

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

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

علی مبارکی^۱، رضا شیرزادیان خرم‌آباد^{۱*}، بابک ربیعی^۱، محمدمهدی سوهانی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران، دانشیار، دانشگاه گیلان

Mobaraki M¹, Shirzadian-Khorramabad R^{*1}, Rabiei B¹, Sohani MM¹

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

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

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

چکیده

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

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
تنش سرما
موتانت آراییدوپسیس

FRY1
GST1

مقدمه

رشد و بقا گیاهان عموماً تحت تاثیر تنش های محیطی چون خشکی، شوری، درجه حرارت تغییر می کند. سرما بعنوان یکی از تنش های محیطی در گسترش جغرافیایی گیاهان از اهمیت ویژه ای برخوردار است. گیاهان از مکانیسم های متعدد فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی جهت سازگاری به سرما استفاده می کنند (Rahaii et al. 2010). این مکانیسم ها نه تنها به طول دوره تنش بستگی دارد، بلکه به مرحله نموی و پارامترهای مورفولوژیکی-آناتومیک گیاه در زمان تنش نیز وابسته است (Achard et al. 2008). شناسایی و بررسی عملکرد ژن های القا شونده با تنش¹ که در فرایند تنظیم تحمل گیاه به تنش های محیطی موثر است، در شناخت بیولوژی مولکولی و به نژادی گیاهان زراعی و رسیدن به تولید پایدار از اهمیت ویژه ای برخوردار است. ژن (*FRY1*) نقش مهمی در تنظیم واکنش گیاهان برعلیه تنش های محیطی از قبیل تنش شوری، خشکی و تنش سرما دارد. ژن *FRY1* رمز کننده یک آنزیم با دو کارکرد شامل ۲، ۳ و ۵ بیس فسفات نوکلئوتیداز² و اینوزیتول پلی فسفات ۱- فسفاتاز³ می باشد (Xiong et al. 2004). *FRY1* از جمله ژن های موثر بر بیان ژن های تنظیم کننده رونویسی واکنش به سرما در گیاه آراییدوپسیس به شمار می رود. مطلب فوق با بررسی میزان بیان ژن های *CBF*⁴ در گیاهان موتانت *hos2*⁵ و وحشی *FRY1/HOS2* به اثبات رسیده است (Xiong et al. 2004).

پروتئین *GST1*⁶ یکی از اعضای خانواده آنزیم های چند عملکردی⁷ می باشد که اتصال تری پپتیدی (-L-glutamyl-L-γ-cysteinyl-L-glycine) را به مولکول های الکترون دوست کاتالیز می کنند. در مجموع وظیفه اصلی پروتئین های *GST* سم زدایی سلول به وسیله تخریب عوامل سمی درونی و بیرونی است تا جایی که القای بیان *GSTs* در گیاهان مختلف به محض ایجاد

خسارت و همچنین در واکنش به تیمار آزن، پرکسید هیدروژن، گلوتاتیون، آفات زنده، هورمون های گیاهی، فلزات سنگین، شوک حرارتی، خشکی، زخم و پیری گزارش شده است. نقش حیاتی پروتئین های *GST* به وسیله حضور گسترده آنها در سلول های یوکاریوت و پروکاریوت نشان داده شده است (Edwards et al. 2000). اعضای خانواده ژنی *GST* در واکنش به تنش های زیستی و غیرزیستی به صورت انفرادی و متفاوت از هم تنظیم می شوند. این موضوع بر نقش های متفاوت آنها در متابولیسم های درونی گیاه اشاره دارد (Maxwell et al. 1999). *GST1* از جمله اعضای مهم این خانواده محسوب می شود که افزایش فعالیت آن در واکنش به تنش اکسیداتیو به اثبات رسیده است (Love et al. 2005).

