

بررسی الگوی بیان ژن‌های *P5CS* و *CBF* تحت تنش یخ‌زدگی و اثر خوسرمایی بر تغییرات میزان پرولین آزاد در گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.)

روح الله قاسمی^{۱*}، عبدالرضا باقری^۲، نسربین مشتاقی^۳ و فرهاد شکوهی^۳

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
- ۲- اعضای هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و گروه بقولات پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد
- ۳- استادیار پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۴

چکیده

سازگاری گیاهان به تنش یخ‌زدگی از طریق تنظیم فعالیت ژن‌ها و متابولیسم سلولی انجام می‌شود. در این پژوهش، تغییرات بیان ژن‌های *P5CS* و *CBF(DREB1)* در شرایط دمایی معمولی (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، خوسرمایی (۱۰ درجه سانتی‌گراد) و یخ‌زدگی (۱۰- درجه سانتی‌گراد) در دو ژنوتیپ نخود زراعی مقاوم (MCC426) و حساس (MCC505) به سرما مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که بیان این ژن‌ها در ژنوتیپ مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ حساس به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$). همچنین اثر متقابل ژنوتیپ و اندام نمونه‌گیری در شرایط کنترل فقط در میزان بیان ژن *P5CS* تفاوت معنی‌داری را نشان داد. علاوه‌بر این مشاهده شد که اثر متقابل ژنوتیپ و تیمار خوسرمایی در مورد ژن *CBF* در هر دو ژنوتیپ اختلاف معنی‌داری داشت، ولی در مورد ژن *P5CS* فقط در ژنوتیپ MCC426 این روند مشاهده شد. از طرفی بررسی تغییرات میزان پرولین آزاد به‌عنوان یکی از سازوکارهای حفاظت سلولی در مرحله خوسرمایی نشان داد که میزان پرولین ژنوتیپ MCC426 در پاسخ به تیمار خوسرمایی نسبت به ژنوتیپ دیگر افزایش بیشتری داشته است؛ در صورتی که این افزایش در ژنوتیپ MCC505 طی مراحل اولیه خوسرمایی رخ داده و با گذشت زمان، میزان پرولین کاهش یافته است. براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان بیان کرد که یکی از دلایل اصلی مقاومت ژنوتیپ MCC426 به دماهای پایین، بیان زیاد ژن‌های مذکور در شرایط تنش سرمایی بوده و می‌توان از آن‌ها برای القای مقاومت در گیاهان حساس به سرما استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش یخ‌زدگی، پرولین، نخود زراعی

مقدمه

سازوکارهای متعدد و از طریق فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین سلولی مولکولی به تنش یخ‌زدگی پاسخ داده و خود را با شرایط محیطی منطبق کرده و بنابراین مقادیر مختلفی از تحمل را نشان می‌دهند. این اختلاف در بین گیاهان از پاسخ وسیع در سطوح دیواره و غشای سلولی، اندامک‌ها، ریزمولکول‌ها و درشت مولکول‌ها منشأ می‌گیرد و در نهایت بیان متفاوت ژن‌های مرتبط را به‌همراه خواهد داشت (Filippi *et al.*, 2007). یکی از فرایندهای مهم در مقاومت گیاهان به تنش سرما به‌عنوان خوگرفتن^۲ شناخته می‌شود. در این فرایند، سازوکارهای درونی گیاه سبب افزایش مقاومت به تنش یخ‌زدگی پس از قرارگیری در دماهای نزدیک صفر می‌شود (Gusta *et al.*, 2007). هرچند برخی از ژن‌ها و تنظیم‌کننده‌های دخیل در فرایند سازگاری توسط محققان شناخته شده است، اما هنوز ارتباط اساسی بین تغییرات رخ داده و مقاومت

تنش سرما و یخ‌زدگی از جمله مهم‌ترین تنش‌های محیطی می‌باشد که رشد و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این تنش‌ها باعث از بین رفتن بسیاری از پروتئین‌های سلولی و به تبع آن اختلال در سوخت‌وساز سلول و تغییرات در پایداری و نفوذپذیری غشاء شده که اثر آن در درجه اول در غشاء سلول مشاهده می‌شود (Harding *et al.*, 1999). علاوه بر این، تنش سرما باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپر اکسید (O_2^-) و رادیکال هیدروکسیل (OH^\cdot) در کلروپلاست و میتوکندری شده که پراکسیداسیون لیپید، دنا توره شدن پروتئین و جهش در DNA را سبب می‌شوند که این امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی گیاه و در نهایت مرگ سلول‌ها منجر می‌شود (Esfandiari *et al.*, 2007). گیاهان با

* نویسنده مسئول: تلفن همراه: ۰۹۱۵۹۰۴۸۷۹۹
rohollah.ghasemi@modares.ac.ir

^۲ Acclimation

saligna در شرایط این‌ویتر، میزان تولید پرولین چهار برابر بیشتر از نمونه‌های شاهد شد (Dibax et al., 2010). در مطالعه‌ای دیگر در تنباکوی تراریخته، با بیش‌بیان ژن *P5CS*، ۱۰ تا ۱۸ برابر پرولین بیشتری تولید شد و این گیاهان تراریخته تحمل به یخ‌زدگی بالایی را از خود نشان دادند (Konstantinova et al., 2002). در مورد ژن *CBF* نیز شرایط به این‌گونه است. بیش‌بیان ژن‌های *CBF* آرابیدوپسیس در *B. napus* تراریخته، بیان ژن‌های هدف *CBF* را افزایش داده و مقاومت به یخ‌زدگی را هم در گیاهان سازش‌یافته و هم سازش‌نیافته به سرما افزایش داد (Jaglo et al., 2001). همچنین بیان ژن *CBF1* آرابیدوپسیس در گوجه‌فرنگی تحمل بالایی را به سرما نشان داده است (Hsieh et al., 2002). در کل در مورد ژن *CBF* می‌توان عنوان کرد که ژن‌های ارتولوگ *DREB1/CBF* در بسیاری از گیاهان زراعی مثل کلم بروکلی، گوجه‌فرنگی، یونجه، ذرت، برنج، جو، آتریپلکس، کلزا، اوکالیپتوس، فستوکا و گندم شناسایی شده که نشان‌دهنده حضور گسترده سیستم تنظیمی *DREB1/CBF* در قلمروی گیاهی بوده و انتظار می‌رود که فناوری *DREB* با کنترل بیان این سیستم تنظیمی تحمل علیه تنش‌ها مخصوصاً شرایط یخ‌زدگی را در گیاهان زراعی بهبود بخشد.

