ارزیابی کمی الگوی بیان ژن سوکروز سینتاز تحت تنش سرما در گیاه نخود

محمد رضا نظری*[۱]، رضا معالی امیری[۲]، سیده‌ساناز رمضانپور[۳]

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

* محمدرضا نظری: پست الکترونیکی: mrnazari@ut.ac.ir

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 وساز سلول، در کنار میزان هدایت الکترولیتی به عنوان شاخص خسارت غشای سلولی، در دو دمای ۱۰و ۲۳ درجه سانتی‌گراد و در زمان های ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت قرارگیری تحت سرما، در دو نوع نخود دسی و کابلی ارزیابی گردید. نتایج حاکی از تفاوت معنی دار بیان این ژن در زمان‌های قرارگیری نمونه ها در ۱۰ درجه سانتی‌گراد بود. به طور کلی افزایش بیان ژن سوکروز سینتاز در دمای سازگاری که در بیشتر موارد با خسارت کمتر غشا همراه بود اهمیت سوکروز سینتاز را به عنوان ژن کاندید در فرایند سازگاری و همچنین امکان استفاده از سنجش بیان ژن‌های خاص به عنوان نشانگر در جهت گزینش و شناسایی گیاهان مطلوب را تایید می‌نماید. بنابراین در دو ژنوتیپ نخود، ارتباط بیان بیشتر ژن مذکور با خسارت کمتر غشا محتمل است.

واژگان کلیدی: تنش سرما، سازگاری، بیان کمی ژن، سوکروز سینتاز، شاخص هدایت الکترولیتی

مقدمه

گیاهان با سازوکارهای متعددی به تنش سرما پاسخ داده و بنابراین درجه‌های متفاوتی از تحمل را نشان می‌دهند. 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، که با تغییراتی که در سازوکارهای سلولی، بیان ژن، ترکیبات غشایی و تجمع آنتی اکسیدان‌ها و ماکروملکول‌ها همراه است (۱). نخود (Cicer Arietinum L.) یک گیاه مهم 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، تسریع در بهنژادی گیاه و همچنین درک بعضی از سازوکارهای تحت تاثیر تنش کمک کند. یکی از آنزیم‌های مهم در تنظیم سوخت و ساز سلول، سوکروز سینتاز[۲] است. افزایش بیان سوکروز سینتاز موجب تغییر در بیان ژن‌های دخیل در فرایندهای متعددی

1-Acclimation
2- Sucrose Synthase

مانند سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، تولید انرژی، ساخت و حفاظت پروتئین‌ها و پاسخ به تنش‌ها می‌شود (۲). در این پژوهش، میزان کمی بیان ژن سوکروز سینتاز در سطح RNA و مقدار خسارت وارده به غشای سلولی با کمک شاخص هدایت الکترولیتی[1] در فواصل زمانی اعمال تیمار سرمایی در دو نوع نخود دسی و کابلی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش دو ژنوتیپ۴۳۲۲ و جم از انواع نخود دسی و کابلی، بترتیب از کلکسیون بذر حبوبات بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران و موسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه تهیه شد. بذور پس از جوانه زنی، به گلدان منتقل شد. گلدان‌ها در اتاقک رشد با نور ۲۰۰ میکرومول بر انیشتن و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب و دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قرار داده شد. گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای هر ژنوتیپ به دو قسمت تقسیم شده نیمی از آنها در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و شرایط فوق الذکر نگهداری شده و نیمی دیگر به دمای ۱۰ درجه سانتی گراد انتقال یافت. در زمان‌های ۳، ٦، ۹، ۱۲، ۲٤، ۳٦ و ٤۸ ساعت پس از شروع تنش نمونه‌گیری برگ مرکب انجام شد. نمونه‌های کنترل از هر گیاه در همان لحظه‌ی نمونه‌گیری از گیاهان تحت تنش، از گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به منظور استخراج RNA کل از روش بایوزول[2] (فرژن‌پویش، ایران، تهران) استفاده شد. غلظت RNAی هر استخراج به کمک اسپکتروفوتومتر تعیین گردید و مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم در میکرولیتر و میزان خلوص آن محاسبه شد. همچنین جهت تعیین کیفیت RNA نیز مقدار ۵ میکروگرم از هر نمونه روی ژل ۱/۵٪ آگارز، الکتروفورز شد. پس از آن تیمار DNase و ساخت cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز انجام شد. طراحی آغازگرها برای ژن اختصاصی و ژن خانه دار اَکتین[3] با استفاده از نرم افزار پرایمر۳ انجام شد. مشخصات آغازگرها در جدول(۱) ارائه شده است. در این تحقیق از دستگاه iQ5 شرکت BioRAD و رنگ فلورسنس SYBR BioPars (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) برای ارزیابی کمی استفاده گردید. برای هر واکنش ۳ تکرار در نظر گرفته شد و با شرایط زیر واکنش زنجیره ای پلی مراز انجام شد: ۲ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد (دمای Tm آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد. تجزیه‌ی داده‌ها با نرم افزار REST[4] استفاده شد. سنجش تحمل به سرما از طریق شاخص نشت الکترولیتی با روش معالی امیری و همکاران (۲۰۰۷) (۳) انجام شد.

