زیست‌شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره چهاردهم، زمستان ۱۳۹۱، صفحه ۳۵-۴۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۸/۰۷
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۲/۰۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۳/۲۸

بررسی اثر تیمارهای سرما و روز کوتاه بر بیان ژن دهیدرین در دانه‌رُست‌ها و شاخسارهای باززایی شده پسته (*Pistacia vera* L.)

الهه زمانی بهرام‌آبادی، فرخنده رضانژاد * و حسینعلی ساسان
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

چکیده

تنش سرما یک عامل محیطی اصلی است که تولید محصولات زراعی را محدود می‌کند. بسیاری از گیاهان می‌توانند از طریق فرآیند عادت به سرما که در نتیجه قرارگیری در معرض طول روزهای کوتاه و دماهای سرد بالای صفر درجه حاصل می‌شود، تحمل به سرما و انجماد را در خود افزایش دهند. پروتئین‌های دهیدرین، در زمان عادت به سرما که باعث آبگیری سلول‌های گیاهی می‌شود، در سلول تجمع کرده، از ساختار غشاها و ماکرومولکول‌ها حفاظت می‌کنند. پسته (*Pistacia vera* L.) گونه‌ای درختی، شاخص مناطق کویری است که در معرض دماهای گرم و سرد شدید قرار می‌گیرد. در این پژوهش، اثر تیمار سرما و طول روز کوتاه، بر بیان ژن دهیدرین، در دانه‌رُست‌ها و شاخسارهای باززایی شده پسته رقم بادامی بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمار سرما بیان ژن را به طور معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد، نسبت به شاهد افزایش می‌دهد. هیچ یک از تیمارهای طول روز کوتاه اثری بر بیان ژن دهیدرین نداشت. از آن‌جا که گیاهان باززایی شده ممکن است دچار تنوع سوماکلونال (پیکر تکثیری) شده، پاسخ‌های متفاوتی به تنش‌ها نشان دهند، مقایسه‌ای بین گیاهان رشد کرده در شرایط در زیوه و در شیشه، از نظر میزان بیان این ژن در اثر تیمار یکسان سرمایی، انجام شد. این مقایسه نشان داد که میزان بیان ژن در حالت طبیعی و همچنین پس از تیمار سرما، در گیاهان باززایی شده نسبت به دانه‌رُست‌ها کمتر بود.

واژه‌های کلیدی: پسته، دهیدرین، طول روز کوتاه، عادت به سرما، کشت در شیشه

مقدمه

تنش سرما یک عامل محیطی اصلی است که تولید محصولات زراعی را محدود می‌کند و اثر شدیدی بر بقا و توزیع جغرافیایی گیاهان دارد. گیاهان از نظر تحمل دماهای سرد (صفر تا ۱۵ درجه سانتیگراد) و انجماد (کمتر از صفر درجه سانتیگراد) بسیار متفاوتند. بیشتر گیاهان متحمل به سرما هستند؛ گرچه بسیاری از آنها متحمل به انجماد نیستند، با وجود این، می‌توانند از طریق

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: frezanejad@uk.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۴۱۳۲۰۲۰۷۳