با توجه به این که بررسی بیان ژن‌ها تحت تنش یخ‌زدگی می‌تواند به‌طور سودمندی توجیه‌کننده‌ی تغییرات متابولیکی گیاه در جریان سازگاری به دماهای پایین باشد و محققان را در روشن شدن پاسخ‌های مختلف گیاهان هدایت کند، لذا در این تحقیق میزان بیان ژن‌های *P5CS* و *DREB1 (CBF)* که در مواجهه بسیاری از گیاهان با تنش سرما و یخ‌زدگی نقش مهمی بازی می‌کنند، در نخود زراعی در دو ژنوتیپ مقاوم و حساس به سرما مورد بررسی قرار گرفتند و از تکنیک *Real time PCR* برای بررسی میزان بیان ژن‌های فوق تحت شرایط تنش و بدون تنش استفاده شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول: بررسی اثرات خوسرمایی و تنش یخ‌زدگی بر بیان ژن‌های *P5CS* و *CBF*

در این پژوهش دو ژنوتیپ مختلف نخود زراعی شامل MCC426 متحمل به سرما (Nezami & Bagheri, 2001) و MCC505 حساس به سرما (Singh et al., 1995) انتخاب و بذر آن‌ها از بانک بذر پژوهش‌کنده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت شد. در ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم تجاری ۱۰ درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر، بر روی کاغذ صافی در ظروف پتری با

القاء شده در گیاهان به‌خوبی شناخته نشده است (Thomashow, 1999). تنش دماهای پایین باعث القای بیان و یا ممانعت از بیان ژن‌های خاصی می‌شود، لذا شناسایی ژن‌های مهم در لاین‌های متحمل و حساس به کمک ارزیابی تغییرات بیان آن‌ها در شرایط اعمال تنش نسبت به حالت بدون تنش، برای اجرای برنامه‌های افزایش مقاومت گیاهان به تنش یخ‌زدگی می‌تواند یکی از راه‌های مناسب باشد.

از جمله پروتئین‌هایی که در هنگام مواجهه گیاه با سرما به ایفای نقش در سازگاری و تحمل سرما در گیاه می‌پردازد، پروتئین‌های *P5CS*^۱ و فاکتور رونویسی *DREB^۲(CBF)* می‌باشند. یکی از واکنش‌هایی که گیاهان در مواجهه با این‌گونه تنش‌ها از خود نشان می‌دهد، واکنش‌های متابولیکی است و یکی از بهترین آن‌ها تجمع اسمولیت‌های آلی می‌باشد. از جمله این اسمولیت‌های آلی می‌توان پرولین را نام برد. پرولین، غشاء‌ها و پروتئین‌ها را در برابر آثار مختلف غلظت‌های بالای یون‌های معدنی و دماهای بالا و پایین محافظت می‌کند و به‌عنوان یک پاک‌کننده رادیکال‌های هیدروکسیل عمل می‌نماید (Rayapati & Stewart, 1991). تنش اسمزی بیوسنتز پرولین را افزایش می‌دهد و این افزایش به‌واسطه تحریک کردن یا فعال کردن آنزیم‌هایی است که در مسیر بیوسنتز پرولین دخالت دارند. در یکی از این دو مسیر که اغلب در شرایط تنش به‌ویژه تنش سرما اتفاق می‌افتد، L-گلوتامیک اسید به گلوتامیک ۷-سمی آلدوئید تبدیل شده و پس از تولید دلتا-۱-پرولین ۵-کربوکسیلات، در نهایت به L-پرولین تبدیل می‌شود (Delauney et al., 1993). اولین آنزیمی که در مسیر بیوسنتز پرولین نقش کلیدی دارد، آنزیم *P5CS* می‌باشد که در هنگام تنش سرما و یخبندان در گیاهان، تولید آن افزایش می‌یابد (Delauney et al., 1993). پروتئین *DREB* یکی از عوامل نسخه‌برداری در گیاهان است که در بسیاری از گیاهان نقش کلیدی را در تحمل به تنش‌های غیرزیستی از جمله یخ‌زدگی ایفاء می‌کند. این پروتئین با داشتن توالی حفاظت‌شده به توالی خاصی از DNA در بالادست ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش سرما متصل و باعث بیان آن‌ها می‌شود (Agarwal et al., 2006).

از این دو ژن برای افزایش مقاومت به سرما در گیاهان حساس استفاده شده است. در پژوهشی با انتقال ژن *P5CS* با کمک *Agrobacterium tumefaciens* به *Eucalyptus*

^۱ Δ1-pyrroline-5-carboxylatesynthetase

^۲ Dehydration responsive element binding

^۳ C-repeat binding factor

استخراج RNA و سنتز cDNA

از نمونه‌های فریز شده، کل RNA با استفاده از کیت استخراج RNA ستونی شرکت دنازیست، استخراج شده و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تعیین غلظت و کیفیت نمونه‌های استخراج شده، نانودراپ نمونه‌ها با نسبت های ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ انجام شده و مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم در میکرولیتر محاسبه گردید. غلظت داده شده توسط دستگاه، برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. همچنین جهت تعیین کیفیت RNA نیز مقدار پنج میکروگرم از هر نمونه (براساس نتایج نانودراپ 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، به منظور حصول rRNA خالص، rRNAهای استخراج شده با استفاده از آنزیم DNase I شرکت Fermentas (USA) (2001 طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورد تیمار قرار گرفتند. بعد از همسان‌سازی غلظت‌های مختلف RNA، به منظور سنتز cDNA از کیت شرکت ویوانتیس و طبق دستورالعمل شرکت مذکور بهره گرفته شد.

طراحی آغازگر

برای طراحی آغازگر مناسب از توالی mRNAهای ژن‌های *P5CS* و *CBF* مربوط به نخود که در پایگاه NCBI وجود داشت، استفاده شد و با نرم‌افزار Primer Premier 5 طراحی انجام گرفت. ژن خانگی *Elongation factor* به‌عنوان ژن کنترل داخلی جهت نرمال‌سازی سنجش بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت (Dinari et al., 2013). توالی آغازگرهای ژن‌های مورد نظر و همچنین توالی ژن خانه‌دار در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده

Table 1. Primers used in this study

اندازه محصول	توالی آغازگر	آغازگر
Product size	Primer sequence	Primer
168bp	TATCAGCCTTGTTGGCGTTG	<i>P5CS-F</i>
	CCACCCTACACTGTCTCCGA	<i>P5CS-R</i>
131 bp	AATGACGCTCGTGTAGATGC	<i>CBF-F</i>
	CAAGACAATGAAGGCTGGG	<i>CBF-R</i>
101bp	CTCCAAGGATGACCCTGCTAA	Elongation factor-F
	CGAGGACTGGGGCATAACC	Elongation factor-R

