مجله علوم کشاورزی ایران

جلد ۳۱، شماره ۴، سال ۱۳۷۹ (۸۳۸-۸۲۷)

سازگاری به سرما و بیان ژن در واکنش به سرما در کالوس جو *(Hordeum vulgare)*

سید رضا طبائی عقدائی

استادیار پژوهش بخش تحقیقات ژنتیک و فیزیولوژی گیاهی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۴/۸

خلاصه

سازگاری در مقابل سرما[1] و تغییر بیان ژن‌ها[2] در واکنش به درجه حرارت های پایین مورد مطالعه قرار گرفتند. کشت‌های رویان‌زا از جو زراعی ایجاد و از کالوس به عنوان یک سیستم جایگزین برای گیاه کامل[3] در مطالعات سازگاری به سرما و بیان ژن‌های مرتبط با آن استفاده گردید. تغییر در سطح mRNA به عنوان اولین مرحله در بیان ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تولید کالوس از رویان‌های نارس اثر درجه حرارت‌های پایین (۶/۲ °C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت)) بر روی تحمل به سرما[4] و بیان ژن‌های القاء شونده در واکنش به سرما، بررسی شد. همچنین اثرات دمای محیط رشد اولیه (۲۵ °C و یا ۲۰/۱۵ °C (۱۴ساعت / ۱۰ ساعت)) کالوس قبل از انتقال به دمای ۶/۲ °C و مدت زمان (۵ و ۱۰ روز) قرارگرفتن در دمای ۶/۲ °C، بر میزان سرما سختی[5] و بیان ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. تحمل به سرما در کالوس‌های تحت تیمارهای مختلف با انجام آزمون انجماد[6] و با استفاده از روش رنگ آمیزی تترازولیوم[7] و ارزیابی زنده مانی کالوس پس از انجماد تعیین گردید. همچنین RNA کل از کالوس استخراج شد و پس از انجام الکتروفورز، RNA به یک غشاء نایلونی انتقال و با استفاده از روش آغازگر تصادفی[8] هیبریداسیون mRNA با cDNAهای HmGlt4 و HmAPlt1 (از گروه ژنی nsLTPs[9])، به منظور ارزیابی میزان mRNA های مربوط به این ژن‌ها انجام شد. نتایج بدست آمده نشان دادند که کالوس در دمای ۶/۲ °C سرماسخت شده و بیان ژن‌های فوق الذکر در آن افزایش می یابد، که تغییر بیان آنها در برابر سرما در مریستم گیاه کامل نیز گزارش شده است.

واژه‌های کلیدی: سازگاری به سرما، سرماسختی، بیان ژن، دمای پایین بالاتر از نقطه انجماد، ژن‌های القاء شونده در مقابل سرما، تجمع mRNA، روش رنگ آمیزی تترازولیوم، نورذرن بلاتینگ[10]، کالوس، کشت های رویانزا

مقدمه

سازگاری به سرما از مهمترین عوامل حفظ کننده گیاهان مناطق معتدل در مقابل یخ زدگی می‌باشد. این فرایند قابل توارث (۲۵) مشتمل بر تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه است (۲۰ و ۳۱)، که منجر به افزایش تحمل در مقابل خسارات یخ زدگی می‌گردد. تحمل به سرما در بسیاری از گیاهان مناطق معتدل از قبیل غلات و سایر گندمیان زمستانه در طول فصل رشد یکسان نبوده و با تغییرات فصلی همراه است، بطوریکه حساسیت به سرما در یک گیاه در فصول مختلف سال تغییر می‌یابد (۱۸ و ۱۹). سرماسختی در پاییز و زمستان به بالاترین حد خود می رسد. در بهار دماهای بالا منجر به

1. Cold acclimation 2. Gene expression 3. Whole plant 4. Cold-inducible genes
5. Cold hardiness 6. Frost test 7. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 8. Random priming
9. Non-specific lipid transfer proteins 10. Northern blotting

کاهش تحمل گیاه در مقابل سرما و بر طرف شدن فرایند سازگاری[1] می‌گردد، و گیاه نیز در شرایط مطلوب رشد عادی را از سر می‌گیرد (۱۰، ۲۵ و ۳۵). بنابراین، درجه حرارت می‌تواند به عنوان مهمترین عامل کنترل کننده سرماسختی محسوب گردد (۲۰) و در هنگام پاییز و زمستان دماهای پایین ولی بالاتر از نقطه انجماد می‌توانند سازگاری در مقابل سرما را در گیاه القاء نمایند (۱۳ و ۲۰). تعیین دقیق دمای مناسب برای شروع سرماسختی و یا برطرف شدن آن به راحتی امکان پذیر نیست. در این رابطه محدوده ۱۰-۰ درجه سانتی گراد پیشنهاد شده است، که بالاتر از آن سرماسختی در گیاهان ایجاد نمی‌گردد (۲۰)، و بیشترین افزایش تحمل به سرما در مراحل شروع فرایند سازگاری به سرما گزارش شده است (۱۳). در طبیعت، گیاهان در معرض نوسان درجه حرارت قرار می‌گیرند (۳۱) و نتایج حاصل از مطالعات نیز نشان داده اند که حداقل تأثیر دماهای نوسانی (در محدوده مذکور) بر میزان سازگاری به سرما به اندازه اثر دماهای پایین و یکنواخت می‌باشد (۲). واکنش‌های متابولیسمی گیاهان در درجه حرارت های پایین در منابع متعدد بررسی شده است (۱۲، ۱۷، ۱۸ و ۲۰). تغییر در میزان بیان ژن در واکنش به سرما اولین بار توسط ویسر (۴۳) پیشنهاد گردید. در مطالعه انجام گرفته روی گیاه اسفناج تغییر در بیان ژن‌های القاء شونده در مقابل سرما گزارش شده است (۱۴). از آن زمان گزارش‌های متعددی نیز در مورد وقوع تغییر در مراحل مختلف بیان ژن از جمله تغییر در میزان mRNA و پلی پپتید ها ارائه شده است (۸، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۲۲، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۳ و ۴۱). میزان mRNA مربوط به ژن‌های گروه nsLTPs در واکنش به درجه حرارت‌های پایین در گیاهان از جمله جو (۲۸) افزایش یافته است. گزارش‌هایی از تجمع پروتئین‌های مربوط به گروه ژنی Dehydrins نیز در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله جو در دوره سازگاری به سرما وجود دارد (۴۲). همچنین، تجمع mRNA های مربوط به گروه ژنی Dehydrins در دوره سازگاری به سرما در بروموس و چاودار گزارش شده است (۳۰). در این مطالعه امکان وقوع فرایند سرماسختی و تغییر بیان ژن در واکنش به درجه حرارت‌های پایین در سطح سلول گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر درجه حرارت های پایین بالاتر از صفر بر میزان تحمل به سرما و بیان ژن‌های القائی در مقابل سرما در کالوس های تولید شده از جنین‌های نارس جو ارزیابی گردید. همچنین، آثار دمای محیط رشد کالوس قبل از قرار گرفتن در معرض درجه حرارت‌های پایین، و مدت قرار گرفتن کالوس ها در دمای پایین، بر روی میزان سرما سختی و بیان ژن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

