، اندامک‌ها، ریز ملکول‌ها، درشت ملکول‌ها و در نهایت بیان متفاوت ژن‌های مرتبط منشاء می‌گیرد (۱۱). به منظور مطالعه‌ی این مسیرها در جهت رسیدن به سطح مطلوب تحمل به تنش، تولید محصول، کیفیت بالا و سایر خصوصیات، بررسی پاسخ‌های گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. نخود (*Cicer Arietinum L.*) در رتبه بندی جهانی سومین (۳۸) و در کشور ما دومین لگوم خوراکی است. این گیاه حساس به سرما بوده و تحت تنش سرما تولید آن محدود می‌شود. مطالعه‌ی پاسخ‌های ژنتیکی گیاه نخود تحت شرایط کنترل شده می‌تواند به ارزیابی بهتر گیاهان و همچنین درک بعضی از سازوکارهای تحت تاثیر تنش کمک کند. گیاه نخود دارای تنوع مورفولوژیکی بالا ولی تنوع ژنتیکی ضعیف می‌باشد، به همین دلیل اصلاح این گیاه مشکل می‌باشد (۲۲، ۳۳). بنابر این یافتن رابطه‌ی بین پاسخ‌های مختلف گیاه در سطوح ژنتیکی و فیزیولوژیکی حائز اهمیت است. سنجش میزان اثر عوامل مختلف در تحمل به تنش‌های غیر زنده از روش‌های متعددی از جمله اندازه‌گیری سطوح رونویسی ژن‌ها (۲۲) و روش‌هایی در سطح فیزیولوژیکی گیاه (۳۹) انجام می‌پذیرد.

بسیاری از گیاهان قادرند تحملشان را نسبت به سرمای شدید با قرارگیری در معرض دماهای پایین بالای صفر ارتقا دهند، به این روند سازگاری^۱ به سرما گویند (۵). گیاهانی که به سرما سازگار

^۱ Acclimation

شده‌اند با کمک تغییراتی که در سازوکارهای سلولی ایجاد می‌کنند، بیان ژن‌های متعددی را تحت تاثیر قرار می‌دهند، همچنین موجب تغییر ترکیبات غشایی و تجمع آنتی اکسیدان‌ها و ماکروملکول‌های القا شده به وسیله‌ی تنش می‌شود (۱۳، ۳۵). اگرچه در پژوهش‌های پیشین، دمای سازگاری نخود حدود ۱۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (۲۳)، اما بهترین دمای سازگاری در گیاهان از گونه‌ای به گونه‌ی دیگر و حتی درون یک گونه بسته به تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی ژنوتیپ‌ها متفاوت است (۴). گیاهان با تغییر بیان ژن‌های متعدد، به تنش سرما پاسخ می‌دهند. اما شناخت دقیق و کاملی از پاسخ ژنتیکی و نقش ژنوم در این مسیر وجود ندارد (۸). بررسی بیان ژن‌ها تحت تنش سرما می‌تواند به طرز سودمندی توجه کننده‌ی تغییرات متابولیکی گیاه در جریان سازگاری به سرما باشد و محققان را در روشن شدن پاسخ‌های مختلف گیاهان هدایت کند (۸). یکی از آنزیم‌های مهم در تنظیم سوخت و ساز سلول، سوکروز سینتاز^۲ است که میزان تبدیل ساکارز به نشاسته را تا حدودی تعیین می‌کند (۳، ۱۵، ۱۷). این آنزیم تبدیل ساکارز به یوریدین دی فسفات گلوکز^۳ و فروکتوز^۴ را بر عهده دارد (۱۰). تبدیل ساکارز به نشاسته به طور معمول در بافت‌های غیر فتوسنتز کننده رخ می‌دهد. مطالعات نشان داده است که افزایش بیان سوکروز سینتاز موجب تغییر در بیان ژن‌های دخیل در فرایندهای متعددی مانند سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها، لیپیدها، بیوسنتز دیواره‌ها، تولید انرژی، تولید متابولیت‌های ثانویه، ساخت و حفاظت پروتئین‌ها و پاسخ به تنش‌ها می‌شود (۱۰). به طور کلی مشاهده شده است سوکروز سینتاز یکی از ژن‌هایی است که بیان آن در گیاهان تحت تنش سرما تغییر می‌کند (۷). در این پژوهش، میزان کمی بیان ژن سوکروز سینتاز در سطح RNA و همچنین مقدار خسارت وارده به غشای سلولی با کمک شاخص نشت الکترولیتی^۵ در فواصل زمانی اعمال تیمار سرمایی در دو نوع نخود دسی و کابلی ارزیابی گردید.