طراحی آغازگرها، مراحل سنتز و خلوص cDNAها و از مناسب بودن برنامه PCR اطمینان حاصل شد. سپس برای انجام Real time PCR، براساس شرایط بهینه شده، حجم واکنش زنجیره

رطوبت لازم قرار داده شدند. ظروف پتری در شرایط بدون نور و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از جوانه‌زنی به گلدان منتقل شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد و با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از دو هفته که رشد در شرایط نرمال، گیاهچه‌ها به دو قسمت تقسیم شده و نیمی در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط ذکر شده نگهداری و نیمی دیگر به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد جهت اعمال تیمار خوسرمایی منتقل شدند. بر طبق مطالعات انجام شده، دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای راه‌اندازی بهتر مسیرهای سازگاری و آمادگی برای مقابله با تنش سرما مناسب می‌باشد و این مطلب در مورد برخی از ژنوتیپ‌های نخود گزارش شده است (Nayyar et al., 2005). بعد از ۱۰ روز، گیاهچه‌ها از تیمار دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین از شرایط نرمال ۲۳ درجه سانتی‌گراد به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. برای جلوگیری از یخ‌زدگی ناگهانی، دمای فریزر تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲ درجه سانتی‌گراد در ساعت به تدریج کاهش یافت و گیاهان به مدت ۱۵ دقیقه در معرض این دما و در شرایط تاریکی قرار گرفتند و سپس از قسمت‌های میانی گیاهان، نمونه‌گیری برگ مرکب و ساقه انجام شد. کاهش تدریجی دما شرایط را برای توزیع مجدد آب به بافت‌های گیاهی و جلوگیری از تشکیل یخ در داخل سلول‌ها که در طبیعت به ندرت اتفاق می‌افتد، فراهم می‌کند (Murry et al., 1988). نمونه‌گیری از گیاهان شاهد و برای هر تیمار از گیاهان در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در همان لحظه نمونه‌گیری از گیاهان تحت تنش، انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و جهت نگهداری به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

شرایط PCR برای تکثیر قطعه و آزمون آغازگرها

در ابتدا از cDNAهای سنتز شده از نمونه‌های RNA، برای بهینه‌سازی واکنش PCR استفاده شد و از درست‌بودن

سانتریفیوژ گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول شفاف بالایی به میکروتیوب جدید انتقال یافت و ۲۰۰ میکرولیتر معرف ناین هیدرین و ۲۰۰ میکرولیتر اسیداستیک گلاسیال اضافه شد و به مدت نیم ساعت در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها پس از سرد شدن در طول موج ۵۲۰ نانومتر اسپکت شدند. برای ساخت ۳۰ میلی لیتر محلول ناین هیدرین، ۷۵۰ میلی گرم ناین هیدرین، ۷/۵۶ گرم اسید فسفریک جامد که با آب مقطر به حجم ۱۲ میلی لیتر رسانده شده و ۱۸ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال با هم مخلوط شدند (Bates, 1973).

تهیه منحنی استاندارد به منظور محاسبه میزان تجمع پرولین
در کنار نمونه‌ها، یک سری نمونه‌های استاندارد با میزان مشخص پرولین آماده شده و دقیقاً تمام مراحل بالا برای نمونه‌ها اعمال شد. برای ساخت نمونه‌های استاندارد ابتدا ۲۵ میلی گرم پرولین در ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس مقادیر صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول آماده شده برداشته شده و به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شدند (جدول ۲). در ادامه سایر مراحل (همانند نمونه‌های عصاره‌های گیاهی) بر روی آن‌ها اعمال شد. میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شده و با استفاده از غلظت معلوم پرولین در محلول‌های استاندارد و اعداد به دست آمده نهایی، خط رگرسیون ترسیم گشت (شکل ۱). بعد از مشخص شدن معادله نهایی خط، با استفاده از این منحنی استاندارد و نسبت رقیق‌سازی مواد، غلظت پرولین در نمونه‌های به دست آمده از زمان‌های مختلف نمونه‌برداری برای هر دو ژنوتیپ مورد آزمایش تعیین شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول: بررسی الگوی بیان ژن‌های *P5CS* و *CBF* در دو ژنوتیپ نخود زراعی تحت تنش یخ‌زدگی
شکل ۲ باندهای حاصل از الکتروفورز RNA استخراج شده را نشان می‌دهد. در این تصویر، باندهای RNA ریپوزومی ۲۸S و ۱۸S به وضوح قابل تشخیص است که نشان از کیفیت خوب RNA استخراج شده دارد.

بررسی اثر ژنوتیپ در میزان بیان ژن‌های *P5CS* و *CBF*

همان‌گونه که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، بین میزان بیان نسبی ژن‌های *P5CS* و *CBF* در ژنوتیپ‌های مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که در مورد هر دو ژن، میزان نسبی بیان آن‌ها در ژنوتیپ MCC426 به طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ MCC505 بود و از آنجایی

ای پلیمرز ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که این حجم حاوی دو میکرولیتر از cDNA، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۰/۴ میکرومولار از هر آغازگر، ۲/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، غلظت نهایی یک برابر از بافر PCR و یک واحد DNA-Taq پلی‌مرز بود. سپس حجم نهایی با استفاده از آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش Real time PCR در ۴۰ چرخه و حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با شرایط زیر در دستگاه BioRAD صورت گرفت: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشت اولیه) و ۴۰ تکرار با چرخه‌های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشت ثانویه)، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد (دمای Tm آغازگر) و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (مرحله بسط). میزان بیان ژن‌ها با روش Efficiency adjusted $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001) محاسبه گردید. در این روش همه داده‌ها با ژن خانگی *Elongation factor* به عنوان کنترل داخلی نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن‌ها نسبت به شاهد سنجیده شد.

محاسبه میزان بازدهی آغازگرها

جهت اندازه‌گیری بازدهی هر آغازگر، رقت‌های ۱۰ برابر از cDNA تهیه گردید. پس از به دست آمدن Ct در هر رقت و رسم نمودار Ct بر مبنای لگاریتم رقت مورد نظر شیب خط مشخص شده و با استفاده از فرمول (۱- (شیب^{-۱}) میزان بازدهی مربوط به هر آغازگر محاسبه گردید (Gentle et al., 2001).

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. فاکتورهای آزمایشی عبارت بودند از خوسرمایی (در دو سطح شامل خوسرمایی و عدم خوسرمایی) و دو ژنوتیپ نخود (MCC426 و MCC505) و همچنین نمونه‌گیری از برگ‌ها و ساقه‌ها به طور جداگانه برای مقایسه میزان بیان ژن‌های مذکور در این دو اندام و در دو زمان (قبل و بعد از تنش) انجام شد.