فرآیند عادت به سرما (cold acclimation) که در نتیجه قرارگیری در معرض طول روزهای کوتاه و دماهای سرد بالای صفر درجه حاصل می‌شود، تحمل به سرما و انجماد را در خود افزایش دهند. فرآیند عادت به سرما مستلزم تغییرات بزرگ زیست-شیمیایی و عملکردی است (Jan *et al.*, 2009). در زمستان، فعالیت گیاهان چندساله که توانایی عادت به سرما را دارند، در مرحله رویشی متوقف می‌شود. در واقع، گیاهان وارد مرحله خفتگی می‌شوند و تحمل به انجماد در آنها افزایش می‌یابد. به طور معمول، پاسخ گیاه به تنش سرما به سه مرحله مشخص تقسیم می‌شود. نخستین مرحله عادت به سرما (cold acclimation) (پیش از سخت شدن= prehardiness) است که در دماهای سرد بالای دمای انجماد آب رخ می‌دهد. مرحله دوم (سخت شدن=hardiness) به یک دوره قرارگیری در معرض دماهای زیر صفر نیاز دارد و پس از آن میزان کامل تحمل به دست می‌آید. مرحله سوم و پایانی، عادت‌زدایی (deacclimation) و بازگشت گیاه به حالت عادی پس از زمستان است. برخی از گیاهان (به ویژه درختان) به ترکیبی از طول روز کوتاه و سرما نیاز دارند تا تحمل به سرما به طور کامل در آن‌ها ایجاد شود و پس از گرم شدن هوا و طولانی شدن طول روز، تحمل به انجماد در آنها از دست می‌رود (Janska *et al.*, 2010). فرآیند عادت به سرما (مرحله نخست پاسخ گیاه به تنش سرما) شامل دو مرحله مشخص است. در ابتدا کاهش طول روز باعث توقف رشد و ایجاد خفتگی می‌شود و افزایش حدواسطی در تحمل به انجماد دیده می‌شود. سپس، در مرحله دوم با قرارگیری گیاه در معرض دماهای سرد و سپس دماهای انجماد، بیشینه تحمل به انجماد در گیاهان به دست می‌آید و بخش‌های ماندگار در زمستان قادر به بقا در دماهای انجماد می‌شوند (Puhakainen *et al.*, 2004). پسته خوراکی (*Pistacia Vera*) از گونه‌های مهم جنس *Pistacia* L. است. این جنس متعلق به تیره Anacardiaceae و راسته Sapindales است. *P. vera* تنها گونه مهم از نظر اقتصادی در جنس *Pistacia* L. است و در مناطق گرمسیری دنیا به خاطر دانه خوراکی‌اش کشت می‌شود. پسته گونه‌ای درختی، شاخص مناطق کم آب است که در معرض خشکی و دماهای گرم و سرد شدید قرار می‌گیرد (Tilkat and Onay, 2008). پروتئین‌های دهیدرین یعنی گروه (D-11) از پروتئین‌های LEA (Late Embryogenesis Ebundant) در اعضای مختلفی از قلمرو گیاهان مانند گیاهان غیرآوندی، گیاهان آوندی بدون دانه و به طور عمومی‌تر در همه گیاهان دانه‌داری که بررسی شده‌اند، شناسایی شده است. مطالعات نشان داده است که این پروتئین‌ها به شکل بسیار آب‌دار، بدون ساختار و بی‌نظم در محلول آبی قرار دارند و در زمان تنش‌هایی که باعث آب‌گیری سلول می‌شوند (مانند سرما، خشکی، شوری و ...) از غشاها و ماکرومولکول‌های سلول حفاظت می‌کنند (Battaglia *et al.*, 2008). توالی ناحیه کد کننده ژن دهیدرین پسته (*PV-dhn*) توسط Yakubov و همکاران (۲۰۰۵) شناسایی شد. ژن دهیدرین پسته cDNA ای با ۸۷۴ bp جفت باز و یک ORF (Open Reading Frame) با ۶۹۰ bp دارد که پروتئینی با ۲۳۰ اسید آمینه را کد می‌کند و احتمالاً ژنی تک نسخه‌ای در ژنوم پسته است. پروتئین دهیدرین پسته وزنی حدود ۲۵/۹ کیلودالتون دارد. دهیدرین پسته از نوع K_5 است (Yakubov *et al.*, 2005). با توجه به اثر درخور توجه

تنش سرما بر گیاهان و همچنین، آثار مخرب این تنش بر گیاه پسته که از صادرات مهم غیر نفتی ایران است، بررسی سازوکارهای درگیر در فرآیند عادت به سرما و پاسخ به این تنش می‌تواند مهم باشد. هدف این پژوهش، این است که تأثیر تیمارهای سرما و طول روز کوتاه بر بیان ژن دهیدرین، در برگ دانه‌رُست‌های پسته بررسی شود و مشخص شود که آیا ژن دهیدرین پسته در اثر سرما، طول روز یا هر دوی آنها در زمستان بیان می‌شود، همچنین، مشخص شود که آیا این ژن علاوه بر اندام‌های ماندگار در زمستان، در اندام غیر ماندگار مانند برگ نیز عملکردی هست یا خیر. از آن جا که گیاهان باززایی شده ممکن است پاسخ‌های متفاوتی به تنش‌ها ارایه دهند، مقایسه‌ای بین گیاهان رشد کرده در شرایط در زیوه (*in vivo*) و در شیشه (*in vitro*)، از نظر میزان بیان این ژن در اثر تیمارهای یکسان انجام شود.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان در گلخانه