گیاهان موتانت سبز⁸ *sgm164* (*Stay green Mutant 164*) از یک جمعیت موتانت های EMS⁹ در آراییدوپسیس شناسایی و انتخاب شد (Shirzadian-Khoramabad et al. 2010). بر اساس بررسی های انجام شده موتاسیون مذکور یک صفت منوهیبرید و مغلوب است. موقعیت مکانی موتاسیون فوق در ژنوم آراییدوپسیس با استفاده از روش MAP-Based Cloning (Jander 2002) و با بهره گیری از مارکرهای ملکولی¹⁰ *SSLP*¹¹، *CAPS* و *SNP*¹² در قسمت پایین و انتهایی کروموزوم شماره ۵ گیاه آراییدوپسیس و در لینکاژ با ژن *FRY1* که یک ژن کلیدی در واکنش به تنش های محیطی در آراییدوپسیس محسوب می شود مکان یابی شد. فنوتیپ پیری برگ در گیاهان موتانت که تحت تیمار تنش اتیلن قرار گرفته اند به نحو معنی داری در مقایسه با گیاهان وحشی *Landsberg erecta* (*Ler-0*) به تاخیر افتاد. لذا به این گیاهان موتانت سبز اطلاق شد. احتمالاً وقوع موتاسیون در یکی از ژن های کنترل کننده پیری در آراییدوپسیس موجب تاخیر روند پیری در برگ های گیاهان موتانت شده است (Shirzadian-Khoramabad et al. 2010). در این تحقیق برخی خصوصیات فنوتیپی از قبیل وزن تر

⁸ Stay green mutant plants

⁹ Ethyl methanesulfonate

¹⁰ Simple sequence length polymorphism

¹¹ Cleaved amplified polymorphic sequences

¹² Single nucleotide polymorphism

¹ Stress-induced genes

² 3'(2') 5'-bisphosphate nucleotidase

³ Inositol polyphosphate 1-phosphatase

⁴ C-repeat binding factors

⁵ High expression of osmotic stress-regulated gene expression2

⁶ Glutathione S-transferases1

⁷ Multiple function

جهت انجام Real Time RT-PCR با استفاده از نرم افزار PerlPrimer v.1.1.10 طراحی و جهت ساخت توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) سفارش داده شد. هر واکنش تکثیر Real Time حاوی ۲۵ µl بود و حاوی ۱۲/۵ µl SYBG Master MIX (Green Fermentase)، ۲ µl از cDNA و مقدار ۲ µl از آغازگرهای اختصاصی ژنهای *GST1* (*AT5G63980*) *FRY1* (*AT1G02930*) و *ACTIN2* (*AT3G1878*) و مابقی آن آب دوبار تقطیر بود. از ژن رفرنس *ACTIN2* جهت نرمال سازی داده ها استفاده شد. جهت تجزیه و نرمال سازی داده ها و رسم گراف ها از نرم افزار genex 2004 متعلق به شرکت BIORAD (USA) استفاده شد. دستگاه مورد استفاده جهت انجام واکنش تکثیر CFX96-BIORAD (USA) مورد استفاده قرار گرفت. برنامه PCR در این واکنش ها به صورت وارشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه در چرخه اول و سپس در ۴۰ چرخه بعدی وارشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه انجام شد. سپس منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت.

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

کد رشد	مشخصات
1.00	باز شدن کامل کوتیلدون ها
3.20	حجم روزت به ۲۰ درصد از حجم نهایی رسیده باشد.
5.10	اولین غنچه ی گل قابل دیدن باشد.
6	رشد غنچه ی گل
6.00	باز شدن اولین گل
6.10	۱۰ درصد از گل های تولیدی باز شده باشند.
6.90	گل دهی کامل شده باشد.
8	اولین غلاف باز شود.

نتایج و بحث

تجزیه داده های به دست آمده از مقایسه طول ساقه اصلی گیاهچه های جهش یافته و وحشی *Ler-0* که به مدت ۱۷ روز در دمای ۲۳ °C و طول روز ۱۶ ساعت و سپس به مدت ۶۵ روز در دمای ۴ °C نگهداری شدند نشان داد که طول ساقه اصلی