آزمایش دوم: بررسی تغییرات میزان پرولین آزاد در مرحله خوسرمایی

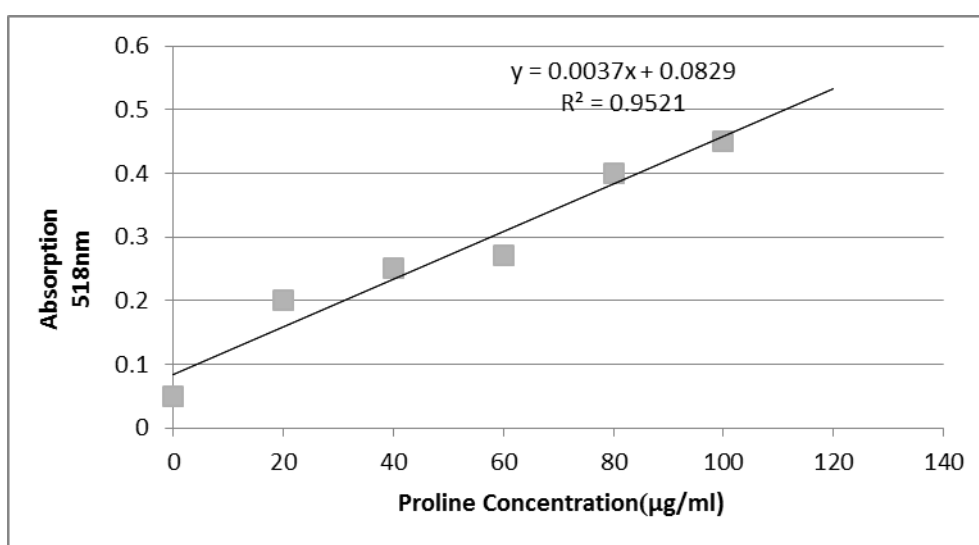
در آزمایشی جداگانه بعد از انتقال گیاهچه‌ها به شرایط خوسرمایی، میزان پرولین آن‌ها با گذشت ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از زمان قرارگیری در شرایط خوسرمایی همراه با شاهد اندازه‌گیری شد. ۱۰۰ میلی گرم برگ درون هاون با استفاده از ازت مایع پودر شده و در داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر ریخته، ۴۰۰ میکرولیتر اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد به نمونه‌ها اضافه شد، سپس پنج دقیقه در دور ۳۰۰۰

که این دو ژن از مهم‌ترین عوامل مقاومت گیاهان به تنش‌ها
 به‌خصوص تنش سرما و یخ‌زدگی به حساب می‌آیند، این نتیجه
 می‌تواند دلیلی بر این موضوع باشد که ژنوتیپ MCC426
 متحمل به سرما و ژنوتیپ MCC505 حساس به سرما
 می‌باشد.

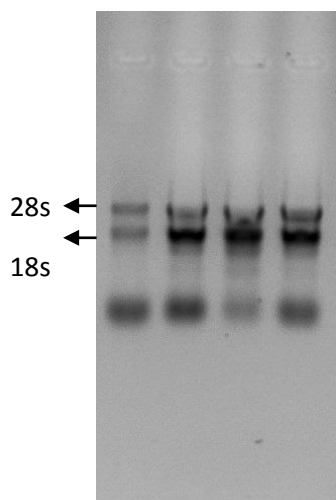
جدول ۲- تهیه محلول‌های پرولین استاندارد برای آنالیز اسپکتروفتومتری

Table 2. Preparation of proline standard solutions for a spectrophotometric analysis

محلول استاندارد نهایی (میکروگرم در میلی لیتر) The final standard solution($\mu\text{g/ml}$)	حجم اضافه شده تا 1000 میکرولیتر Volume added to 1000 μl	حجم برداشته شده از محلول ذخیره (میکرولیتر) Volume removed from the solution(μl)	شماره لوله آزمایش Number of test tubes
0	1000	0	1
5	950	50	2
10	900	100	3
20	800	200	4
40	600	400	5
80	200	800	6
100	0	1000	7



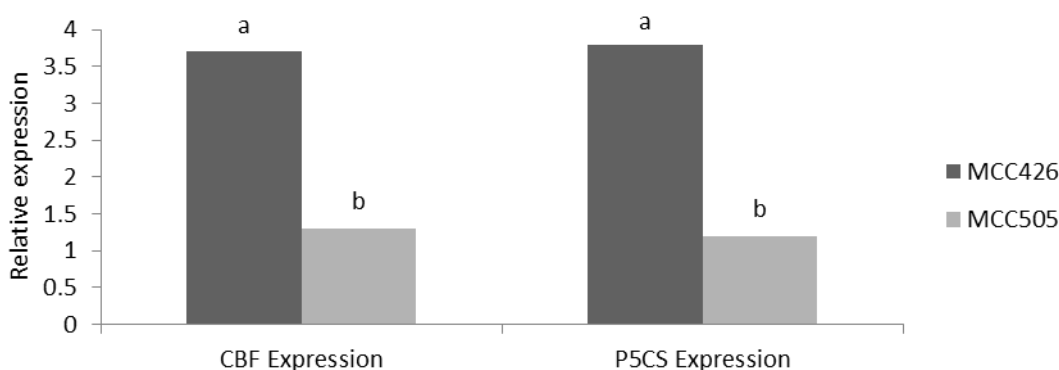
شکل ۱- منحنی استاندارد پرولین
 Fig. 1. Proline standard curve



شکل ۲- باندهای RNA ریبوزومی در RNA استخراج شده
 Fig. 2. Bands of ribosomal RNA in the extracted RNA

آزمایشات انجام شده در شرایط مزرعه جزو ارقام بسیار متحمل به سرما درجه بندی شده است (Nezami & Bagheri, 2002).

در پژوهش‌های گذشته ژنوتیپ MCC505 به عنوان ژنوتیپ حساس به سرما در نواحی مدیترانه‌ای توسط ایکاردا معرفی شده است (Singh *et al.*, 1995) و ژنوتیپ MCC426 حاصل به‌گزینی از توده بومی قزوین می‌باشد که با



شکل ۳- بیان نسبی ژن‌های *P5CS* و *CBF* در ژنوتیپ‌های MCC426 و MCC505 بعد از تیمار یخ‌زدگی (ستون‌های دارای حرف یا حروف متفاوت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند؛ $P < 0.05$)

Fig. 3. Relative expression of *P5CS* and *CBF* genes in MCC426 and MCC505 genotypes after freezing treatments (columns with different letter or letters show statistically significant difference; $P < 0.05$)

پایین افزایش می‌یابد (Gilmour *et al.*, 2001). اما بیان ژن *P5CS* در ژنوتیپ MCC426 نسبت به ژنوتیپ دیگر بیشتر بود (شکل ۳). از آنجایی که ژن *P5CS* یک ژن پُراهمیت در تنش سرما و یخ‌زدگی محسوب می‌شود، افزایش بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل که یک ژنوتیپ مقاوم به سرما است دور از انتظار نبود. احتمالاً این نتیجه مؤید این مطلب است که ژنوتیپ MCC426 در شرایط نرمال سطح بیان ژن *P5CS* را برای مقابله با تنش سرما و یخ‌زدگی بالا نگه می‌دارد.