بذرهای پسته رقم بادامی از مؤسسه تحقیقات پسته کشور در رفسنجان تهیه شدند. بذرها به مدت ۱ دقیقه در محلول (WV^{-1}) ۱/۱۰۰۰ قارچ‌کش بنومیل ضدعفونی شدند، سپس به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده، در گلدان‌های حاوی مخلوط ۱:۱ از خاک و ماسه کاشته شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با حرارت روز و شب ۲۳-۲۵ درجه سانتیگراد و تحت نور ۲۰۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفته، یک روز در میان آبیاری شدند.

کشت گیاهان در شیشه

محیط کشت مورد استفاده، محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) همراه با ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۸ گرم در لیتر آگار، مقدار ۳ mgl^{-1} BAP+۰/۲۵ mgl^{-1} 2,4-D و ویتامین‌ها بود. اسیدیته محلول در حد ۵/۸-۵/۹ تنظیم و محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۲ اتمسفر اتوکلاو شد. قطعات تک‌گره به اندازه حدود ۱ سانتی‌متر از گیاهان گلخانه‌ای یک ماهه به دست آمدند. برای ضدعفونی کردن، جداکشت‌ها به مدت ۴۵ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل به مدت ۲۵ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۵ درصد همراه با۴ قطره توین ۲۰ قرار گرفتند. جداکشت‌ها ۳ تا ۴ بار با آب مقطر استریل شسته و روی محیط کشت قرار گرفتند. نمونه‌ها در اتاق رشد در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتیگراد و تحت نور ۲۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند و هر ۲ هفته یک‌بار واکشت شدند.

تیمارها

به منظور انجام تیمار سرما، دانه‌رُست‌ها و شاخسارهای باززایی شدهٔ یک ماهه به مدت‌های ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. به منظور انجام تیمار طول روز کوتاه، دانه‌رُست‌ها و شاخسارهای باززایی شدهٔ یک ماهه به مدت‌های ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

طراحی آغازگر

توالی ناحیه کد کننده ژن‌های دهیدرین پسته به عنوان ژن پاسخگو (accession no: Y07600) و ژن NADH dehydrogenase، (accession no: HM991263) پسته به عنوان ژن مرجع (reference gene) از سایت NCBI

گرفته شد و طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام شد و سپس مناسب بودن آنها توسط نرم‌افزارهای BLAST و GeneRunner بررسی شد. توالی آغازگرهای طراحی شده به صورت زیر است، پس از آن، سنتز آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت سیناژن انجام شد.

Dehydrin Forward 2:
5’ ATGGATATGGCGTAGAGAAG 3’ TM: 52
Dehydrin Reverse 2:
5’ TACTTGGGATCTCATTCACC 3’ TM: 52
Product size: 156 bp

NADH dehydrogenase Forward:
5’ GGAGACTCAAATGGTGGATA 3’ TM: 55
NADH dehydrogenase Reverse:
5’ ACCTGCTAGTGGAGGAAGAC 3’ TM: 55
Product size: 216 bp