رویان‌های نارس جو زمستانه کولتیوار ایگری (*Hordeum vulgare L.* cv. Igri) بر روی محیط کشت MS (۲۴)، حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D، ۳٪ ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار در دمای ۲۵ °C کشت گردیدند. چهار هفته پس از ظهور کالوس ها بازکشت آنها روی محیط کشت فوق انجام شد.

ارزیابی سرماسختی

کالوس های رویانزا به مدت ۲ هفته در هر یک از دماهای ۲۵ °C و ۲۰/۱۵ °C (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) بازکشت و به منظور ایجاد سازگاری به سرما، کشت های مذکور طی دوره‌های ۵ و ۱۰ روزه در معرض دماهای ۶/۲ °C (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) قرار گرفتند. پس از اتمام دوره سازگاری، جهت انجام آزمون انجماد قطعه های ۱۰۰ میلی‌گرمی کالوس در ۵ تکرار از تیمارهای مختلف درون لوله‌های شیشه‌ای قرار داده شدند. همچنین به منظور جلوگیری از پدیده سوپرکولینگ[2]، یک قطعه محیط کشت منجمد روی کالوس‌ها در داخل لوله ها قرار داده و با استفاده از روش پیشنهادی توسط پیرس و مک دونالد (۲۶) انجماد کالوس ها در دماهای ۲-، ۴-، ۶-، ۹-، ۱۲- و ۱۵- درجه سانتی گراد انجام گرفت. همزمان با اجرای آزمون انجماد، شاهد نیز از تیمارهای مختلف در نظر گرفته شد و بدون اعمال انجماد در مورد آنها در دمای معمولی اتاق (۲±۲۳) نگهداری شدند. تحمل کالوس ها در مقابل یخ زدگی با روش رنگ‌آمیزی تترازولیوم برآورد گردید. قدرت زنده مانی کالوس ها بر اساس شدت رنگ قرمز ایجاد شده در آنها در یک مقیاس صفر (کالوس های بدون رنگ، با سلول های کاملا مرده در اثر یخ زدگی) تا ۱۰ (شاهد، کالوس های یخ نزده)، ارزیابی گردید.

ارزیابی بیان ژن

مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم کالوس از تیمارهای مختلف در نیتروژن

1. Deacclimation
2. Supercooling

مایع منجمد نموده و با تغییر بافر[1] روش استخراج RNA از اندامهای گیاه (۴۳)، RNA کل از کالوسها استخراج گردید. کیفیت نمونه‌های RNA با قراردادن یک میکروگرم از RNA کل در ژل ۱٪ آگارز در داخل بافر TBE (۰/۰۸۹ مول Tris base، ۰/۰۸۹ مول اسید بریک، ۰/۰۰۲ مول EDTA، pH: ۸)، و با رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید و تحت نور ماوراء بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

برای ارزیابی نورذرن مقدار ۱۰ میکروگرم RNA کل از هر نمونه در یک ژل ۱/۲ درصد آگارز و ۲/۲ مول فرمالدئید طبق روش معرفی شده توسط سمبروک و همکاران (۲۶). الکتروفورز گردید وبه یک غشاء نایلونی با بار مثبت به روش نورذرن بلاتینگ به کار گرفته شده توسط دان و همکاران (۶)، منتقل گردید.

کلون های HmGlt4 و HmAPlt1.1 (از گروه ژنی nsLTPs) بدست آمده از RNA استخراج شده از جو وحشی *H murinum* تحت دمای پایین، به ترتیب توسط پاول هریسون و جین ریکسون ، به عنوان کاوشگر در ارزیابی تجمع mRNA در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه میزان کافی از HmGlt4 از تراریزش باکتریایی[2] طبق روش معرفی شده توسط سمبروک و همکاران (۳۲) استفاده گردید. بدین ترتیب که cDNA قرار گرفته درون ناقل پلاسمیدی (pGEM5Zf) (پرومگا[3]) حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین، به کلی باسیل (نژاد XL1Blue) منتقل گردید. پس از تکثیر کلونی های باکتری تراریخته، پلاسمید حامل HmGlt4 از کلی باسیل استخراج و cDNA فوق با استفاده از نوکلئاز محدودگر[4] NotI از پلاسمید قطع و پس از انجام الکتروفورز در ژل ۱٪ آگارز و بافر TAE (۰/۰۴ مول تریس استات، ۰/۰۰۱ مول EDTA، pH:۸). قطعات ژل حاوی نوارهای مربوط به cDNA مذکور جدا شدند. پس از خالص سازی، غلظت DNA با روش فلورسانس اتیدیوم بروماید پیشنهادی توسط منیاتیس و همکاران (۲۱) تعیین گردید.