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

مواد و روش ها

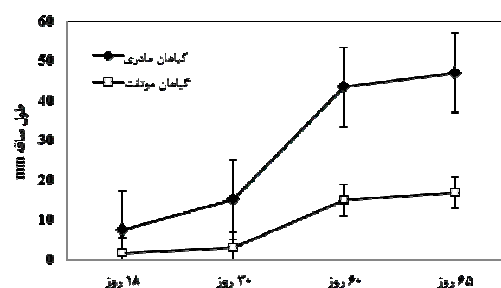
این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۹۱ انجام شد. جهت رشد و نمو آراییدوپسیس در شرایط کنترل شده، بذور آراییدوپسیس در خاک مناسب کشت و بعد از ۳ روز نگهداری در تاریکی و دمای ۴ °C به شرایط طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۲ °C در اتاقک رشد منتقل شده و به مدت ۱۷ روز در این شرایط نگهداری شدند. به منظور بررسی فنوتیپی گیاهان موتانت سبز (*Ler-0*) و وحشی (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010) تحت تنش سرما، گیاهچه ها به شرایط دمای ۴ °C و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی انتقال و تا رسیدن به مرحله ی پایانی رشد در این شرایط نگهداری شدند و مدت زمان لازم جهت کامل شدن مراحل مختلف رشدی بر اساس روش تجزیه مورفولوژیکی آراییدوپسیس بر مبنای مراحل رشد (Boyes et al. 2001) (جدول ۱) تعیین و اندازه گیری شد. خصوصیات ظاهری و مورفولوژیکی گیاهان مورد بررسی در هر یک از مراحل مختلف رشدی مطابق با مقاله فوق اعمال شد. در طول مدت رشد گیاهچه ها در شرایط تیمار سرما، خصوصیات فنوتیپی گیاهچه ها از قبیل وزن تر شاخساره، وزن تر ریشه، طول ساقه گل دهنده و طول دوره رشد، در سه نوبت ۱۸، ۶۵ و ۱۰۷ روز بعد از تیمار سرما در سه تکرار بررسی شد. تجزیه داده های آزمایشی به صورت اسپلیت پلات در زمان بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار SAS 9 و Excel 2010 انجام شد. جهت مطالعه میزان بیان ژن های مورد نظر در زمان های صفر، ۳ و ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار سرما (۴ °C) از برگ های گیاهچه ها نمونه گیری شد و سپس جهت استخراج RNA از نمونه ها از کیت RNX-plusTM (سینا ژن) استفاده شد. نسخه های تک رشته ای cDNA با استفاده از 200U RevertAid H- از minus MMuLV transcriptase (Fermentase) و یک آغازگر الیگو dT ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی مطابق (جدول ۲)

و با گیاهچه‌های وحشی *Ler-0* که فاقد موتاسیون نقطه‌ای *sgm164* هستند مقایسه شدند.

با افزایش سن گیاهان، وزن تر کل در گیاهچه‌های هر دو ژنوتیپ با شیب مناسبی افزایش یافت، ولی همواره مقدار وزن تر - کل در ژنوتیپ وحشی (*Ler-0*) از گیاهان موتانت بیشتر است (شکل ۳-الف) (جدول ۳). به نحوی که میانگین وزن تر گیاهچه‌های وحشی *Ler-0* در زمان ۶۵ روز با میانگین وزن تر گیاهچه‌های موتانت در زمان ۱۰۷ روز (۱۵۰۰ میلی گرم) برابر بود. داده‌های جدول ۴ نشان می‌دهد که صفت وزن تر کل دارای اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد برای متغیر ژنوتیپ است. همچنین صفت فوق اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد را برای متغیر زمان نمونه‌برداری نشان می‌دهد. نتیجه فوق اثبات می‌کند که موتاسیون نقطه‌ای مذکور در گیاهچه‌های جهش‌یافته موجب کاهش عملکرد وزنی این گیاهچه‌ها در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی *Ler-0* تحت تنش سرما می‌شود. این نتایج با مطالعات انجام شده که به بررسی فنوتیپ موتاسیون *hos2* تحت تنش سرما پرداخته‌اند، مطابقت دارد (Xiong et al. 2004).