مطالعات بیان ژن

RNA کل از برگ گیاهان شاهد و تیمار با استفاده از کیت استخراج RNA، (Qiagene, RNeasy Plant Mini Kit, Germany) طبق روش مندرج در کیت استخراج شد. برای بررسی حضور، ارزیابی خلوص و تعیین غلظت RNA از روش‌های اسپکتروفتومتری با استفاده از زیست‌سنج نوری مدل ۶۱۳۱ (Eppendorf AG Biophotometer, Germany) و الکتروفورز افقی روی ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد. برای انجام RT-PCR، از RNA استخراج شده از همه گیاهان شاهد و تیمار به مقدار مساوی (۶۰۰ نانوگرم) برداشته شد و برای هر نمونه (شاهد و تیمارها) دو لوله در نظر گرفته شد که در یکی از آنها آغازگرهای ژن دهیدرین و در لوله دیگر، به عنوان شاهد داخلی (internal control)، آغازگرهای ژن NADH dehydrogenase ریخته شد. برای انجام RT-PCR از کیت RT-PCR یک مرحله‌ای، (BIONEER, *AccuPower*^{R} RT/PCR PreMix, Korea) طبق روش مندرج در کیت و ترموسایکلر مدل PTC، (MJ Mini Personal Termal Cycler BioRad, USA 1148)، استفاده شد. لوله‌های لیوفیلیزه موجود در کیت دارای تمامی مواد لازم برای سنتز cDNA و انجام PCR هستند. برنامه استفاده شده برای انجام واکنش PCR در جدول ۱ آورده شده است:

جدول ۱- برنامه اجرا شده در PCR به وسیله آغازگرهای سنتزکننده قطعه ۱۵۶ جفت بازی از ژن دهیدرین و قطعه ۲۱۶ جفت بازی از ژن مرجع. دمای اتصال آغازگرها برای ژن دهیدرین ۵۲ و برای ژن مرجع ۵۵ است.

زمان (دقیقه)	حرارت (°C)	مرحله	تعداد سیکل
۵	۹۴	واسرشت‌سازی اولیه	۱
۱	۹۴	واسرشت‌سازی	۳۰
۱	۵۲ و ۵۵	اتصال آغازگرها	
۱	۷۲	طویل شدن زنجیره DNA	
۷	۷۲	طویل شدن نهایی	۱

تحلیل داده‌ها

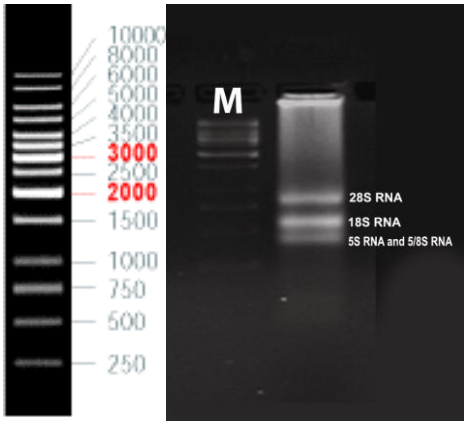
شدت باند تکثیر شده در واکنش PCR با استفاده از نرم‌افزار Totallab به دست آمد. سپس داده‌های مربوط به شدت باندها برای مقایسه میزان بیان ژن بین نمونه‌های شاهد و تیمار، با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مقایسه و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ ترسیم شدند. در آزمایش‌ها، RT-PCR سه تکرار در نظر گرفته شد.

نتایج

RNA کل

نتایج حاصل از خواندن جذب RNA استخراج شده نشان داد که جذب RNAها در طول موج ۲۶۰

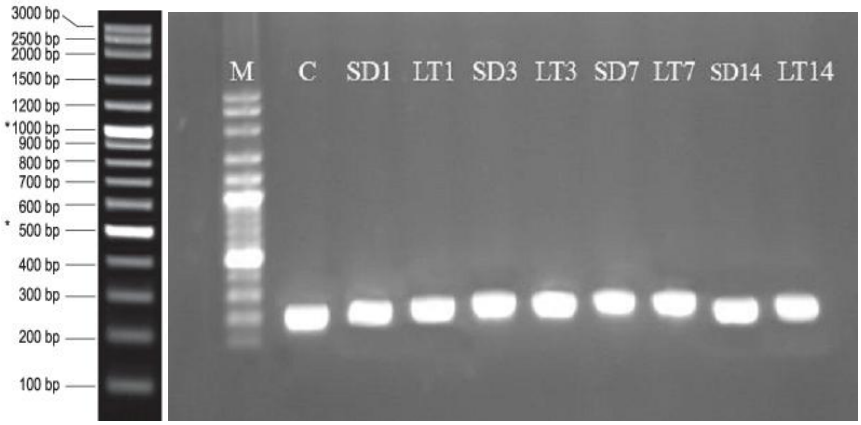
نانومتر به طور متوسط ۰/۰۶–۰/۰۷ بود. حضور سه باند پُر رنگ که به RNAهای ریبوزومی که نشان‌دهنده کیفیت مطلوب RNA استخراج شده برای انجام RT-PCR مربوط است، روی ژل آگاروز مشاهده شد (شکل ۱).