آماده سازی قبل ازهیبریداسیون با انکو باسیون غشاء نایلونی حاوی RNA در دمای ۴۲°C درون محلول هیبریداسیون حاوی SSPE۵x (SSPE ۱ x عبارتست از: ۰/۱۸ مول NaCl، ۰/۰۱ مول NaH_2PO_4، ۰/۰۰۱ مول EDTA، pH: ۷/۴)، Denhardt's ۵ x (Denhardt's ۱۰۰ x عبارتست از: ۲٪ (وزن در حجم) از BSA[5]، فیکول، PVP[6]، ۰/۵ درصد SDS، ۵۰ % فرمامید و ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر DNA اسپرم سالمون[7])، بعمل آمد.

کاوشگرهای مورد نظر (HmGlt4 و HmAPlt1.1) به روش آغازگر تصادفی و با استفاده از کیت مخصوص (MBI-Fermentas) با نشانگر [α-^{32}P]dCTP نشاندار شدند. هیبریداسیون RNA باکاوشگرهای مذکور و در داخل محلول هیبریداسیون فوق الذکر در دمای ۴۲ °C انجام شد. پس از آن خودپرتونگاری[8] با استفاده از فیلم حساس (فوجی آر ایکس) در ۷۰ °C- تا ظهور لکه ها یا نوارهای مشخص، انجام گرفت.

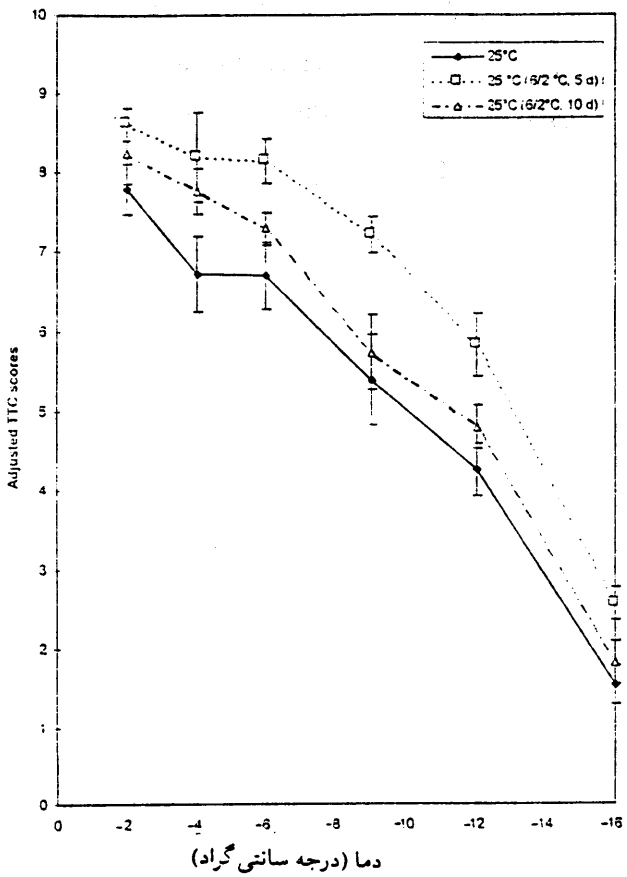
همچنین با استفاده از دانسیتومتر نشانه‌های حاصل از هیبریداسیون مورد ارزیابی کمی قرار گرفت.

نتایج

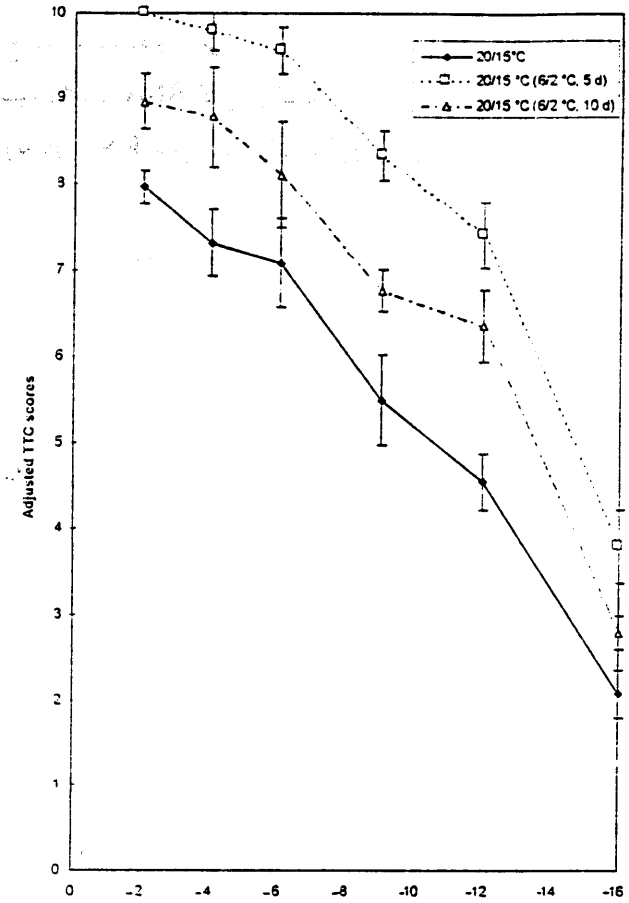
کالوس های جو ابتدا در هر یک از دماهای ۲۵ °C و ۲۰/۱۵ °C (۱۴ ساعت/ ۱۰ ساعت)، رشد نموده و پس از آن تحت دمای ۶/۲ °C (۱۴ساعت/ ۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز قرار گرفتند تا آثار دما و مدت زمان تاثیر آن بر میزان سرماسختی و mRNAهای ژنهای القاء شونده در مقابل سرما مورد ارزیابی قرار گیرند. جزئیات مربوط به عوامل مختلف بر مقاومت به سرما در شکل های شماره ۱و۲ و جدول شماره ۱ آورده شده است.