وزن تر شاخساره در گیاهان وحشی *Ler-0* و موتانت با افزایش سن گیاه بطور چشمگیری افزایش می‌یابد (شکل ۳-ب). این در حالی است که بین وزن تر شاخساره ژنوتیپ‌های مورد بررسی شامل گیاهان وحشی *Ler-0* و گیاهان موتانت در بازه‌های زمانی مختلف اختلاف چشمگیر و معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴). به‌طوری که متوسط وزن شاخساره گیاهان وحشی *Ler-0* بعد از ۱۰۷ روز به میزان ۱۲۰۰ میلی گرم رسید، ولی وزن شاخساره گیاهان موتانت در سن مشابه حدود ۶۰۰ میلی گرم به این معنی که وزن تر شاخساره گیاهان موتانت در سن ۱۰۷ روزگی نصف وزن تر شاخساره گیاهان وحشی *Ler-0* است. بنابراین فعالیت سیستم‌های سنتز کننده مواد غذایی در گیاهان موتانت به نحو قابل توجهی دچار کاهش شده است. لذا با توجه به کاهش چشمگیر وزن شاخساره گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان وحشی در تنش سرما اعمال شده می‌توان موضوع حساسیت قابل توجه گیاهان موتانت به تنش سرما مجدداً مورد تایید قرار می‌گیرد.

ژنوتیپ جهش‌یافته نسبت به ژنوتیپ وحشی *Ler-0* به طور معنی‌داری در مراحل مختلف رشد کاهش یافته است. تفاوت طول ساقه اصلی گیاهان وحشی *Ler-0* با گیاهان موتانت با افزایش دوره رشد و نمو و سن گیاهان ادامه و افزایش می‌یابد. به‌طوری که اختلاف طول ساقه اصلی گیاهان وحشی *Ler-0* با گیاهان موتانت بعد از ۶۰ و ۶۵ روز به میزان ۳۲ میلی متر رسید (شکل ۱ و ۲) (جدول تجزیه واریانس به علت محدودیت فضای مقاله نشان داده نشده است). روند کاهشی اندازه طول ساقه و سرعت رشد در گیاهان موتانت نشان‌دهنده حساسیت بیشتر این گیاهان به تنش سرما است.



شکل ۱- مقایسه طول ساقه گل‌دهنده در زمان‌های مختلف تحت تنش تنش سرما در آرابیدوپسیس



شکل ۲- فنوتیپ گیاه *Ler-0* و موتانت بعد از ۶۵ روز تیمار سرما ۴ °C

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

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این آزمایش

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

جدول ۳- تجزیه واریانس بررسی وزن تر کل در گیاهچه های جهش یافته و وحشی (*Ler-0*) تحت تیمار سرمای ۴ °C در زمان های مختلف

منبع تغییر	درجه آزادی	SS	MS	F
تکرار	۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۴	۰/۰۶ ^{ns}
ژنوتیپ	۱	۱/۰۱۴	۱/۰۱۴	۱۳/۹۶*
تکرار × ژنوتیپ	۲	۰/۱۰۴	۰/۰۵	۰/۷۳ ^{ns}
زمان	۲	۷/۸۲	۳/۹۱	۵۳/۸۱**
ژنوتیپ × زمان	۲	۰/۲۸	۰/۱۴	۱/۹۹ ^{ns}
تکرار × زمان	۴	۰/۰۸۶	۰/۰۲۱	۰/۳ ^{ns}
خطای آزمایش	۴	۰/۲۹	۰/۰۷۲	
کل	۱۷	۹/۶۱		

ns، * و ** به ترتیب عدم تفاوت معنی دار و تفاوت معنی دار در سطوح پنج درصد و یک درصد.

جدول ۴- تجزیه واریانس بررسی وزن تر شاخساره در گیاهچه های جهش یافته و وحشی (*Ler-0*) تحت تیمار سرمای ۴ °C در زمان های مختلف

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

ns، * و ** به ترتیب عدم تفاوت معنی دار و تفاوت معنی دار در سطوح پنج درصد و یک درصد.

همان طور که در قسمت های (الف)، (ب) و (ج) از شکل ۳ مشاهده می شود، وزن تر ژنوتیپ وحشی (*Ler-0*) همواره بیشتر از ژنوتیپ موتانت است. ولی این روند در نمودار قسمت (د) متفاوت می باشد (شکل ۳). بدین معنی که روند نسبت وزن تر شاخساره بر وزن تر ریشه در گیاهان جهش یافته در مقایسه با گیاهان وحشی *Ler-0* افزایشی است. به بیان ساده تر جهش موجب کاهش وزن ریشه شده و در واقع علت کاهش وزن تر ریشه احتمالاً به علت کاهش میزان ریشه های فرعی در گیاهان موتانت است که این وضعیت در موتاسیون *ron1-1* نیز مشاهده می شود (Robles et al. 2010).