^۲ Sucrose Synthase^۳ UDP-Glucose^۴ Fructose^۵ Electrolyte Leakage Index

مواد و روش‌ها

شرایط رشد گیاهان و اعمال تنش

در این پژوهش دو نوع ژنوتیپ نخود دسی و کابلی ۴۳۲۲ (از ژنوتیپ‌های انتخابی از مناطق سردسیر کشور از اردبیل) و جم (از ژنوتیپ‌های زراعی محلی رایج در کشور (۱))، به ترتیب از کلکسیون بذر حبوبات بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران و موسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه تهیه شد. بذور با هیپوکلریت سدیم ده درصد به مدت پنج دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در ظروف پتری با رطوبت لازم قرار گرفت. ظروف پتری در شرایط بدون نور و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از جوانه زنی، گیاهچه‌ها به گلدان منتقل شدند. انتقال غیر مستقیم گیاه به خاک به دلیل اهمیت یکنواخت سبز شدن آنها و اجرای همزمان تیمار سرما در نمونه‌ها ضروری است. 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 ۷۵ درصد قرار داده شدند. نمونه‌گیری از برگ گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای انجام گرفت. 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 منتقل شدند. در فاصله‌های زمانی ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت پس از شروع تنش به دلیل جلوگیری از خطای حاصل از وجود برگ‌های بسیار جوان بالایی و برگ‌های پیر پایینی از قسمت‌های میانی گیاهان نمونه‌گیری برگ مرکب انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت یک گلدان از هر ژنوتیپ از دمای ۱۰ درجه به دمای ۱۰- درجه منتقل شد. برای جلوگیری از یخ زدگی 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 کنترل از هر گیاه و برای هر تیمار در همان لحظه‌ی نمونه‌گیری از گیاهان تحت تنش، از گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و جهت نگهداری به دمای ۸۰- منتقل

شدند. قبل از استخراج، گیاهچه‌های منجمد شده برای هر تیمار و رقم، در داخل هاون چینی همراه با ازت مایع، کاملاً کوبیده شد تا به پودر سبز رنگی تبدیل شدند.

استخراج RNA

به منظور استخراج RNA کل با روش بایوزول^۶ (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 کلروفورم 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 گردید، 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 میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد. نمونه‌ها تکان داده شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه و سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. مجدداً مایع رویی حذف شد و پس از خشک شدن الکل، رسوب RNA در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC^۷ حل شد. غلظت RNA هر استخراج به کمک اسپکتروفتومتر تعیین گردید. جهت تعیین کمیت RNA، بخشی از RNA به نسبت ۱:۱۰۰ 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 مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم در میکرولیتر محاسبه شد. از آنجایی که OD₃₂₀ میزان جذب زمینه و آلودگی‌های احتمالی را مشخص می‌کند بنابراین از OD₂₆₀ و OD₂₈₀ کسر شد تا نتایج نزدیک‌تر به واقعیت باشند.

$$\text{RNA (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times \text{dilution factor} \times 4$$

$$\text{Yield} = \text{OD}_{(260-320)} / \text{OD}_{(280-320)}$$

⁶ Biozol

⁷ Diethylpyrocarbonate

مخلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن به سرعت روی یخ سرد گردید. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر دی‌اکسی‌نوکلئوتری فسفات با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد RNase inhibitor (u) به هر تیوب افزوده گردید و حجم مخلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد قرار داده شدند. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به مخلول فوق اضافه شد و پس از مخلوط نمودن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به منظور غیر فعال نمودن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

طراحی آغازگر برای کمیت سنجی با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۸ طراحی آغازگرها برای ژن سوکروز سینتاز و ژن خانه دار آکتین^۹ با استفاده از نرم افزار پرایمر ۳ انجام شد. توالی، شماره دسترسی مورد استفاده در سایت NCBI و خصوصیات آغازگر ژن اختصاصی و ژن خانه‌دار در جدول (۱) ارائه شده است.

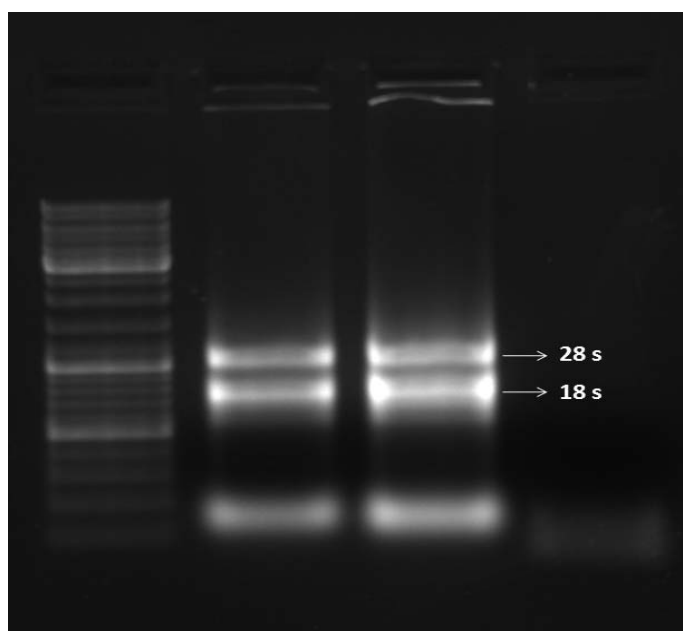
^۸ Real-time PCR

^۹ Actin

همچنین جهت تعیین کیفیت RNA نیز 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 (شکل ۱) تیمار DNase برای تمامی نمونه‌ها بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمتاز 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 مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تیوب‌ها جهت نگهداری، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