تحمل در مقابل یخ زدگی در نتیجه رشد کالوس تحت درجه حرارت‌های پایین افزایش یافت. قدرت زنده مانی پس از انجماد در کالوس‌های نگهداری شده در دمای ۶ °C (۱۴ ساعت) و ۲°C (۱۰ساعت) بیشتر از آنهایی بود که رشد آنها در دماهای ۲۵ °C و یا ۲۰/۱۵ °C (شب /روز) انجام گرفت. اما افزایش دوره رشد تحت دماهای پایین (۶/۲ °C) از ۵ به ۱۰ روز نه تنها باعث افزایش تحمل کالوس نگردید، بلکه کاهش زنده مانی را در دماهای پایین انجماد (۹°C-) بهمراه داشت (جدول ۱).

1. Extraction buffer
2. Bacterial transformation
3. Promega
4. Restriction nuclease
5. Bovine serum albumin
6. Polyvinyl pyrolidone
7. Salmon sperm DNA
8. Autoradiography



شکل ۱- قدرت زنده مانی پس از انجماد درکالوس های جو کشت شده بر روی محیط کشت MS، که ابتدا در دمای ۲۵°C رشد نموده و پس از آن در دمای ۶/۲°C (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز قرار گرفتند. داده ها میانگین ± خطای استاندارد مربوط به ۵ تکرار را نشان می دهند. داده های بدست آمده (به روش رنگ آمیزی تترازولیوم) ازکالوس پس از انجماد در درجه حرارت های مختلف، نسبت به مقادیر شاهد (کالوس نگهداری شده در درجه حرارت اتاق) تصحیح شده‌اند. داده های مربوط به شاهد از کالوس های قرارگرفته از قبل در دماهای ۲۵°C و ۶ / ۲°C به مدت ۵ و ۱۰ روز، به ترتیب ۰/۳۲ ± ۹، ۰/۲۳ ± ۸/۶ و ۰/۳۷ ± ۸/۸ می‌باشند.

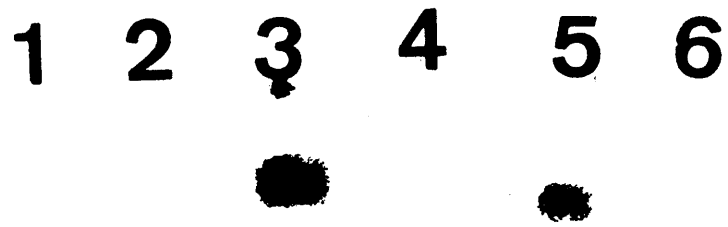


شکل ۲- قدرت زنده مانی پس از انجماد درکالوس های جو کشت شده بر روی محیط کشت MS، که ابتدا در دمای ۱۵°C / ۲۰ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) رشد نموده و پس از آن در دمای ۲°C / ۶ (۱۴ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز قرارگرفتند. داده ها میانگین ± خطای استاندارد مربوط به ۵ تکرار را نشان می دهند. داده های بدست آمده (به روش رنگ آمیزی تترازولیوم) ازکالوس پس از انجماد در درجه حرارت های مختلف نسبت به مقادیر شاهد (کالوس نگهداری شده در درجه حرارت اتاق) تصحیح شده‌اند. داده های مربوط به شاهد ازکالوس های قرارگرفته از قبل در دماهای ۱۵°C / ۲۰ و ۶/۲°C به مدت ۵ و ۱۰ روز، به ترتیب ۰/۳۷ ± ۸/۸، ۰/۲۴ ± ۸/۴ و ۰/۳۷ ± ۹/۲ می‌باشند.

دمای رشد کالوس قبل از انتقال به درجه حرارت های پایین نیز بر روی‌میزان افزایش تحمل به سرما مؤثر بود. اگرچه کالوس های کشت شده‌دردماهای ۲۵ °C و ۱۵ / ۲۰ °C ابتدا از نظر مقاومت به یخ‌زدگی اختلاف معنی داری نشان ندادند، اما پس از قرار گرفتن در درجه حرارت ۶/۲ °C سرماسختی کشت های انتقال یافته از محیط ۱۵ / ۲۰ °C بیشتر از کالوس های منتقل شده از دمای ۲۵ °C بود (جدول ۱).

سرماسختی کالوس تحت تیمارهای مختلف با در نظر گرفتن میزان LT_{50}[1] (دمایی که باعث ۵۰ درصد مرگ ومیر می‌گردد) نیز در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. داده‌های مربوطه نشان

1. Lethal temperature



شکل ۳- میزان تجمع mRNA در کالوس جو *(Hordeum vulgare)* کشت شده در ۲۵°C و ۱۵°C / ۲۰ (۱۴ساعت/۱۰ساعت) بر روی محیط کشت MS و انتقال یافته به مدت ۵ و ۱۰ روز به دمای ۶/۲°C (۱۴ساعت/۱۰ساعت). کلون HmGht4 به عنوان کاوشگر در ارزیابی نورژن مورد استفاده قرار گرفت.
۱- ۲۰/۱۵°C (۱۴ساعت/۱۰ساعت) (شاهد) ۲- ۲۵°C (شاهد) ۳- ۲۰/۱۵°C به ۶/۲°C (۱۴ساعت/۱۰ساعت) به مدت ۵ روز
۴- ۲۵°C به ۶/۲°C به مدت ۵ روز ۵- ۲۰/۱۵°C به ۶/۲°C به مدت ۱۰ روز ۶- ۲۵°C به ۶/۲°C درجه به مدت ۱۰ روز

جدول ۱ - مقایسه داده های مربوط به تحمل به سرما که به روش رنگ آمیزی تترازولیوم از کالوس جو تحت شرایط مختلف حرارتی بدست آمده اند و در شکل های ۱ و ۲ نیز نشان داده شده اند.