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

مقایسه گیاهچه ها از لحاظ وزن تر ریشه روند تغییرات در رشد وزن تر ریشه نیز همانند الگوی وزن تر کل و وزن تر شاخساره می باشد و میزان وزن تر ریشه همواره در گیاهچه های موتانت کمتر از وزن تر ریشه گیاهچه های وحشی *Ler-0* می باشد (شکل ۳-ج) (جدول ۵). این در حالی است که بین وزن تر ریشه ژنوتیپ های مورد بررسی شامل گیاهان وحشی *Ler-0* و گیاهان موتانت در بازه های زمانی مختلف اختلاف چشمگیر و معنی داری وجود دارد (جدول ۵). بنابراین وقوع موتاسیون موجب کاهش توسعه و رشد ریشه و کاهش تحمل گیاهچه ها در مواجهه با تنش سرما شده است. لذا گسترش ریشه در زمینه استقرار مناسب گیاهان و جذب مواد غذایی سهم و اهمیت زیادی در میزان تحمل گیاهان در مقابل تنش های محیطی دارد. احتمالاً وقوع موتاسیون بطور مستقیم و یا غیر مستقیم بفرعالت ژن های موثر بر توسعه ریشه موثر است.

جدول ۵- تجزیه واریانس بررسی وزن تر ریشه در گیاهچه‌های جهش یافته و وحشی (*Ler-0*) تحت تیمار سرمای 4°C در زمان‌های مختلف

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

ns، * و ** به ترتیب عدم تفاوت معنی دار و تفاوت معنی دار در سطوح پنج درصد و یک درصد.

آرآبیدوپسیس بر مبنای مراحل رشد (Boyes et al. 2001) نسبت به گیاهچه‌های وحشی *Ler-0* متفاوت است. همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود سرعت رشد گیاهچه‌های جهش یافته نسبت به گیاهچه‌های وحشی کمتر بوده، به نحوی که گیاهچه‌های جهش یافته برای کامل کردن مراحل نمو به زمان بیشتری نیاز دارند (شکل ۴). مرحله گل دهی گیاهچه‌های جهش یافته ۱۸ - روز دیرتر رخ می‌دهد و مجموعاً گیاهچه‌های جهش یافته ۳۵ روز نسبت به گیاهچه‌های وحشی جوان تر هستند. با توجه به این که گیاهان موتانت در شرایط طول روز ۱۶ ساعت و دمای 22°C و تحت تنش اتیلن از ژنوتیپ *Ler-0* جوان تر بوده و روند رشد و توسعه در این گیاهان کندتر است (Shirzadian, Khorramabad et al. 2010)، لذا موتاسیون نقطه‌ای *sgm164* در ژنی رخ داده که تغییر فعالیت آن در اثر موتاسیون موجب کندی رشد و افزایش حساسیت گیاهان موتانت به شرایط تنش سرما شده است (شکل ۴). روند مشابهی در زمینه کاهش رشد و نمو و حساسیت بیشتر گیاهان موتانت *hos2* که حاوی یک موتاسیون نقطه ای در *FRY1* به تنش سرما رخ داد (Xiong et al. 2004). بررسی میزان نسبی بیان ژنهای *FRY1* و *GSTI* با استفاده از روش QPCR^۱ با توجه به این که ژن *FRY1* از جمله ژنهای واکنش گر به تنش می‌باشد و تغییر میزان بیان و فعالیت آن در گیاهان موتانت بر واکنش گیاهان به تنش‌های محیطی بطور