ساخت cDNA

جهت ساخت cDNA، از روش پیشنهادی شرکت فرمتاز برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. اولین رشته‌ی cDNA با کمک آغازگر الیگو دی‌تی (۲۰، ۱۸ نوکلئوتید) ساخته شد. مقدار ۵ میکرو لیتر از RNAی که با DNase تیمار گردیده بود، همراه با ۰/۵ میکروگرم آغازگر الیگودی تی (۲۰، ۱۸ نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم



شکل ۱- اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی ۱۸s و ۲۸s

جدول ۱- توالی و خصوصیات آغازگر سوکروز سینتاز و آکتین

نام ژن	توالی	دمای اتصال	طول محصول (bp)	شماره دسترسی
سوکروز سینتاز	5'-GATCCATCTCACTGGGACAA-3'	۵۸/۴۳	۱۶۰	DY475105.1
	5'-GATAACGGCGACTCTCAAGG-3'	۵۹/۸۴		
آکتین	5'-CTACGAATTGCCTGATGGAC-3'	۵۸/۱۷	۱۸۹	EU529707.1
	5'-CCTCCTGAAAGGACGATGTT-3'	۵۹/۱۴		

انجام روش QRT-PCR^{۱۱}

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 هر یک 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 مرز 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 سانتی‌گراد. در ارزیابی الگوی بیان ژن‌ها از دو روش ارزیابی مطلق و ارزیابی نسبی می‌توان استفاده نمود. در ارزیابی مطلق، تعداد دقیق رونوشت ژن در تمامی تیمارها حتی تیمار کنترل نیز مشخص می‌شود. ولی در ارزیابی نسبی، میزان افزایش یا کاهش بیان ژن در هر تیمار نسبت به تیمار کنترل به صورت نسبت بیان می‌شود که در این حالت امکان اندازه‌گیری میزان بیان ژن در تیمار کنترل وجود ندارد و به عبارتی ۱ در نظر گرفته می‌شود. به منظور افزایش دقت سنجش بیان نسبی در هر تیمار زمانی، نمونه‌گیری از گیاهان موجود در شرایط کنترل نیز صورت گرفت و میزان تغییرات بیان ژن در هر زمان نسبت به کنترل همان لحظه سنجیده شد. بنابراین بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید (۲۵) به این

صورت که هر تیمار با گیاهان کنترل مربوط به زمان خود مقایسه گردید و اعداد بالای صفر به معنی افزایش بیان و اعداد زیر نمودار به معنی کاهش بیان نسبی تلقی گردید. جهت تجزیه داده‌ها از نرم افزار REST^{۱۱} (۲۶) استفاده شد.

اندازه‌گیری تحمل به سرما براساس قابلیت نفوذپذیری غشاء سلولی گیاه

تحمل به سرما بر اساس شاخص نشت الکترولیتی بافت‌های خسارت دیده نخود بعد از تیمار سرما اندازه‌گیری شد (۱۴). شرایط رشد و نمونه‌گیری در بالا توضیح داده شد. این آزمایش با سه تکرار انجام شد. هشتاد میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ده سی‌سی آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلاء هوای درون محیط خارج شده و لوله‌های آزمایش به مدت سی دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند سپس میزان نشت الکترولیتی نمونه‌ها (EC1) 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 (EC2) تعیین شد و در نهایت مقدار شاخص خسارت

براساس فرمول $I = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100$ محاسبه گردید (۲۷، ۲۰).

نتایج و بحث

دو ژنوتیپ ۴۳۲۲ و جم در مرحله‌ی رشد گیاهچه‌ای تحت تنش کوتاه مدت ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد مطابق با مطالعات قبلی برای مطالعه‌ی پاسخ گیاهچه-

¹¹ Relative Expression Software Tool¹⁰ Quantitative Reverse Transcript PCR

های نخود در برابر دمای سازگاری انتخاب شد (۲۳، ۲۴). همانطور که گزارشات قبلی نشان می‌دهد سرما، خشکی و تنش شوری از جمله تنش‌هایی هستند که منجر به دهیدراسیون و تنش اسمزی شده و بیان آنزیم سوکروز سینتاز را تحریک می‌کنند (۹). با توجه به این که یکی از خسارت‌های تنش انجماد، اختلالات مربوط به دهیدراسیون و تنش اسمزی است (۲۱) و ژن سوکروز سینتاز نقش بسزایی در پاسخ به این نوع از تنش ایفا می‌کند، این ژن در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر اعمال این تیمار دمایی سبب تغییر بیان ژن سوکروز سینتاز در فواصل زمانی مختلف گردید.

تجزیه‌ی داده‌ها با کمک نرم افزار REST نشان داد که بیان ژن سوکروز سینتاز در فواصل زمانی پس از قرارگیری در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل در شرایط بدون تنش (۲۳ درجه سانتی‌گراد) نشان داده است (شکل ۲)، همچنین تغییر کمی بیان ژن در فواصل زمانی قرارگیری در معرض سرما، مدت زمان تنش را به عنوان عنصر کلیدی در مطالعه تحمل به تنش تعیین نمود. نتایج نشان می‌دهد که در پاسخ دو ژنوتیپ به دمای پایین تنوع وجود دارد. باتوجه به این که بیان ژن سوکروز سینتاز بیان سایر ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۰)، بنابراین الگوی موجود ممکن است به تخمین روند بیان ژن‌های دیگر دخیل در سازگاری کمک کند و بتواند توجیه کننده‌ی پاسخ‌های متمایز گیاه به تنش و احتمالاً تنوع در میزان فعالیت سایر ژن‌های مرتبط باشد.