Freezing Temp. (°C)	25 °C vs 20/15 °C			6/2 °C, 5 days vs 6/2 °C, 0 days		6/2 °C, 10 days vs 6/2 °C, 0 days		6/2 °C, 5 days vs 6/2 °C, 10 days	
	6/2 °C, 0 day	6/2 °C, 5 day	6/2 °C, 10 day	25 °C	20/15 °C	25 °C	20/15 °C	25 °C	20/15 °C
-2	ns	***	ns	ns	***	ns	*	ns	*
-4	ns	*	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns
-6	ns	**	ns	*	**	ns	ns	*	ns
-9	ns	*	ns	*	***	ns	ns	*	**
-12	ns	*	*	*	***	ns	**	ns	ns
-15	ns	*	*	*	*	m	ns	ns	ns

***، **، * و ns به ترتیب تفاوتهای معنی دار در سطوح ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد و عدم وجودتفاوت معنی دار را نشان می دهند.

می‌دهند که قرار گرفتن در معرض درجه حرارت های پایین (۶/۲ °C) به مدت ۵ و ۱۰ روز تحمل به یخ زدگی را به ترتیب از ۱۲/۷ °C- به ۱۴/۳ °C- و ۱۳/۳ °C- در کالوس هایی که قبلا در دمای ۲۵ °C قرار داشتند و از ۱۲/۹ °C- به ۱۵/۷ °C- و ۱۴/۷ °C- در کالوس‌های انتقال یافته از ۲۰/۱۵ °C افزایش داد.

ارزیابی نورژن بر روی RNA کل استخراج شده از تیمارهای مختلف بعمل آمد. نتایج مربوطه در مجموع روند مشابهی را در بیان دو ژن مورد آزمایش در واکنش به تیمارهای مختلف و تنها با

جدول ۲ - تحمل در مقابل یخ زدگی (بر حسب LT_{50}) در کالوس جو کشت شده بر روی محیط کشت MS در دمای ۲۵°C یا ۲۰/۱۵°C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) و قرار گرفته بمدت ۵ و یا ۱۰ روز در معرض دمای ۶/۲°C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت). داده‌ها از روی شکل های شماره ۱ و ۲ استخراج شده اند.

دمای رشد اولیه					
۲۵°C	۲۵°C		۲۰/۱۵°C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت)		
۲۵°C	۲۵°C ← ۶/۲°C	۲۵°C ← ۶/۲°C	۲۰/۱۵°C	۲۰/۱۵°C ← ۶/۲°C	۲۰/۱۵°C ← ۶/۲°C
	۵ روز	۱۰ روز		۵ روز	۱۰ روز
-۱۲/۷°C	-۱۴/۲°C	-۱۳/۲°C	-۱۲/۹°C	-۱۵/۷°C	-۱۴/۷°C

جدول ۳ - داده های دانسیتومتری بدست آمده از نتایج ارزیابی میزان mRNA مربوط به ژنهای خانواده nsLTPs در کالوسهای جو. داده های حاصل از تیمارهای مختلف نسبت به مقادیر مربوط به کالوسهای کشت شده در دمای ۲۰/۱۵°C و متعاقبا" در درجه حرارت ۶/۲°C برای مدت ۵ روز (*) تنظیم شده اند.

تیمار	دانسیته نسبی	
	HmAPlt 1.1	HmGh4
شاهد (۲۰/۱۵°C)	۰/۲۶	۰/۲۴
شاهد (۲۵°C)	۰/۰۵	۰/۱۳
۲۰/۱۵°C ← ۶/۲°C به مدت ۵ روز*	۱/۰۰	۱/۰۰
۲۵°C ← ۶/۲°C به مدت ۵ روز	۰/۰۷	۰/۰۷
۲۰/۱۵°C ← ۶/۲°C به مدت ۱۰ روز	۰/۵۴	۰/۶۱
۲۵°C ← ۶/۲°C به مدت ۱۰ روز	۰/۰۳	tr

tr : دانسیته نسبی کمتر از ۰/۱٪

اختلافاتی در میزان بیان آنها نشان داد. نتایج مربوط به هیبریداسیون با کاوشگر HmGlt4 در شکل شماره ۳، و داده های حاصل از دانسیتومتری نتایج نورذرن با هر دو ژن در جدول شماره ۳ نشان داده شده‌اند. میزان mRNA های هیبرید شده با کاوشگرهای HmGlt4 و HmAP1.1 در اثر کاهش دما از ۲۰/۱۵°C به ۶/۲°C برای مدت ۵ و ۱۰ روز افزایش نشان داد، ولی با افزایش مدت رشد کالوس در دمای پایین (۶/۲°C) از ۵ به ۱۰ روز، تجمع mRNA کاهش یافت. نتایج حاصله افزایش قابل توجهی را در میزان mRNA های مورد نظر هنگام انتقال کالوس از دمای ۲۵°C به ۶/۲°C نشان‌ندادند. همچنین میزان mRNA های مربوط به ژن های مورد مطالعه، در کشت های قرار گرفته در دمای ۲۰/۱۵°C بیشتر از کالوس های نگهداری شده در ۲۵°C بود.