مقایسه میزان بیان ژن‌های *CBF* و *P5CS* در دو ژنوتیپ مورد نظر در شرایط خوسرمایی و عدم خوسرمایی

میزان نسبی بیان ژن‌ها از گیاهانی که در معرض تیمار خوسرمایی و عدم خوسرمایی قرار داشته و سپس تحت تیمار یخ‌زدگی قرار گرفتند، اندازه‌گیری و دو ژنوتیپ با یکدیگر مقایسه شدند. همان‌گونه که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود، میزان نسبی بیان ژن *CBF* در دو حالت خوسرمایی و عدم خوسرمایی اختلاف معنی‌داری با هم نشان دادند، اما در مورد ژن *P5CS* ملاحظه شد که در ژنوتیپ MCC426 اختلاف معنی‌داری بین گیاهان خویافته و خونیافته وجود دارد، ولی در ژنوتیپ MCC505 اختلاف معنی‌دار نبود.

همچنین مشخص شده است که افزایش بیان ژن‌های *P5CS* و *CBF* در بیشتر مواقع همراه هم اتفاق می‌افتند. مشخص شده که بیش‌بیان *CBF3/DREB1A* در آراییدوپسیس علاوه بر افزایش تحمل به یخ‌زدگی، به‌طور قابل توجهی تغییرات بیوشیمیایی دیگری که وابسته به سازگاری به سرما می‌باشد را ایجاد کرده که شامل افزایش سطح پرولین و قندهای محلول شامل ساکارز، رافینوز، گلوکز و فروکتوز می‌شود. همچنین بیان ژن *CBF3* سطح آنزیم *P5CS* را افزایش می‌دهد که چنین نتیجه‌گیری شد که بخشی از افزایش سطح پرولین در نتیجه افزایش سطح همین آنزیم می‌باشد (Gilmour *et al.*, 2000).

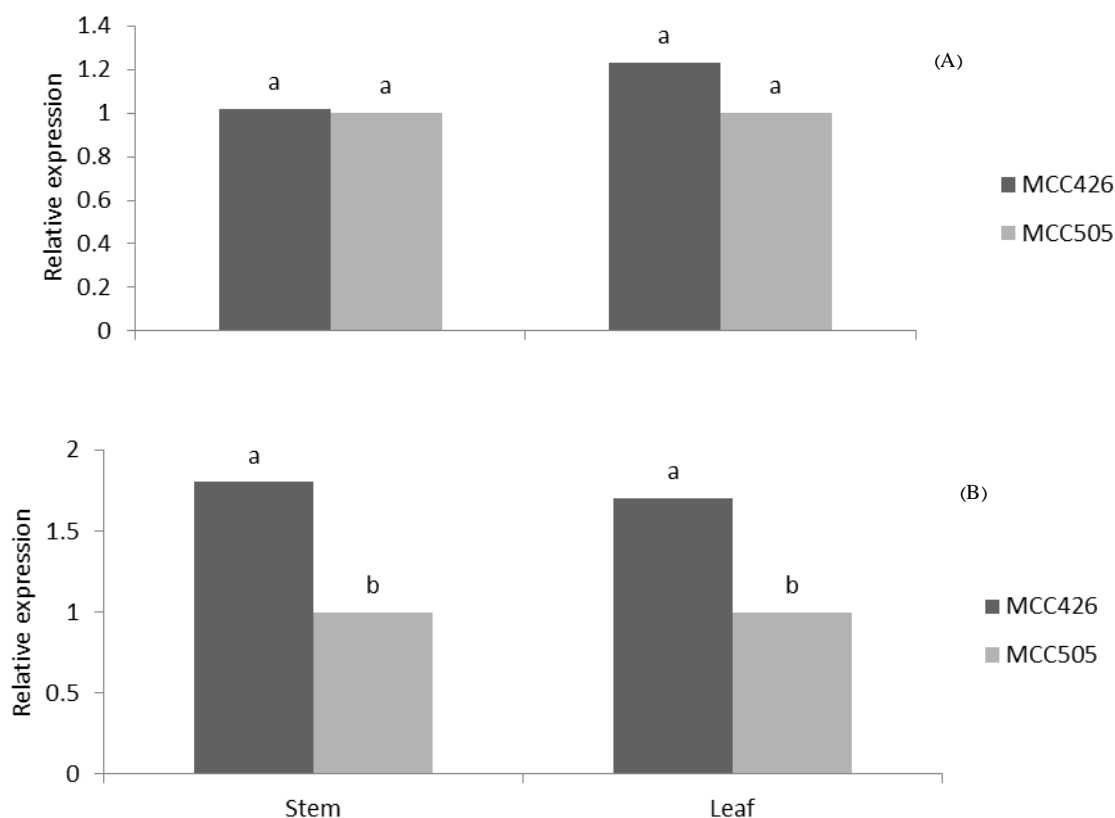
بررسی اثر متقابل ژنوتیپ و اندام نمونه‌گیری شده در میزان بیان ژن‌های *CBF* و *P5CS* در شرایط کنترل

در بیان ژن‌های *CBF* در هر دو ژنوتیپ و بین اندام‌های برگ و ساقه گیاه در شرایط کنترل، اختلاف معنی‌داری ملاحظه نشد (شکل ۴). این مطلب می‌تواند این موضوع را ثابت کند که بیان این ژن تنها بعد از القای تنش سرما اتفاق افتاده و در غیرشرایط تنش بیان آن ناچیز می‌باشد. مطالعات گذشته نیز نشان داد القای این ژن توسط تنش سرما انجام گرفته و میزان بیان آن در حدود ۱۵ دقیقه بعد از انتقال گیاهان به دماهای

اثر متقابل ژنوتیپ، تیمار خوسرمایی و اندام نمونه‌گیری در میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه