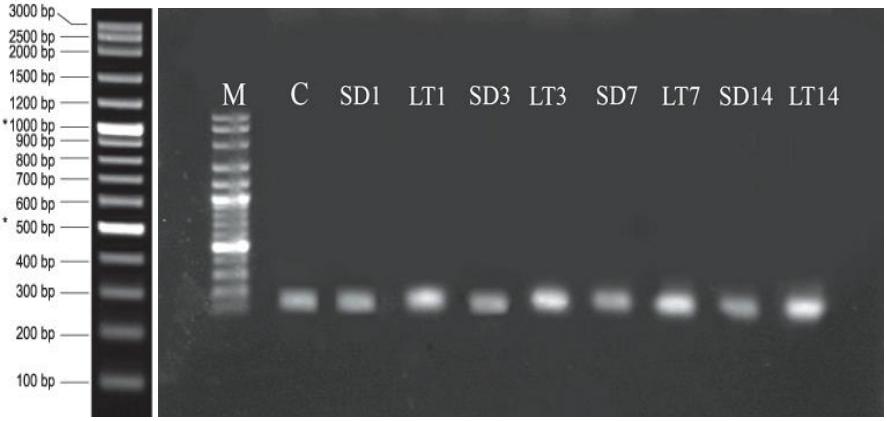
شکل ۱- نیم‌رخ الکتروفورزی یکی از نمونه‌های (۷ روز تیمار سرما) RNA کل استخراج شده از برگ پسته روی ژل آگاروز ۱ درصد. M: نشانگر مولکولی (1kb DNA ladder, Fermentase).

بیان ژن دهیدرین در دانه‌رُست‌های پسته

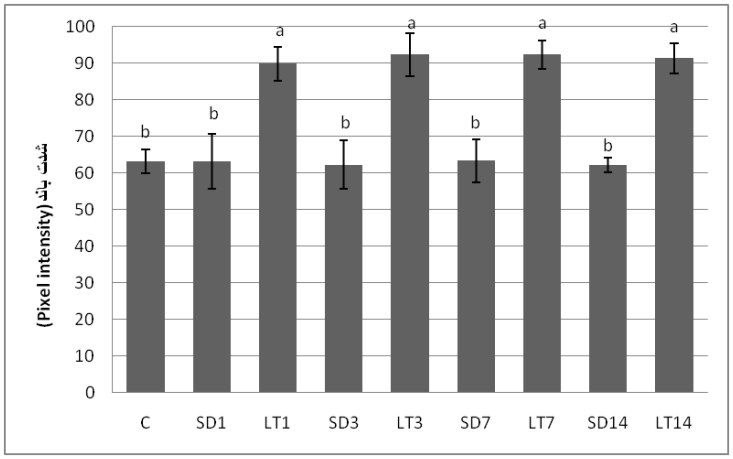
نتایج حاصل از RT-PCR، تکثیر قطعه ۱۵۶ جفت بازی را برای ژن دهیدرین و قطعه ۲۱۶ جفت بازی را برای ژن مرجع نشان داد (شکل‌های ۲ و ۳). داده‌های مربوط به شدت باندها که از نرم‌افزار Totallab (نسخه Phoretix 1D) به دست آمده بودند، نشان دادند که میزان بیان ژن مرجع در همه گیاهان شاهد و تیمار یکسان بود. همچنین، نشان داده شد که میزان بیان ژن دهیدرین تحت همه تیمارهای سرمایی (۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز) نسبت به گیاه شاهد افزایش معنی‌داری داشت، با این حال، تفاوتی در میزان بیان ژن تحت تیمارهای مختلف سرمایی دیده نشد. هیچ یک از تیمارهای طول روز کوتاه استفاده شده در این تحقیق (۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز) اثری بر بیان ژن دهیدرین نداشتند (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).