بحث

یکی از مسائل اساسی در مطالعه مقاومت به سرما در گیاهان بررسی عوامل دخیل در فرایند سرماسختی می باشد. در این مطالعه اثر دمای اولیه رشد قبل از شروع سرماسختی، بر روی تحمل کالوس جو در مقابل سرما مورد بر رسی قرار گرفت. درجه حرارت رشد قبل از دوره سازگاری اگرچه مستقیما بر مقاومت کالوس در برابر یخ زدگی اثر نداشت. اما بر میزان سرماسختی ایجاد شده در کالوس ها پس از انتقال به دمای پایین تأثیر داشت. کالوس های کشت شده در

۲۰/۱۵°C (۱۴ساعت/۱۰ساعت) در مقایسه با کشت های انجام گرفته در ۲۵°C پس از قرار گرفتن به مدت ۵ و ۱۰ روز در دمای ۶/۲°C (۱۴ساعت/۱۰ساعت) مقاومت بیشتری را در برابر انجماد نشان دادند (جدول ۱). آثار متفاوت دماهای رشد فوق الذکر قبل از دوره سازگاری ممکن است مربوط به دمای ۱۵°C (در محیط ۲۰/۱۵°C) باشد، که سرماسختی می تواند در این دما در کالوس شروع شود و یا به دلیل رشد کندتر کالوس در دمای فوق باشد. همچنین با توجه به اینکه این دما حدود ۱۰ درجه پایین‌تر از درجه حرارت معمولی (۲۵°C) برای رشد کالوس می باشد، قرارگرفتن کالوس ها تحت دمای مذکور ممکن است منجر به مصرف پایین‌تر و در نتیجه کاهش کمتر مواد مغذی نظیر قندها گردد که می توانند به ایجاد و افزایش سازگاری به سرما در کالوس مؤثر باشند. علاوه بر این، کاهش سریع درجه حرارت رشد روند ایجاد سرماسختی را بسیار کند نموده و در چنین مواقعی درجه حرارت های زیر صفر در بافت‌های با سرماسختی کمتر صدمه شدیدتری وارد می نمایند. بنابراین کالوس‌های کشت شده در ۲۵°C پس از ورود به دوره سرماسختی با از دست دادن ۱۹ تا ۲۳ درجه به دمای ۶°C (۱۴ ساعت) و ۲°C (۱۰ ساعت) می رسند و آسیب وارده به سلولها در این حالت بیشتر از زمانی است که دمای محیط ۱۴ یا ۱۳ درجه تغییر می نماید تا کالوس ها از دمای ۲۰/۱۵°C به ۶/۲°C برسند.

انتقال کالوس ها به دمای پایین‌تر از شرایط عادی رشد، افزایش مقاومت سلول ها را در برابر یخ زدگی به دنبال داشت، که در موافقت با گزارش های موجود در مورد تأثیر مثبت دوره سازگاری بر میزان سرماسختی در گیاه کامل جو (۹، ۲۸ و ۲۹) می باشد. اما با افزایش دوره سازگاری تحمل سلول ها در برابر سرما کاهش یافت و در نتیجه کالوس های قرار گرفته تحت دمای ۶/۲°C (۱۴ساعت/۱۰ساعت) به مدت ۵ روز، سرماسختی بیشتری را از کشت های نگهداری شده به مدت ۱۰ روز در این دما نشان دادند (شکل‌های ۱ و ۲، جدول ۱). نتایج این بخش از مطالعه در مغایرت با پیشنهادات مربوط به تأثیر مستقیم طول دوره سرما سختی بر تحمل به سرما برای مثال در یونجه (۴۷) می‌باشد. اگرچه امکان عدم افزایش تحمل به سرما با طولانی تر شدن دوره سازگاری تحت دمای پایین وجود دارد (۴۶)، اما کمتر گزارشی به کاهش تحمل گیاه در نتیجه طولانی شدن دوره سرماسختی اشاره دارد. بنابراین داده های مربوط به اثر طول دوره سازگاری بر تحمل در برابر یخ زدگی در کالوس، با گزارشات موجود در مورد گیاه کامل مطابقت ندارد، که ممکن است به دلیل تأثیر عوامل مختلفی باشد که می توانند کالوس را که کاملا به تغذیه مصنوعی وابسته است، تحت تأثیر قراردهند. روش ارزیابی نورذرن بلاتینگ به منظور مطالعه mRNA های شبیه به ژنهای HmGlt4 و HmAPlt1.1 (از گروه ژنی nsLTPs) بکار گرفته شد. نظر به اینکه غشاء سیتوپلاسمی تحت تأثیر کم آبی ناشی از یخ زدگی سلول قرار می‌گیرد، تغییر در رفتار این غشاء به ویژه در طول فرایند سازگاری می‌تواند به افزایش تحمل در مقابل سرما کمک نماید (۳۷). دلیل این امر ممکن است تغییرات انجام گرفته در ترکیب لیپیدهای موجود در غشاء سیتوپلاسمی (۳۶) شامل افزایش در نسبت فسفولیپیدها باشد (۳۸)، و می‌تواند با سیالیت[1] غشاءهای سیتوپلاسمی در اثر افزایش در نسبت اسیدهای چرب اشباع نشده به اسیدهای چرب اشباع شده باشد (۳۱)، که با کاهش تدریجی دمای محیط و اغلب از اواسط اکتبر تا اواسط دسامبر در طبیعت اتفاق می‌افتد(۴۹). تغییرات در ترکیب لیپیدهای غشاء سیتوپلاسمی در دوره سازگاری مستلزم انتقال بعضی از لیپیدها از محل تشکیل آنها به غشاء سیتوپلاسمی می‌باشد(۳)،واز جمله انتقال فسفاتیدیل کولین[2] به غشاء سیتوپلاسمی است که تشکیل آن در آندوپلاسمیک رتیکولوم[3] گزارش شده است (۴۸). پروتئین‌های انتقال دهنده لیپیدها (LTPs) جابجایی لیپیدها را بین سیستم‌های غشایی مختلف تسهیل می‌نمایند (۳) و انتقال انواع مختلف لیپیدها بوسیله پروتئین‌های موسوم به nsLTPs توسط یامادا (۴۸) گزارش شده است. نتایج بدست آمده در این پژوهش در موافقت با بیان ژن های گروه LTPs در واکنش به تنش های محیطی است که توسط هیوز و پیرس (۱۶)؛ دان و همکاران (۷)؛ مولینا و گارشاالمدو (۲۳) و وایت و همکاران (۴۵) در گونه های مختلف گیاهی گزارش شده است. نقش این ژن ها در افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی نظیر سرما، خشکی و حتی حفاظت در مقابل عوامل بیماریزا (۴)، می‌تواند به دلیل شرکت آنها در تشکیل کوتیکول باشد (۳۴، ۳۹، ۵ و ۴۰)، که گیاه را از تنش های محیطی محافظت می‌نماید.