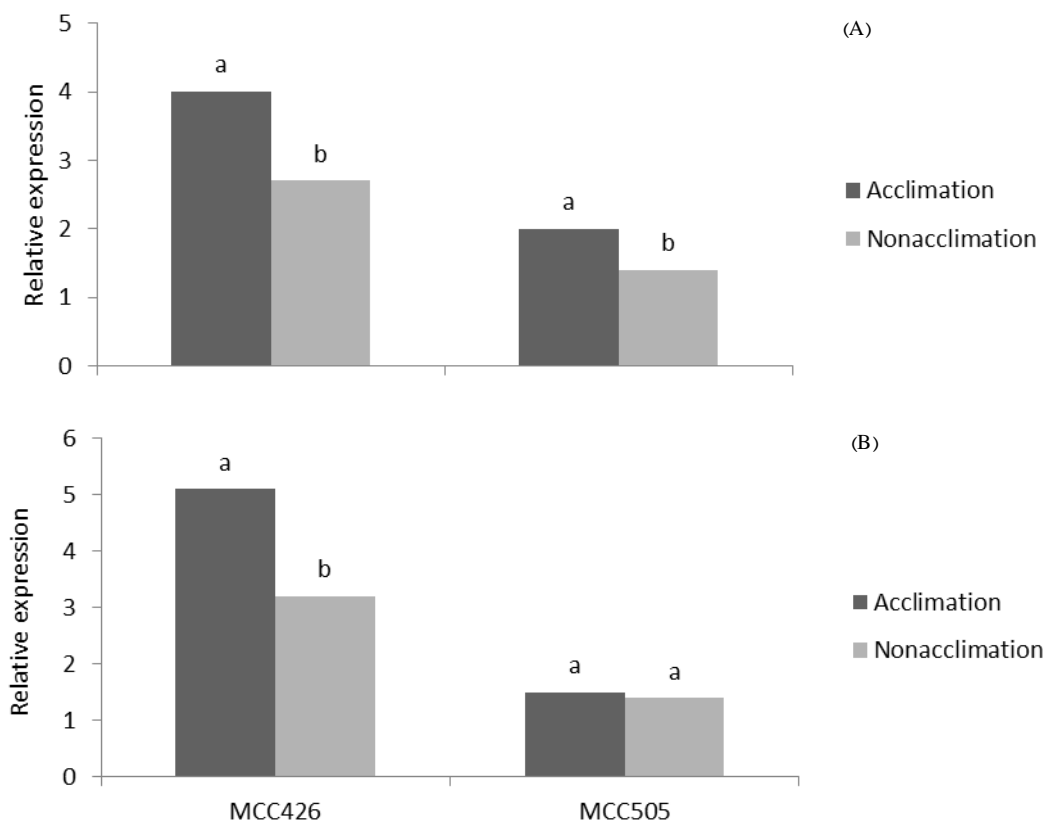
در بررسی اثر متقابل ژنوتیپ، تیمار خوسرمایی و اندام نمونه‌گیری در میزان بیان ژن *CBF* مشاهده شد که در ژنوتیپ MCC426 و تیمار خوسرمایی، بین اندام‌های ساقه و برگ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. ولی در همین ژنوتیپ و عدم خوسرمایی، بین ساقه و برگ اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در ژنوتیپ MCC505 در تیمار خوسرمایی بین ساقه و برگ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، ولی در عدم خوسرمایی بین بیان ژن *CBF* در ساقه و برگ اختلاف معنی‌داری دیده شد. در مورد بیان ژن *P5CS* در دو ژنوتیپ و تیمار خوسرمایی و عدم خوسرمایی بین اندام نمونه‌گیری ساقه و برگ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

نتایج این آزمایش در مورد ژن *CBF*، توسط نتایج تحقیقات پیشین اثبات می‌شود. Fowler & Thomashow (2002) نشان دادند که قرارگیری در شرایط خوسرمایی چندین مسیر تنظیمی مختلف را به منظور فعال کردن مسیر پاسخ به سرمای *CBF* فعال می‌کند و میزان بیان این ژن بعد از چند دقیقه تحت تنش سرما بودن افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند. همچنین براساس نتایج پژوهش‌های دیگری مشخص شده است که *DREB1/CBF* فعال‌سازی اجزای چندگانه پاسخ خوسرمایی را تکمیل می‌کند. بنابراین پروتئین‌های *DREB1/CBF* بدون احتیاج به تغییرات بعد از ترجمه بر بهبود تحمل به تنش موثرند (Esfandiari et al., 2007).



شکل ۴- بیان نسبی ژن‌های *CBF* (A) و *P5CS* (B) در ژنوتیپ‌های مورد آزمایش در شرایط کنترل (ستون‌های دارای حرف یا حروف متفاوت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند؛ $P < 0.05$)

Fig. 4. Relative gene expression of *CBF* (A) and *P5CS* (B) in the genotypes tested under control conditions (columns with different letter or letters show statistically significant difference; $P < 0.05$)



شکل ۵- مقایسه بیان نسبی ژن‌های *CBF* (A) و *P5CS* (B) در دو ژنوتیپ مورد آزمایش در شرایط تیمار خوسرمایی و عدم خوسرمایی (ستون‌های دارای حرف یا حروف متفاوت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند؛ $P < 0.05$)

Fig. 5. Comparison of the relative gene expression of *CBF* (A) and *P5CS* (B) in the genotypes tested under acclimation and nonacclimation treatments (columns with different letter or letters show statistically significant difference; $P < 0.05$)

جدول ۳- مقایسه اثر متقابل سه‌جانبه ژنوتیپ، تیمار خوسرمایی و اندام نمونه‌گیری در بیان نسبی ژن *P5CS* و *CBF*

Table 3. Comparison of 3-way interaction between genotype, acclimation and sampling organ in the relative expression of *CBF* and *P5CS* genes

MCC505		MCC426		ژنوتیپ		Genotype		تیمار خوسرمایی Acclimation treatment
عدم خوسرمایی Nonacclimation	خوسرمایی Acclimation	عدم خوسرمایی Nonacclimation	خوسرمایی Acclimation	عدم خوسرمایی Nonacclimation	خوسرمایی Acclimation	عدم خوسرمایی Nonacclimation	خوسرمایی Acclimation	
برگ Leaf	ساقه Stem	برگ Leaf	ساقه Stem	برگ Leaf	ساقه Stem	برگ Leaf	ساقه Stem	اندام Organ
1.48 a	1.3 b	1.9 a	1.85 a	2.95 a	2.65 b	4.15 a	4.05 a	<i>CBF</i>
1.38 a	1.42 a	1.5 a	1.54 a	2.43 a	2.29 a	5.29 a	5.13 a	<i>P5CS</i>