شکل ۲- نیم‌رخ الکتروفورزی باندهای حاصل از واکنش RT-PCR قطعه ۲۱۶ جفت بازی، با استفاده از آغازگرهای ژن مرجع. M: نشانگر مولکولی (Vivantice DNA ladder)؛ C: شاهد؛ SD1: ۱ روز طول روز کوتاه؛ LT1: ۱ روز سرما؛ SD3: ۳ روز طول روز کوتاه؛ LT3: ۳ روز سرما؛ SD7: ۷ روز طول روز کوتاه؛ LT7: ۷ روز سرما؛ SD14: ۱۴ روز طول روز کوتاه؛ LT14: ۱۴ روز سرما؛ (SD: Short Day, LT: Low Temperature).



شکل ۳- نیم‌رخ الکتروفورزی باندهای حاصل از واکنش RT-PCR قطعه ۱۵۶ جفت بازی، با استفاده از آغازگرهای ژن دهیدرین. M: نشانگر مولکولی (Vivantice DNA ladder)؛ C: شاهد؛ SD1: ۱ روز طول روز کوتاه؛ LT1: ۱ روز سرما؛ SD3: ۳ روز طول روز کوتاه؛ LT3: ۳ روز سرما؛ SD7: ۷ روز طول روز کوتاه؛ LT7: ۷ روز سرما؛ SD14: ۱۴ روز طول روز کوتاه؛ LT14: ۱۴ روز سرما؛ (SD: Short Day, LT: Low Temperature).



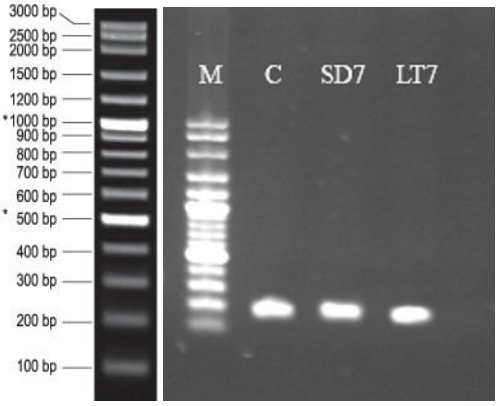
شکل ۴:- میزان بیان ژن دهیدرین در دانه‌رُست‌های شاهد و تیمارهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز سرما. میزان بیان ژن در اثر تیمارهای سرمایی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد دارد و در اثر تیمارهای طول روز کوتاه نسبت به شاهد تفاوتی نشان نمی‌دهد. C: شاهد؛ SD1: ۱ روز طول روز کوتاه؛ LT1: ۱ روز سرما؛ SD3: ۳ روز طول روز کوتاه؛ LT3: ۳ روز سرما؛ SD7: ۷ روز طول روز کوتاه؛ LT7: ۷ روز سرما؛ SD14: ۱۴ روز طول روز کوتاه؛ LT14: ۱۴ روز سرما؛ (SD: Short Day, LT: Low Temperature). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $P<0.05$ است.

بیان ژن دهیدرین در شاخسارهای باززایی شده پسته

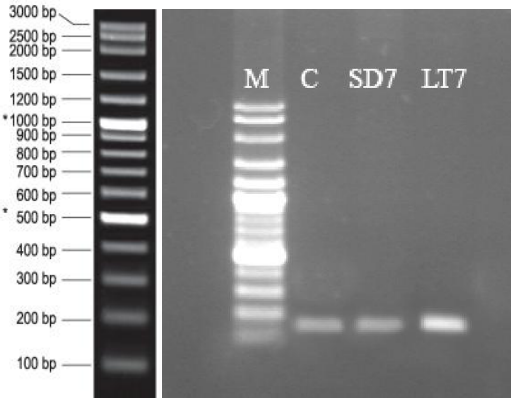
به منظور بررسی بیان ژن دهیدرین در شاخسارهای باززایی شده، از برگ شاخسارهای باززایی شده شاهد و تیمارهای ۷ روز سرما و ۷ روز طول روز کوتاه، RNA کل استخراج و RT-PCR انجام شد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن مرجع در همه گیاهان شاهد و تیمار یکسان بود و میزان بیان ژن دهیدرین تحت تیمار سرمایی نسبت به گیاه شاهد افزایش معنی‌داری داشت و در این‌جا نیز طول روز کوتاه اثری بر بیان ژن دهیدرین نداشت (شکل‌های ۵، ۶ و ۷).