به طور کلی میزان mRNA های هیبرید شده به موازات

1. Fluidity 2. Endoplasmic reticulum

الگـوی سـازگاری و تـحمل کـالوس بـه سـرما تـغییر مـی نـماید، وهمبستگی مثبتی بین میزان بـیان ژن در واکـنش بـه سـرما و سـطح تحمل‌سلول ها در مقابل یخ زدگی وجود دارد. انتقال کالوس های جو ازمـحیط اولیـه رشـد بـه دمـای پـایین ۶/۲°C بـه تـغییر افـزایـنده mRNAهای مربوط به ژن های فوق انجامید، اما با طولانی‌تر شدن زمان نگهداری کالوس تجمع mRNA کاهش می‌یابد. همچنین دمای بالا (۲۵°C) در دوره مقدماتی رشد قبل از انتقال به درجه حـرارت پایین (۶/۲°C) در مقایسه با ۲۰/۱۵°C افزایش کمتری از بیان ژن را در دوره سازگاری به همراه داشت. در مجموع نتایج این بررسی بر آثار معکوس دمای بالای محیط رشد اولیه کالوس و زمان طولانی نگهداری کشت های سلولی، بر تحمل به سـرما و بـیان ژن دلالت دارد. دلیل بروز تأثیرات مذکور می تواند ترکیبات محیط کشت بـه عنوان عاملی مهم در تأمین نـیازهای سـلول بـاشد. تـغییر در غـلظت اجزای محیط کشت می تواند بـر سـرماسختی و بـیان ژنـهای عـامل مقاومت به سرما تأثیر بگذارد. دمای بالاتر رشـد یـعنی ۲۵°C کـه درجه حرارت معمولی برای کشت بافت می باشد رشد خوب و سریع کالوس را میسر نموده و منجر به مصرف سریعتر و تخلیه محیط کشت از مواد ضروری در سوخت و ساز و ادامه حیات سلول، می گـردد. زمان نیز می تواند دارای اثر باشد. افزایش مدت زمان نگهداری حتی در درجه حرارت پایین (۶/۲°C) که تحت آن رشد کالوس هرچند به میزان کم ادامه دارد می تواند بر غلظت ترکیبات مـختلف مـحیط کشت از جمله ساکارز اثر نماید، که تغییر در غلظت آن می تواند به تغییر مقاومت به سرما و بیان ژنهای مرتبط با آن در کالوس (۱) منجر گردد.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. طبائی عقدائی، س. ر. و آر. اس. پیرس. ۱۳۷۸. اثر ساکارز بر بیان ژنهای (Gene expression) عامل مقاومت به سرما در کشت های سلول و کالوس جو (*Hordeum vulgare*). نخستین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، تهران، ص ۳۰۷-۲۹۵

2. Angelo, E., V.E. Iversin, W.G. Brierly, and W.G. London, 1939. Studies on some factors relating to hardiness in the strawberry. Minnesota Agricultural Experiment Station. Technical Bulletin., 135: 1-36
3. Arondel, V. and J.C. Kader, 1990. Lipid transfer in plants. Experimentia, 46: 579-585
4. Bray, E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. Plant Physiol., 103: 1035-1040
5. Clark, A.N. and H.J. Bohnert, 1993. Epidermis-specific transcripts; Nucleotide sequence of a full-length cDNA of EPI12, encoding a putative lipid transfer protein. Plant Physiol., 103: 677-678
6. Dunn, M.A., R.S. Pearce, and P.L. Jack, 1990. Molecular charachterization of a barley gene induced by cold treatment. J. Exp. Bot., 41 (232): 1405-1413
7. Dunn, M.A., M.A. Hughes, L. Zhang, R.S. Pearce, A.S. Quigley and L.J. Peter, 1991. Nuclotide sequence and molecular analysis of of the low temperature induced cereal gene, BLT4. Mol. Gen. Genet., 229: 389-394
8. Dunn, M.A., A. Morris, L.J. Peter and M.A. Hughes, 1993. A low-temperature-responsive translation elongation factor 1α from barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Mol. Biol., 23: 221-225
9. Dunn, M.A., N.G. Goddard, L. Zhang, , R.S. Pearce and M.A. Hughes, 1994. Low-temperature-responsive barley genes have different control mechanisms. Plnat Mol. Biol., 24: 879-888
10. Fennel, A. and P.H. Li, 1985. Rapid cold acclimation and deacclimation in winter spinach. Acta Hort., 168: 179-183
11. Goddard, N.J., M.A. Dunn, A.J. Zhang, A.J. White, P.L. Jack and M.A. Hughes, 1993. Molecular analysis and spatial expression pattern of a low-tempewrature-specific barley gene, blt101. Plant Mol. Biol., 23:871-879

12. Graham, D. and B.D. Patterson, 1982. Response of plants to low, non-freezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation. Annu. Rev. of Plant Physiol., 33: 347-372

13. Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol., 41: 187-223

14. Guy, C.L. and K.G. Niemi, 1985. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3873-3877

15. Hughes, M.A. and R.S. Pearce, 1988. Low temperature treatment of barley plants causes altered gene expression in shoot meristems. J. Exp. Bot., 39(207): 1461-1467

16. Hughes, M.A., M.A. Dunn., R.S. Pearce, A.J. White, and L. Zhang, 1992. An abscisic-acid-responsive low temperaure barley gene has homology with a maize phospholipid transfer protein. Plant, Cell Environ., 15: 861-865