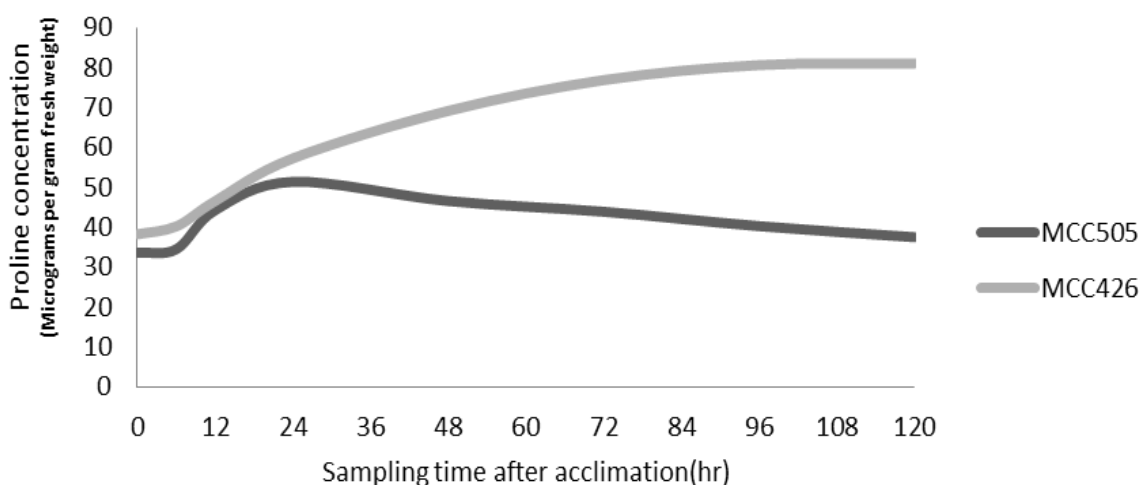
(حروف متفاوت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهند؛ $P < 0.05$)

(different letters indicating statistically significant difference; $P < 0.05$)

میزان پرولین در دو ژنوتیپ مورد مطالعه در زمان‌های مختلف ملاحظه گردید که اثرات متقابل دو جانبه (ژنوتیپ × زمان نمونه برداری) معنی‌دار بود که نتیجه می‌شود مقدار پرولین برگ‌ها در هر دو ژنوتیپ و در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری متفاوت است (شکل ۶).

آزمایش دوم: نتایج بررسی تغییرات میزان پرولین آزاد در مرحله خوسرمایی

در این آزمایش بین ژنوتیپ‌ها و زمان‌های نمونه‌برداری در طول آزمایش اختلاف بسیار معنی‌داری از لحاظ میزان پرولین برگ گیاهچه‌ها در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد. همچنین با توجه به نتایج تجزیه واریانس مربوط به تغییرات



شکل ۶ - روند تغییرات میزان پرولین برگ های گیاهچه های حاصل از ژنوتیپ MCC426 و MCC505 در زمان های مختلف نمونه برداری در طی خوسرمایی

Fig. 6. Trend of proline content in seedling leaves of MCC426 and MCC505 at different sampling times during acclimation process

که افزایش پرولین در سلول های سیب زمینی آن ها را در برابر تنش سرما محافظت می کند. همچنین در گیاهانی مثل سیب زمینی، جو و گندم مشخص شده است که میزان پرولین آزاد در گیاهان مقاوم به دماهای پایین افزایش می یابد (Dorffling *et al.*, 2008). بنابراین با توجه به نتایج داده های این آزمایش و پژوهش های گذشته به نظر می رسد که بتوان از پرولین به عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی برای تمایز ارقام حساس و متحمل به سرما استفاده کرد. اگر چه لازم است که در این زمینه از ژنوتیپ های متحمل و حساس دیگری برای تأیید نتایج به دست آمده در این تحقیق استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای دکتر احمد نظامی استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر همکاری صمیمانه در طول اجرای این تحقیق سپاسگزاری می گردد.

همچنین مشاهده شد که میزان پرولین در ژنوتیپ MCC426 در پاسخ به تیمار خوسرمایی در مقایسه با ژنوتیپ MCC505 سریع تر افزایش یافت. در مقابل در ژنوتیپ MCC505 در طی مراحل اولیه خوسرمایی اندکی افزایش پرولین مشاهده شد و با گذشت زمان میزان پرولین در برگ های این ژنوتیپ کاهش معنی داری از خود نشان داد. نتایج مقایسه میانگین مشخص کرد که ژنوتیپ MCC426 در مرحله خوسرمایی افزایش قابل توجهی را در میزان پرولین نشان می دهد، در حالی که ژنوتیپ حساس MCC505 در مرحله خوسرمایی افزایش معنی داری در میزان پرولین نشان نداد که این نتیجه از بررسی میزان بیان ژن P5CS در دو ژنوتیپ مورد نظر در شرایط خوسرمایی و عدم خوسرمایی که در آزمایش اول انجام گرفت نیز به دست آمده بود. مقایسه میزان پرولین گیاهچه های خویافته در مقایسه با گیاهچه های شاهد که در دو ژنوتیپ مورد مطالعه انجام شد همبستگی بالایی بین مقاومت به یخ زدگی و سطوح افزایش یافته پرولین در دوره خوسرمایی را نشان داد. مطالعات گذشته نیز این نتیجه را تأیید می کنند. (Vanswaaij (1985) گزارش کرد