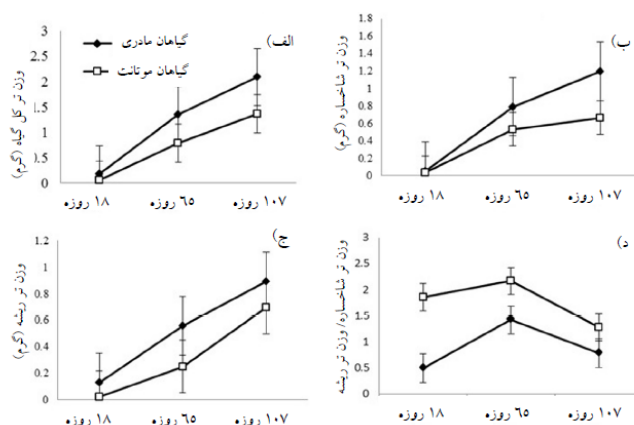
چشمگیری موثر است (Xiong et al. 2004). تغییر در میزان بیان فعالیت این ژن موجب تغییر میزان بیان طیف گسترده‌ای از ژن-های واکنش گر به تنش‌های سرما از قبیل *CBFs* (Xiong et al. 2004) می‌شود. لذا میزان بیان این ژن در گیاهچه‌های وحشی *Ler-0* و موتانت در شرایط نرمال و زمان‌های مختلف پس از تیمار سرما مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان این ژن در گیاهان موتانت در زمان شاهد و ۱۲ ساعت پس از تیمار سرما از کاهش چشمگیری در مقایسه با گیاهان وحشی برخوردار است. همچنین بعد از گذشت ۷ روز تیمار سرما میزان بیان آن در گیاهچه‌های وحشی *Ler-0* به میزان دو برابر بیشتر از گیاهچه-های جهش یافته رسید (داده‌ها نشان داده نشده) که این میزان در مقایسه با میزان بیان ژن قبل از اعمال تیمار سرما بسیار بیشتر بود (شکل ۵). لذا بیان ژن *FRY1* در زمان‌های مختلف تیمار سرما با تغییرات قابل توجهی همراه بود. این مطلب با نتایج تحقیقات انجام شده که گویای فعالیت پروتئین *FRY1* در واکنش‌های کوتاه مدت و بلند مدت گیاه به تنش سرما است (Xiong et al. 2004) است.

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

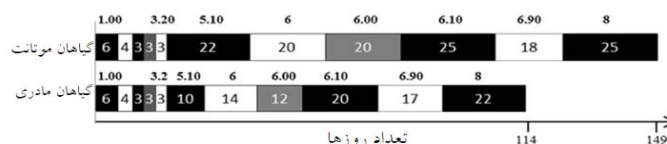
نتیجه‌گیری

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

^۱ Quantitative real time PCR



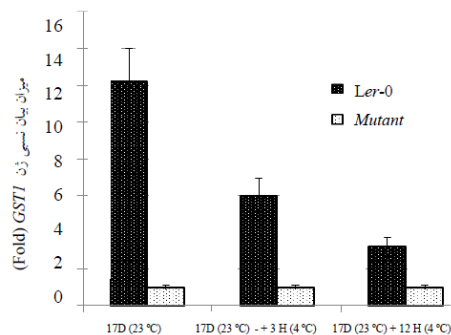
شکل ۳- مقایسه ۳ صفت مورفولوژیکی گیاهچه ها در روزهای بعد از تیمار سرما (الف) وزن تر کل گیاهچه؛ (ب) وزن تر شاخساره گیاهچه؛ (ج) وزن تر ریشه گیاهچه و (د) نسبت وزن تر شاخساره گیاهچه به وزن تر ریشه. محور افقی تعداد روزهای بعد از اعمال تیمار سرما در گیاهچه های ۱۷ روزه را نشان می دهد. تعداد تکرار در هر نمونه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



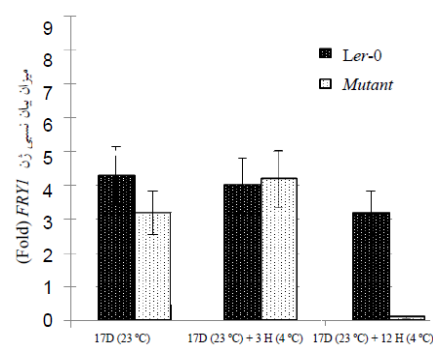
شکل ۴- مقایسه مدت زمان طی شده در مراحل رشد و نمو از کد رشدی (1.00 تا 8.00) در شرایط طول روز ۱۶ ساعت و دمای 4°C ؛ عددهای داخل مستطیل ها نشان دهنده تعداد روز طی شده مرحله است (جدول ۴). ارزیابی فوق بر اساس روش آنالیز مورفولوژیکی آراییدوپسیس بر مبنای مراحل رشد (Boyes et al. 2001) بررسی شد. تعداد تکرار برای هر نمونه در هر کد رشدی ۴ بوده است.