17. Larcher, W. 1973. Gradual progress of damage due to temperature stress. Temperature resistance and survival. In: Precht, H., J. Christophersen, H. Hensel, and W. Larcher, eds, Temperature and life.Springer, Berlin, pp 194-231

18. Levitt, J. 1956. The hardiness of plants, Academic Press, New York

19. Levitt, J. 1972. Responses of plants to environmental stresses. 1st ed., Academic Press, New York

20. Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. 2nd ed., vol. 1, Academic Press, New York

21. Maniatis, T., E.F. Fritch, and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

22. Mohapatra, S.S., L. Wolfraim, R.J. Poole, and R.S. Dhinsa, 1989. Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold-acclimation-specific genes of alfalfa. Plant Physiol., 89: 375-380

23. Molina, A. and F. Garcia-Olmedo, 1993. Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. The Plant J., 4(6): 983-991

24. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497

25. Palta, J.P. 1992. Mechanisms for obtaining freezing stress resistance in herbaceous plants. In: Stalker, H.T. and J.P. Murphy, eds, Plant breeding in the 1990s; Proceeding of the Symposium on Plant Breeding in the 1990s. Wallington: C.B.A. International, pp 219-250

26. Pearce, R.S. and I. McDonald, 1978. The independent assessment of frost hardiness of excised laminae, excised roots and trimmed tillers of tall fescue (*Festuca arundinacea*). J. Appl. Ecol., 15: 885-895

27. Pearce, R.S., M.A. Dunn, and M.A. Hughes, (1993) Molecular biology of cold tolerance. In: Jackson, M.B. and C.R. Black, eds, Interacting stresses on plants in a changing climate, NATO ASI Series 1: Global Environmental Change, vol. 16, Springer-Verlag, Berlin, pp 681-695

28. Pearce, R.S., M.A. Dunn, J.E. Rixon, P. Harrison, and M.A. Hughes, 1996. Expression of cold-inducible genes

and frost hardiness in the crown meristem of young barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Igri) plants grown in different environments. Plant Cell Environ., 19: 275-290

29. Pearce, R.S., C.E. Houlston, K.M. Atherton, J.E. Rixon, P. Harrison, M.A. Hughes, and M.A. Dunn, 1998. Localization of expression of three cold-induced genes, blt101, blt4.9, and blt14, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley. Plant Physiol., 117: 787-795
30. Robertson, A.J., A. Weninger, R.W. Wilen, P. Fu, and L.V. Gusta, 1994. Comparison of dehydrin gene expression and freezing tolerance *Bromus inermis* and *Secale cereale* grown in controlled environments, hydroponics, and the field. Plant Physiol., 16: 171-179
31. Sakai, A. and W. Larcher, 1987. Frost survival of plants: Responses and adaptation of freezing stress. Springer-Verlag, Berlin
32. Sambrook, J., E.F. Fritch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
33. Sarhan, F., F. Ouellet, and A. Vazquez-Tello, 1997. The wheat wcs120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. Physiol. Plant., 101: 439-445
34. Sossountzov, L., L. Ruiz-Avila, F. Vignolos, A. Jolliot, V. Arondel, F. Tchang, M. Grosbois, F. Guerbette, E. Miginiac, M. Delseny, P. Puigdomenech, and J.C. Kader, 1991. Spatial and temporal expression of maize lipid transfer protein gene. Plant Cell, 3: 923-933
35. Steponkus, P.L. and F.O. Lanphear, 1968. The role of light in cold acclimation of *Hedera helix* L. Plant Physiol., 21: 151-156
36. Steponkus, P.L., D.V. Lynch, and M. Uemura, 1990. The influence of cold acclimation on the lipid composition and cryobehavior of the plasma membrane of isolated rye protoplasts. Philosophical Transaction of the Royal Society of London Series, B, Biological, 326: 571-583
37. Steponkus, P.L., R. Lagnis, and S. Fujikawa, 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. In: Steponkus, P.L. ed. Advances in low-temperature biology, vol. 1, JAI Press LTD, London, pp 1-61
38. Steponkus, P.L., M. Uemura, and M.S. Webb, 1993. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat: Two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In: Steponkus, P.L. ed. Advances in low-temperature biology, vol.2, JAI Press LTD, London, pp 211-312
39. Sterk, P., H. Booij, G.A. Schelle kens, A.V. Kammen, and S.C. De Vries, 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. The Plant Cell, 3: 907-921
40. Thoma, S., Y. Kaneko, and C. Somerville, 1993. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. The plant J., 3(3): 427-436
41. Thomashow, M.F. 1990. Molecular genetics of cold acclimation in plants. Advan. Genet., 28: 99-131
42. Van Zee, K., F.Q. Chen, P.M. Hayes, T.J. Close, and T.H.H. Chen, 1995. Cold specific induction of a dehydrin

gene family member in barley. Plant Physiol., 108: 1233-1239

43. Wadsworth, G.J., M.G. Redinbagh, and J.G. Scandalios, 1988. A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. Analytical Biochem., 172: 279-283
44. Weiser, C.J. 1970. Cold resistance and injury in woody plants. Science, 169: 1269-1278
45. White, A.J., M.A. Dunn, K. Brown and M.A. Hughes, 1994. Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley. J. Exp. Bot., 45 (281): 1885-1892
46. Wit, F. 1952. Techniques of breeding cold-resistant grasses and clovers. Proceedings of the 6th international Grassland Congress, USA: 1607-1612
47. Wolfraim, L.A., R. Langis, H. Tyson, and R.S. Dhindsa, 1993. cDNA sequence, expression, and transcript stability of a cold acclimation-specific gene, cas18, of alfalfa (*Medicago falcata*) cells. Plant Physiol., 101: 1275-1282
48. Yamada, M., 1992. Lipid transfer proteins in plants and microorganisms. Plant and Cell Physiol., 33: 1-64
49. Yoshida, S., 1984. Chmical and biophysical changes in plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz. cv. Goroji). Plant Physiol., 76: 257-265