منابع

1. Agarwal, P.K., Agarwal, P., Reddy, M., and Sopory, S. K. 2006. Role of *DREB* transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports* 25: 1263-1274.
2. Bates, L.S. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
3. Delauney, A., Hu, C., Kishor, P., and Verma, D. 1993. Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna conitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 268: 18673-18678.
4. Dibax, R., Deschamps, C., Bernaldo de Aguiar Filho, J., Vieira, L.G.E., Molinari, H.B.C., DeCampos, M.K.F., and Quoirin, M. 2010. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. *Biologia Plantarum* 54: 6-12.
5. Dinari, A., Niazi, A., Afsharifar, A. R., and Ramezani, A. 2013. Identification of upregulated genes under cold stress in cold-tolerant chickpea using the cDNA-AFLP approach. *PloS one* 8(1): e52757.
6. Dörffling, K., Schulenburg, S., Lesselich, G., and Dörffling, H. 2008. Abscisic acid and proline levels in cold hardened winter wheat leaves in relation to variety-specific differences in freezing resistance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 165: 230-239.
7. Esfandiari, E., Shekari, F., and Esfandiari, M. 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Journal of Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 35: 48-56.
8. Filippi, D.L., Fournier, M., Cameroni, E., Linder, P., Virgilio, C.D., Foti, M., and Deloche, O. 2007. Membrane stress is coupled to a rapid translational control of gene expression in chlorpromazine-treated cells. *Current Genetics* 52: 171-185.
9. Fowler, S., and Thomashow, M.F. 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: 1675-90.
10. Gentle, A., Anastasopoulos, F., and Mc Brien, N. A. 2001. High resolution semi quantitative real time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques* 31: 502-508.
11. Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D., and Thomashow, M.F. 2000. Overexpression of the *Arabidopsis CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology* 124:1854-65.
12. Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., and Thomashow, M.F. 2001. Low temperature regulation of the *Arabidopsis CBF* family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *The Plant Journal* 16: 433-442.
13. Gusta, L.V., Trischuk, R., and Weiser, C.J. 2007. Plant cold acclimation: The role of abscisic acid. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 308-318.
14. Harding, M.M., Ward, L.G., and Haymet, A.D.J. 1999. Type I 'antifreeze' proteins: Structure-activity studies and mechanisms of ice growth inhibition. *European Journal of Biochemistry* 264: 653-665.
15. Hsieh, T.H., Lee, J.T., Yang, P.T., Chiu, L.H., Charng, Y., Wang, Y.C., and Chan, M.T. 2002. Heterology expression of the *Arabidopsis* repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology* 129: 1086-1094.
16. Jaglo, K.R., Kleff, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., and Thomashow, M. F. 2001. Components of the *Arabidopsis* repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology* 127: 910-917.
17. Kafi, M., and Damghani, A.M. 2000. Resistance Mechanisms of Plants to Environmental Stresses. Ferdowsi University of Mashhad Press.
18. Konstantinova, T., Parvanova, D., Atanassov, A., and Djilianov, D. 2002. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science* 163: 157-164.
19. Murry, G.A., Eser, D., Gusta, L.V., and Eteve, G. 1988. Winter hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. In R.J. Summerfield (Ed.) *World Crops: Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. P. 831-843.
20. Nayyar, H., Bains, T.S., 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.
21. Nezami, A., and Bagheri, A. 2001. Screening of Mashhad chickpea (*Cicer arietinum* L.) collection for cold tolerance under field conditions. *Agricultural Sciences and Technology* 15:155-162.
22. Rayapati, P.J., and Stewart, C.R. 1991. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiology* 95: 787-791.

23. Singh, K.B., Malhotra, R.S., and Saxena, M.C. 1995. Additional sources of tolerance to cold in cultivated and wild *Cicer* species. *Crop Science* 35: 1491-1497.
24. Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation:freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 571-599.
25. Van swaaij, A.C., Jacobsen, E., and Feenstra, W.J. 1985. Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *solanum*. *Physiologia Plantarum* 64: 230-237.

The pattern of *CBF* and *P5CS* genes expression under freezing stress and effects of cold acclimation on free proline changes in chickpea (*Cicer arietinum*)

Ghasemi^{1*}, R., Bagheri², A., Moshtaghi², N. & Shokouhi Far³, F.

1. MSc. Student of Biotechnology and Plant Breeding, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad
2. Faculty Members of Biotechnology and Plant Breeding Department, Agricultural College; & Research Center for Plant Sciences; Ferdowsi University of Mashhad
3. Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad

Received: 21 May 2014
Accepted: 13 February 2016

DOI: 10.22067/ijpr.v8i2.34624

Introduction

Cold and freezing stress is one of the most important environmental stresses that affect the growth and yield of crops. One of the important processes in plant resistance to cold stress is known to acclimatize. In this process, the internal mechanisms of plants causes higher resistance to freezing stress after exposure to temperatures close to zero. Low temperature stress induce or inhibit the expression of certain genes. *P5CS* protein and transcription factor *DREB* (*CBF*) play an important role in adaptation and cold tolerance in plants. *P5CS* activates the enzymes in proline synthesis pathway and cause accumulation of this substance in plant that protects membranes and proteins against different effects of high concentrations of inorganic ions and high and low temperatures. Also *DREB* proteins with a conserved sequence bind to specific DNA sequences upstream of responsible genes in resistance to cold stress and leads to their expression. In this study the expression of *P5CS* and (*DREB1*)*CBF* genes that have an important role in the face of many plants to freezing and cold stress were examined in chickpea in both resistant and susceptible genotypes and used of Real time PCR method to evaluate the expression of these genes under stress and non-stress.

Materials & Methods

In the first experiment, the expression pattern of *P5CS* and *CBF* (*DREB1*) genes were evaluated at normal (23°C), acclimation (10°C) and freezing (-10°C) temperatures in two resistant (MCC426) and susceptible (MCC505) genotypes of chickpea, in two organs (leaf and stem). Briefly pots containing plants of both genotypes stored at 23°C for two weeks. After this period, plants are divided into two parts, half remained in the normal conditions and the other half were transferred to 10°C for cold acclimation. After 10 days, seedlings of normal and acclimation conditions transferred to a thermogradient freezer and after 15 minutes at -10°C, sampling was carried out from the leaves and stems. The simultaneous sampling of the control plants (normal conditions) were also done. After RNA extracting from samples and determine the concentration and quality by nanodrop and treatment with DNase I enzyme, cDNA synthesis was performed. After designing appropriate primers, the PCR process was optimized and Real time PCR was performed under optimized process conditions and gene expression levels were calculated. In the Second experiment free proline changes of seedlings in the acclimation phase were evaluated. Briefly after transferring of plants in the acclimation conditions, amount of proline at them were measured at appropriate intervals after exposure in acclimation conditions.

*Corresponding Author: rohollah.ghasemi@modares.ac.ir, Mobile: 09159048799

Results & Discussion

Results of analysis showed that the expression of these genes were significantly higher in resistant genotype than the susceptible one. Because of these genes are the important factors in plant resistance to stress especially cold and freezing stress, this can confirm that MCC426 genotype is resistant and MCC505 genotype is sensitive to cold. Also the interaction of genotype and organ sample in the control condition showed significant difference only for expression of P5CS gene. Since this gene is an important gene in freezing and cold stress, increased expression of this gene in MCC426 genotype that is resistant to cold not unexpected. But expression of CBF gene occurred only after cold stress induction and in the absence of stress is poor expression. In addition, it was revealed that the interaction of genotype and acclimation treatment on *CBF* genes in both genotypes had significant differences, but in *P5CS* gene only in MCC426, this trend was observed. However, changes of free proline as one of the mechanisms of cell protection in acclimation period in both genotypes showed that proline contents of MCC426 in response to acclimation treatment was gradually increased, but this increase in MCC505 genotype occurred during the early stages of acclimation, and proline has decreased over time.

Conclusion

According to the results, it generally seems, one of the main reason for tolerance to chilling is the high expression levels of the mentioned genes during chilling and freezing stress and therefore it can be used for inducing freezing tolerance into sensitive plants.

Key words: *Cicer arietinum*, Gene expression