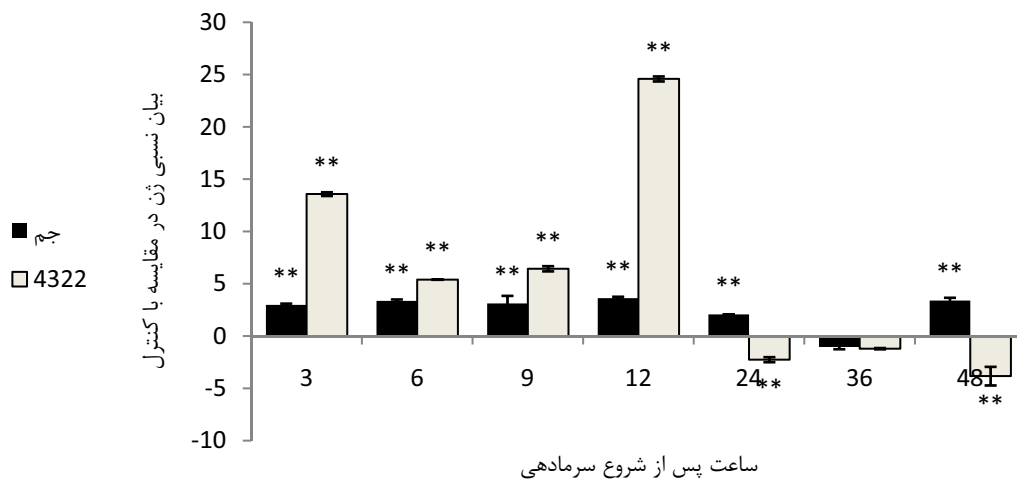
هنگامی که تنش به گیاهی وارد می‌شود ابتدا توسط گیرنده‌های غشایی دریافت می‌شود، سپس سیگنال به سمت پایین دست انتقال داده می‌شود و منجر به تولید پیام‌بر ثانویه می‌شود. این پیام‌برها یک برهم‌کنش پروتئینی وابسته به کلسیم را راه اندازی می‌نماید که با فسفریلاسون ملکول‌های مختلف منجر به هدف قرار دادن ژن‌های پاسخ دهنده به تنش یا عوامل رونویسی کنترل کننده‌ی این ژن‌ها می‌شود (۲۱، ۱۳). در این بین برخی از ژن‌ها سریع‌تر و برخی دیرتر نسبت به تنش وارد پاسخ می‌دهند. مثلاً بیان ژن‌ها تا ۱۲ ساعت پس از درک تنش را مربوط به پاسخ سریع گیاه و ۲۴ و ۴۸ ساعت، در مجموعه‌ی پاسخ‌های دیر هنگام

گیاه می‌باشد (۳۳). در این مطالعه پاسخ زود هنگام گیاه در بیان ژن سوکروز سینتاز، از ساعت سوم پس از تنش مشاهده شد که در ژنوتیپ ۴۳۲۲ میزان بیان حدود ۱۳ برابر و در جم حدود ۳ برابر نسبت به کنترل افزایش داشته است که این نوع بیان ژن در محدوده پاسخ سریع گیاه قرار می‌گیرد (۳۳). نتایج، آشکار می‌سازد که اختلاف بین بیان در ساعات مختلف پس از تنش، در ۴۳۲۲ بالا بوده است، در حالی که جم پایداری بیشتری در بیان این ژن، هم در پاسخ سریع و هم در پاسخ دیر هنگام نشان داده است. بیان ژن سوکروز سینتاز در هر دو ژنوتیپ، بعد از ۲۴ ساعت، نسبت به ۱۲ ساعت کاهش نشان می‌دهد، هرچند کاهش در جم نسبت به ۴۳۲۲ بسیار کمتر بوده است. همانگونه که در نمودار (شکل ۲) مشاهده می‌شود بیشترین بیان در ۴۳۲۲، در ساعت دوازدهم و کمترین میزان بیان، در ساعت چهل و هشتم مشاهده شده است. در حالی که در جم بیشترین بیان نیز در همان ساعت دوازدهم، اما کمترین بیان، بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری در معرض تنش مشاهده شد. در بعضی از پژوهش‌های گذشته، کاهش در بیان ژن سوکروز سینتاز در اثر تنش سرما گزارش شده است (۲۸، ۱۶). تغییرات زیاد در سطوح رونویسی در فواصل زمانی اعمال تنش در ژن‌های مختلف گزارش شده است (۲۹) و این نوع تغییرات دخیل در تحمل گیاهان به عامل تنش‌زا است. با توجه به این که ژن سوکروز سینتاز در مسیرهای مختلف بیوستیزی در سلول دخیل است بنابراین عملکرد آن، می‌تواند بر سایر ژن‌های درگیر در پاسخ گیاه به تنش ایفای نقش کند. به منظور ارزیابی میزان خسارت وارده به گیاهان، شاخص نشت الکترولیتی غشای سلول، به عنوان شاخص خسارت وارده به گیاه تحت این شرایط مطالعه شد. معالی امیری و همکاران (۲۰) تغییر خصوصیات غشای پلاسمایی سلول را عامل مهم تحمل به سرما در گیاهان بیان کردند. بعد از کاهش دما، ساختار غشای سلولی موقتاً تغییر وضعیت داده که بر قابلیت نفوذپذیری غشاء تأثیر می‌گذارد (۳۰، ۱۸). تغییر موقت وضعیت غشاء منجر به افزایش بیان ژن‌های تنظیم کننده در غشاء‌های سلولی از جمله ژن‌های دساتوراز می‌شود که نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع را به اشباع افزایش داده و منجر به برگشت سیالیت غشاء به حالت مایع