نتایج و بحث

سرما از جمله تنش‌هایی است که منجر به دهیدراسیون و تنش اسمزی شده و بیان آنزیم سوکروز سینتاز را تحریک می‌کند (٤). تجزیه‌ی داده‌ها نشان داد بیان ژن سوکروز سینتاز در فواصل زمانی پس از قرار گیری در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد اختلاف معنی داری با تیمار کنترل در شرایط بدون تنش (۲۳ درجه سانتی‌گراد) نشان داده است (شکل ۱)، 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.

1- Electrolyte Leakage Index
2-Biozol
3-Actin
4-Relative Expression Software Tool

باتوجه به این که بیان ژن سوکروز سینتاز بیان سایر ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲)، 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 احتمالا تنوع در میزان فعالیت سایر ژنهای مرتبط باشد. اختلاف بین بیان در ساعات مختلف پس از تنش، در ٤٣٢٢ 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. با توجه به این که ژن سوکروز سینتاز در مسیرهای مختلف بیوسنتزی 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 هدایت الکترولیتی غشای سلول، به عنوان شاخص خسارت وارده به گیاه تحت این شرایط مطالعه شد. نتایج (شکل ۲) نشان داد که ژنوتیپ ٤٣٢٢ توانست تا ۱۲ ساعت پس از شروع تنش میزان خسارت وارده بر غشا را در سطوح پایین و در حدود شاخص بین ۲۰ تا ۳۰ حفظ نماید. اما پس از ٢٤ ساعت، خسارت کاملا روند افزایشی داشته و شاخص هدایت الکترولیتی به حدود ٤٢ و بعد از ٤٨ ساعت به نزدیکی ٦٤ 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 ٤٠ نگه داشته است. در تحقیقی بر روی چند واریته برنج، مشاهده گردیده است که گیاهچه‌های با میزان فعالیت بیشتر آنزیم سوکروز سینتاز تحمل بیشتری به تنش‌ها و عملکرد بالاتر داشته اند (۵). با توجه به این که آنزیم سوکروز سینتاز در ایجاد تحمل به تنش‌های غیر زنده نقش دارد، همچنین با توجه به عدم توانایی گیاه بر رونویسی این ژن و تولید این آنزیم در دمای انجماد، می‌توان به اهمیت قابلیت سازگاری گیاهان به سرما قبل از رویارویی با سرمای شدید پی برد. در دو ژنوتیپ مطالعه شده، بین بیان بیشتر ژن مورد نظر با خسارت کمتر غشا رابطه دیده شد و این نتایج با نتایج پژوهش‌های پیشین نیز هم‌خوانی دارد (٦ ، ۷).