همراه بوده است. این تغییر در بیان ژن *FRY1* نشان دهنده اهمیت این ژن در واکنش های کوتاه مدت و بلند مدت گیاه به تنش سرما است. تاثیر جهش نقطه ای فوق در کلیه زمان های بعد از تیمار سرما و نیز قبل از تیمار سرما سبب کاهش بیان ژن *FRY1* در گیاهچه جهش یافته شد. همچنین بعد از گذشت ۷ روز از تیمار سرما، میزان بیان آن در گیاهچه های موتانت به میزان دو برابر در مقایسه با گیاهچه های وحشی *Ler-0* کاهش یافت. این میزان در مقایسه با میزان اختلاف بیان این ژن در دوره قبل از

عمل تیمار سرما بسیار بیشتر و قابل توجه تر بود (شکل ۵). لذا وقوع جهش نقطه ای در گیاهان موتانت موجب کاهش میزان بیان ژن *FRY1* و احتمالاً از جمله دلایل موثر بر افزایش حساسیت گیاه، کاهش طول ساقه اصلی، کاهش وزن تر کل، افزایش طول دوره رشد و کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهان جهش یافته می باشد. نتایج مقایسه ای بیان ژن *GST1* در زمان های یاد شده به روشنی بیانگر اثر موتاسیون بر میزان بیان ژن *GST1* در ژنوتیپ بود. به نحوی که در زمان صفر میزان بیان ژن *GST1* در ژنوتیپ



شکل ۵- مقایسه بیان ژن *GST1* در گیاهچه های جهش یافته و وحشی *Ler-0* در نمونه های شاهد که به مدت ۱۷ روز در دمای 23°C نگهداری و سپس در زمان های مختلف تحت تیمار 4°C سرما؛ (H) ساعت؛ (D) روز.



شکل ۶- مقایسه بیان ژن *FRY1* در گیاهچه های جهش یافته و وحشی *Ler-0* در نمونه های شاهد که به مدت ۱۷ روز در دمای 23°C نگهداری و سپس در زمان های مختلف تحت تیمار 4°C سرما؛ (H) ساعت؛ (D) روز.

فعالیت آبشار کینازی MAPK می‌شود (Kovtun et al. 2000) و کاهش فعالیت این آبشار کینازی موجب کاهش بیان ژنهای دخیل در سازگاری گیاه به تنش‌ها می‌شود (Teige et al. 2004). لذا احتمال دارد تحت تنش سرما، گیاه آراییدوپسیس با افزایش بیان ژن *FRY1* موجب افزایش عوامل اکسیداتیو و سپس فعال شدن آبشار کینازی MAPK و در نهایت فعال شدن ژنهای دخیل در ایجاد سازگاری شده و از این طریق موجب افزایش مقاومت گیاه به تنش سرما شود.

وحشی *Ler-0* به میزان ۱۲ برابر موتانت بود. با توجه به این نکته که ژن *GST1* یک ژن نشانگر تنش اکسیداتیو است (Love et al. 2005)، لذا وجود موتاسیون باعث کاهش تنش اکسیداتیو در شرایط نرمال و تنش سرما در گیاهان موتانت شده است. مضافاً اینکه در تیمارهای سرما میزان بیان ژن *GST1* در گیاهان وحشی *Ler-0* در مقایسه با گیاهان موتانت افزایش یافته است (شکل ۶). کاهش بیان ژن *GST1* نشان می‌دهد که موتاسیون نقطه‌ای فوق سبب کاهش سطح عوامل اکسیداتیو در گیاه شده- است. از آنجایی که کاهش میزان عوامل اکسیداتیو موجب کاهش

منابع

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

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

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

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

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

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

Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen

production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:8271-8276.

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

Shirzadian-Khorramabad R, Jing HC, Hille J, Dijkwel PP (2010) Identification of *Arabidopsis* stay-green mutants with a functional ethylene-response pathway. In: *Agronomy Society of New Zealand Special Publication No. 13 / Grassland Research and Practice Series No. 14*, McGill and Rowarth ed., pp. 119-129.

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

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

Xiong L, Lee H, Huang R, Zhu JK (2004) A single amino acid substitution in the Arabidopsis FERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance. *Plant Journal* 40: 536-545.