نماید. خسارت وارده بعد از ۳ ساعت اندکی بیشتر و بعد از ۱۲ ساعت اندکی کمتر از جم بوده است، اما پس از ۲۴ ساعت، خسارت کاملاً روند افزایشی داشته و شاخص نشت الکترولیتی به حدود ۴۲ و بعد از ۴۸ ساعت به نزدیکی ۶۴ می‌رسد، این در حالی است. که ژنوتیپ جم در روز دوم تنش نیز پایداری را حفظ کرده و خسارت را در حد فاصل ۳۰ تا ۴۰ نگه داشته است.

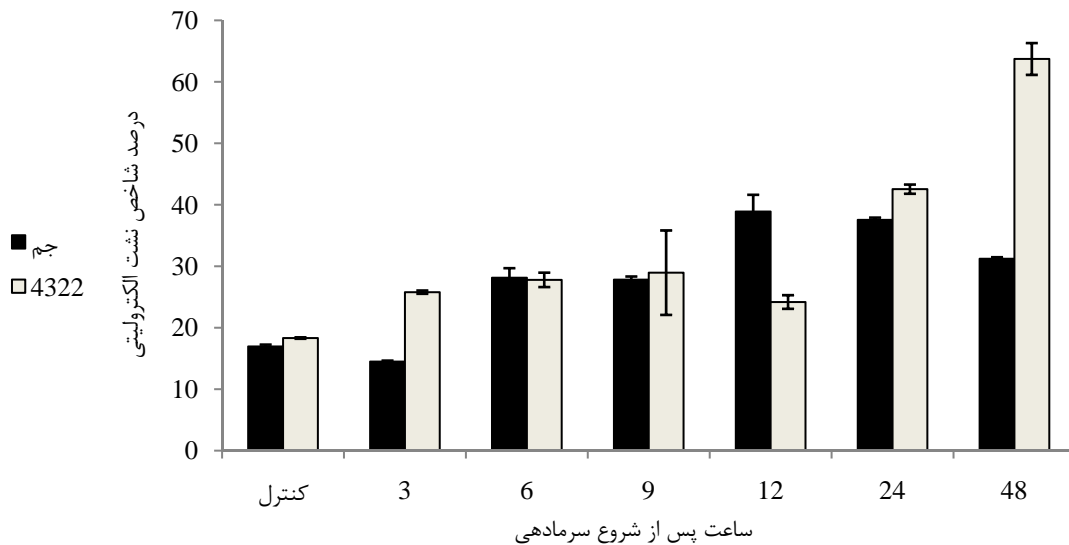
می‌شود (۱۹). بنابر این تحمل بیشتر در بعضی ژنوتیپ‌ها ممکن است در اثر پایداری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشاء باشد که باید در جزئیات بیشتر مطالعه شود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص نشت الکترولیتی نشان داد (شکل ۳) که ژنوتیپ ۴۳۲۲ توانست تا ۱۲ ساعت پس از شروع تنش میزان خسارت وارده بر غشاء را در سطوح پایین و در حدود شاخص بین ۲۰ تا ۳۰ حفظ

الگوی بیان دو ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲



شکل ۲- سطوح نسبی رونوشت ژن سوکروز سینتاز در مقایسه با کنترل تحت دمای ۱۰ درجه در دو ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲

شاخص نشت الکترولیتی



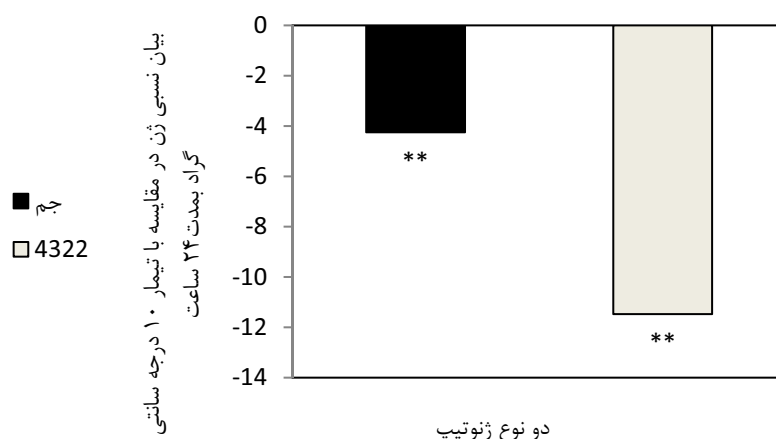
شکل ۳- میزان نشت الکترولیتی دو ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ تحت دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد