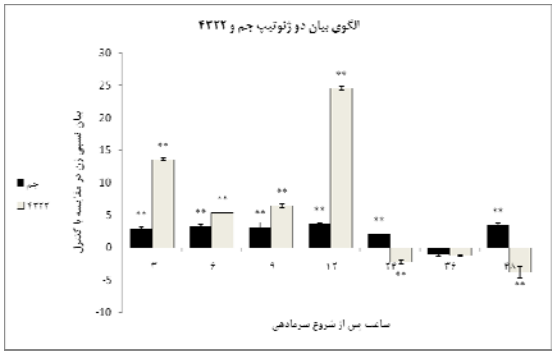
نتیجه گیری کلی

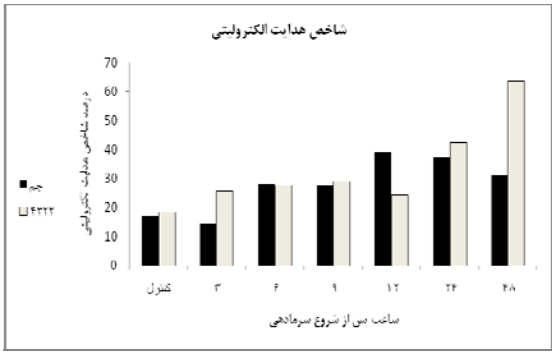
اگرچه ژن‌های بسیاری در ایجاد پاسخ به تنش نقش دارند، اما این مطالعه نشان داد ارتباط خاصی بین بیان ژن در سطح رونوشت و پاسخ به تنش در سطح فیزیولوژیکی گیاه وجود دارد که می‌تواند هم به کامل شدن و هم به هدایت دقیق تر برنامه های اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک در زمینه تنش های محیطی منجر شود، همچنین می‌توان به انتخاب گیاهان با کمک روش‌های ملکولی سرعت بخشید. بنابراین به جهت مطالعات دقیق‌تر و بررسی ارتباط قوی‌تر بین سازوکارهای ملکولی و فیزیولوژیکی گیاهان، مطالعه‌ی ژن‌های متعدد درگیر در مسیرهای مختلف بیوسنتزی متابولیت ها در ارقام حساس و مقاوم و همچنین آزمایشات مزرعه‌ای پیشنهاد می‌شود.

جدول ۱- توالی و خصوصیات آغازگر سوکروز سینتاز و اکتین

نام ژن	توالی	دمای اتصال	طول محصول (bp)	شماره دسترسی
سوکروز سینتاز	5'-GATCCATCTCACTGGGACAA-3'	۵۸/٤۳	١٦٠	DY475105.1
	5'-GATAACGGCGACTCTCAAGG-3'	۵۹/۸٤		

آکتین	۱۸۹	۵۸/۱۷	5'-CTACGAATTGCCTGATGGAC-3'	EU529707.1
		۵۹/۱٤	5'-CCTCCTGAAAGGACGATGTT-3'	





شکل۱- سطوح رونوشت ژن سوکروز سینتاز در مقایسه با کنترل **شکل۲- میزان هدایت الکترولیتی در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد**

منابع

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

2) 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.

3) 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. Acta Physiol Plant (In press).

4) Fernandes FM, Arrabaca MC and Carvalho LMM (2004) Sucrose metabolism in Lupinus albus L. under salt stress. Biol Plant 48: 317–9.

5) Counce PA and Gravois KA (2006) Sucrose Synthase Activity as a Potential Indicator of High Rice Grain Yield. Crop Science 46: 1501-1507.

6) 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.

7) Los DA and Murata N (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochimia et Biophysica Acta 1666: 142-157.

Quantitative Assessment of Gene Expression Pattern of Sucrose Synthase under Cold Stress Condition in Chickpea

M.R. NAZARI*[1], R. MAALI AMIRI[2], S.S. RAMEZANPOUR[3]

1, 2-Graduate Student and Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran. 3-Assistant Professor of Plant Breeding, Plant Breeding and Biotechnology Dept., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

***Mohamad Reza Nazari: mrnazari@ut.ac.ir**

Abstract

Low temperature is one of the factors that limits the growth and geographical distribution of crops. Plants response to low temperature by changing cell metabolisms which in turn are resulted from changes in gene expression pattern during the acclimation process. In this study quantification of Sucrose Synthase (Su Sy) gene expression, as an important enzyme in response to abiotic stresses and cell metabolisms, along with Electrolyte Leakage Index (ELI) as a membrane damage index were examined in two types of chickpea plants in two temperature conditions 10°C and 23°C also 3, 6, 9, 12, 24, 36 and 48 hours exposure under cold temperatures. Results indicated that there were significant differences in Su Sy expression between time treatments under 10°C condition. Increase in Su Sy expression under acclimation which most of the times was parallel with decrease in ELI, and also decrease in expression of foregoing gene under freezing temperature indicate the importance of Su Sy as a candidate gene for cold acclimation. So, it can be extrapolated that there is a negative correlation between Su Sy transcription level and ELI, and some gene can be good candidate as marker in selection for resistance to cold stress.

Key words: Cold stress, Acclimation, Quantitative gene expression, Sucrose Synthase, Electrolyte Leakage Index