پایداری حفظ شده و شاخص نشت الکترولیتی به موازات بیان ژن مورد نظر ثابت مانده است. در تحقیقی بر روی چند واریته برنج، مشاهده گردیده است که گیاهچه‌های با میزان فعالیت بیشتر آنزیم سوکروز سینتاز تحمل بیشتری به تنش‌ها داشته‌اند، همچنین در ارقام با عملکرد بالاتر، میزان فعالیت آنزیم سوکروز سینتاز بالاتر بوده است، هرچند عوامل بسیاری در میزان عملکرد موثرند ولی این آنزیم به عنوان نشانگر شناخته شده است (۶). در این پژوهش نیز تا حدودی بیان پایداری و بیشتر این ژن با خسارت کمتر غشاء موازات دارد، اما به دلیل برهمکنش بسیاری از عوامل در پاسخ به تنش، بررسی عوامل بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

همانگونه که ذکر شد، دمای اعمال شده (۱۰ درجه سانتی‌گراد)، دمای سازگاری گیاهچه‌های نخود به سرماست و انتظار می‌رود گیاهان پس از قرارگیری در این شرایط، آمادگی بیشتری در رویارویی با دمای پایین‌تر نشان دهند. به منظور بررسی بیان ژن مورد نظر در دمای پایین‌تر، مطالعات تکمیلی با قرار دادن گیاهچه‌های سازگار شده در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد نیز انجام شد. نتایج، بیان‌کننده‌ی کاهش بیان ژن مورد نظر تحت دمای انجماد طی مدت ۱۵ دقیقه، در مقایسه با گیاهچه‌هایی است که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده‌اند. این کاهش بیان در ژنوتیپ ۴۳۲۲ بیشتر از جم بود (شکل ۴).

واضح است که همیشه ارتباط مستقیم و نزدیک بین میزان تولید رونوشت و آنزیم نیست و در بعضی از مطالعات از بین رفتن رونوشت و آنزیم تحت تنش گزارش گردیده است (۳۷). بنابراین به سختی می‌توان گفت که یک ژن خاص می‌تواند شاخص تحمل یک گیاه باشد. اما با توجه به این که غشاء اولین و یکی از مهمترین بخش‌های درگیر در پاسخ به تنش می‌باشد، گیاهان مقاومتر نسبت به تنش سرما شاخص خسارت کمتر غشایی را نیز بروز می‌دهند (۴). میزان شاخص نشت الکترولیتی به عنوان شاخص آسیب غشایی، تحت اثر پروتئین‌ها و متابولیت‌های متعدد درگیر در سوخت و ساز سلول که از بیان متفاوت ژن‌ها منشأ می‌گیرد قرار دارد. با توجه به نقش مهم ژن سوکروز سینتاز در پاسخ به تنش‌های محیطی (۲)، در کنار سایر ژن‌ها، شاید بتوان الگوی بیان سوکروز سینتاز را نشان دهنده بیان ژن‌های دخیل در پاسخ تحمل دانست. در این مطالعه پاسخ سریع گیاه از پاسخ دیر هنگام به خوبی متمایز شده است. همان‌گونه که در نمودار نشان داده شده است (شکل ۲)، بیشترین مقدار بیان در ۴۳۲۲ بعد از ۱۲ ساعت رویارویی با سرما رخ داده است، در همین زمان کمترین میزان شاخص نشت الکترولیتی نیز در این رقم مشاهده شد. در ادامه‌ی تنش، بیان سوکروز سینتاز در ۴۳۲۲ حتی در مقایسه با کنترل نیز کاهش نشان داده است و این با بیشترین میزان شاخص نشت الکترولیتی در ژنوتیپ ۴۳۲۲ مقارن است. در جم روند

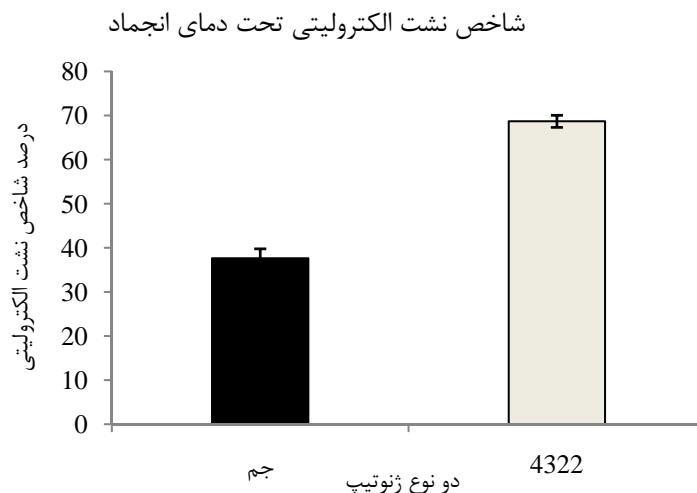
الگوی بیان دو ژنوتیپ، تحت دمای انجماد



شکل ۴- سطوح نسبی رونوشت ژن سوکروز سینتاز در گیاهچه‌های انتقال یافته به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد در مقایسه با گیاهچه‌های حاضر در دمای ۱۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت

ژنوتیپ جم پاسخ پایدارتر و خسارت کمتر در رویارویی با تنش سرما نسبت به ژنوتیپ ۴۳۲۲ در سطح گلخانه‌ای نشان داده است. تحت شرایط تنش دمایی ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، بیان ژن سوکروز سینتاز در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری نشان داده است. همچنین بین دو ژنوتیپ مطالعه شده، بین بیان بیشتر ژن مورد نظر با خسارت کمتر غشاء رابطه دیده شد و این نتایج با نتایج پژوهش‌های پیشین نیز هم‌خوانی دارد (۱۹، ۲۲). اگرچه ژن‌های بسیاری در ایجاد پاسخ به تنش نقش دارند (۲۹) و نمی‌توان یک ژن را به تنهایی عامل بروز تحمل به تنش دانست، اما این مطالعه نشان داد که ممکن است بین بیان ژن در سطح رونوشت و پاسخ به تنش در سطح فیزیولوژیکی رابطه وجود داشته باشد، به طوری که روند بیان ژن سوکروز سینتاز در ساعات مختلف تنش تقریباً با روند افزایش خسارت غشایی هم‌خوانی داشت. بنابراین شاید بتوان از بررسی بیان این ژن در انتخاب و تشخیص بهتر پاسخ‌های گیاه نخود در برابر تنش سرما، به عنوان نشانگر استفاده کرد که می‌تواند هم به کامل شدن و هم به هدایت دقیق‌تر برنامه‌های اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک در زمینه تنش‌های محیطی منجر شود. بنابراین به جهت مطالعات دقیق‌تر و بررسی ارتباط قوی‌تر بین سازوکارهای ملکولی و فیزیولوژیکی گیاهان، مطالعه‌ی ژن‌های متعدد درگیر در مسیرهای مختلف بیوسنتزی متابولیت‌ها در ارقام حساس و مقاوم و همچنین آزمایشات مزرعه‌ای پیشنهاد می‌شود.

اختلاف در میزان بیان می‌تواند از نوع و ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی منشأ بگیرد (۴). گزارش شده است بیان ژن‌های مختلف ممکن است در پاسخ به دماهای بالای صفر یا اختصاصاً در پاسخ به دماهای زیر صفر تغییر کند (۳۴). با توجه به کاهش توانایی گیاه بر رونویسی و تولید آنزیم‌های دخیل در پاسخ به تنش، از جمله سوکروز سینتاز در دمای انجماد، می‌توان به اهمیت قابلیت سازگاری گیاهان به سرما و آماده‌سازی میزان کافی از رونوشت و آنزیم، قبل از رویارویی با سرمای شدید پی برد. که نتایج شاخص نشت الکترولیتی نیز موید خسارت کمتر، علیرغم سنتز کمتر این ژن بوده است. البته نقش ژن‌های دیگر دخیل در تحمل به سرما نیز باید مد نظر قرار گیرد، که مطالعات بعدی می‌تواند به این فرضیه کمک کند. داده‌های حاصل از شاخص نشت الکترولیتی، نشان داد در اثر قرارگیری در معرض دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد، افزایش چندانی در شاخص نشت الکترولیتی ژنوتیپ جم رخ نداد، در حالی که شاخص نشت الکترولیتی برای ژنوتیپ ۴۳۲۲ به نزدیکی ۶۸ رسید. میزان شاخص خسارت ۵۰ درصد بافت گیاهی بعنوان مرگ گیاه در اثر عامل تنش در نظر گرفته می‌شود (۳۱). این نتایج حاکی از ایجاد تحمل بیشتر به دمای ۱۰- درجه سانتی-گراد در ژنوتیپ جم، به دلیل سازگاری در دمای ۱۰ درجه سانتی-گراد بوده، در حالی که به نظر می‌رسد دمای ۱۰ درجه شرایط کافی جهت سازگاری به دمای پایین‌تر را در ژنوتیپ دسی فراهم نمی‌آورد (شکل ۵). نتایج آزمایش فعلی نیز نشان می‌دهد که



شکل ۵- شاخص نشت الکترولیتی دو ژنوتیپ جم و ۴۳۲۲ در گیاهچه‌های انتقال یافته به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد

منابع

14. Hepburn HA, Naylor REL and Stokes DT (1986) Electrolyte leakage from winter barley tissue as indicator of winter hardiness. *Ann. Appl. Biol* 108: 164-65.
 15. Herbers K and Sonnewald U (1998) Molecular determinants of sink strength. *Curr. Opin. Plant Biol* 1: 207-216.
 16. Hesse H and Willmitzer L (1996) Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Mol Biol* 30: 863-372.
 17. Konishi T, Ohmiya Y and Hayashi T (2004) Evidence that sucrose loaded into the phloem of a poplar leaf is used directly by sucrose synthase associated with various β -glucan synthases in the stem. *Plant Physiol* 134: 1146-1152.
 18. Leshem Y (1992) *Plant membranes: A biophysical approach to structure, development and senescence*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
 19. Los DA and Murata N (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666: 142-157.
 20. Maali-Amiri R, Goldenkova-Pavlova IV, Pchelkin VP, Tsydendambaev VD, Vereshchagin AG, Deryabin AN, Trunova TI, Los DA and Nosov AM (2007) Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the $\Delta 12$ -desaturase gene from cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiol* 54: 678-685.
 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 Central Genomics* 8: 303.
 23. Nayyar H, Bains TS & 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.
 24. Nazari MR, Habibpour mehraban F, Maali amiri R, Zeinali khaneghah H (2010) Changes in physiological and biochemical responses of black chickpeas (desi type) following cold acclimation and freezing. *Russian journal of plant physiology* (In press).
 25. Pfaffl MW (2007) Relative quantification in: *Real-time PCR*, Dorak M.T. (ed). Taylor and Francis Group. U.K.
 26. 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.
 27. 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 $\Delta 9$ -desaturase from *Synechococcus vulcanus* on plant chilling tolerance. *Russian J. Plant Physiol* 52: 664-668.
 28. Salanoubat M and Belliard G (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent
1. زعفرانیه م، نظامی ا، پارسا م، پرساح و باقری ع (۱۳۸۸) ارزیابی ژنوتیپ های نخود در کشت پاییزه در شرایط آبیاری تکمیلی در منطقه مشهد: ۲-اجزای عملکرد و عملکرد. مجله پژوهشهای زراعی ایران، جلد ۷، شماره ۲: ۴۸۳-۴۹۲.
 2. Amani AF (2008) Activity of Sucrose Synthase and Acid Invertase in Wheat Seedlings During a Cold-shock Using Micro Plate Reader Assays. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2(1): 53-56.
 3. Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M and Delmer DP (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92: 9353-9357.
 4. Badea C and Basu SK (2009) The effect of low temperature on metabolism of membrane lipids in plants and associated gene expression. *Plant Omics Journal* 2(2): 78-84.
 5. Cook D, Fowler S, Fiehn O and Thomashow MF (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Plant biology* 101: 15243-15248.
 6. Counce PA and Gravois KA (2006) Sucrose Synthase Activity as a Potential Indicator of High Rice Grain Yield. *Crop Science* 46: 1501-1507.
 7. Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y and Liu J (2005) A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics* 5: 3162-3172.
 8. Deepak SA, Kottapalli KR, Rakwal R, Oros G, Rangappa KS, Iwahashi H, Masuo Y and Agrawal GK (2007) Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics* 8: 234-251.
 9. Fernandes FM, Arrabaca MC and Carvalho LMM (2004) Sucrose metabolism in *Lupinus albus* L. under salt stress. *Biol Plant* 48: 317-9.
 10. Fernandez EB, Munoz FJ, Montero M, Etxeberria Ed, Sesma MT, Ovecka M, Bahaji A, Ezquer L, Li J, Prat S and Romero JP (2009) Enhancing Sucrose Synthase Activity in Transgenic Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers Results in Increased Levels of Starch, ADPglucose and UDPglucose and Total Yield. *Plant Cell Physiol* 50(9): 1651-1662.
 11. Filippi LD, 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.
 12. Guy C (1999) Molecular Responses of Plants to Cold Shock and Cold Acclimation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* 1(2): 231-242.
 13. Heidarvand L and Maali Amiri R (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiol Plant* 32: 419-431.

on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. Gene 84: 181-185.

29. Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita T, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju, A, Sakurai T, Satou T, Akiyama K, Taji T, Shinozaki KY, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y and Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. The Plant Journal 31(3): 279-292.

30. Simon EW (1974) Phospholipids and plant membrane permeability. New Phytol 73: 377-420.

31. Sukumaran NP and Weiser CJ (1972) An excised leaflet test for evaluation Potato frost tolerance. HorScience 7: 467-468.

32. Sun MM, Li LH, Xie H, Ma RC and He YK (2007) Differentially Expressed Genes under Cold Acclimation in *Physcomitrella patens*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 40: 986-1001.

33. 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.

34. Usadel, B., Blasing, O.E., Gibon, Y., Poree F., Hohne, M., Gunter, M., Trethewey, R., Kamlage, B., Poorter, H., 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.

35. Xin Z and Browse J (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Plant Cell Environ 23: 893-902.

36. Xin Z, Mandaokar A, Chen J, Last RL and Browse J (2007) Arabidopsis ESK1 encodes a novel regulator of freezing Tolerance. The Plant Journal 49: 786-799.

37. Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA and Sun WN (2005) Comparative Proteomic Analysis Provides New Insights into Chilling Stress Responses in Rice. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

38. Yau SK (2005) Optimal sowing time and seeding rate for winter-sown, rain-fed chickpea in a cool semi-arid Mediterranean area. Aust. J. Agric. Res 56: 1227-1233.

39. Zhang XY, Liang C, Wang GP, Luo Y and Wang W (2010) The protection of wheat plasma membrane under cold stress by glycine betaine overproduction. Biologia Plantarum 54 (1): 83-88.