مقایسه اثر سرما بر دانه‌رُست‌ها و شاخسارهای باززایی شده

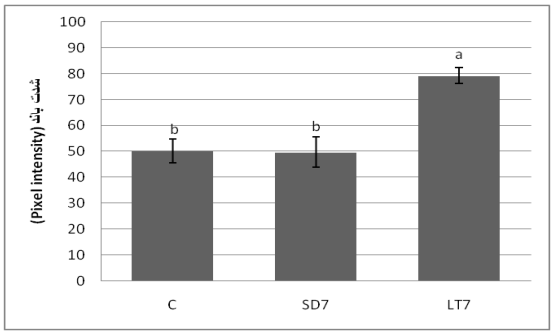
به منظور مقایسه اثر سرما بر بیان ژن دهیدرین در دانه‌رُست‌ها و شاخسارهای باززایی شده، از برگ دانه‌رُست‌ها و شاخسارهای باززایی شده شاهد و آنهایی که ۷ روز تیمار سرما دیده بودند، RNA کل استخراج و RT-PCR انجام شد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن مرجع در همه نمونه‌ها یکسان بود و شاخسارهای باززایی شده نسبت به دانه‌رُست‌ها، هم در حالت طبیعی و هم پس از تیمار سرما، کمتر قادر به بیان ژن دهیدرین بودند (شکل‌های ۸، ۹ و ۱۰).



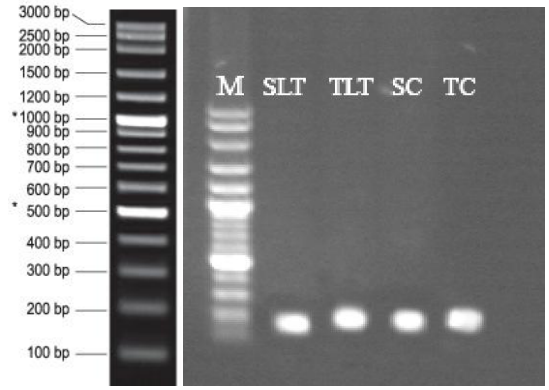
شکل ۵- نیم‌رخ الکتروفورزی باندهای حاصل از واکنش RT-PCR قطعه ۲۱۶ جفت بازی، با استفاده از آغازگرهای ژن مرجع. M: نشانگر مولکولی (Vivantice DNA ladder)؛ C: شاهد؛ SD7: ۷ روز طول روز کوتاه؛ LT7: ۷ روز سرما؛ (SD: Short Day, LT: Low Temperature).



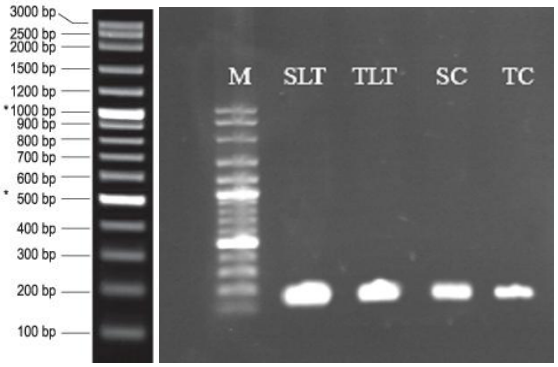
شکل ۶- نیم‌رخ الکتروفورزی باندهای حاصل از واکنش RT-PCR قطعه ۱۵۶ جفت بازی، با استفاده از آغازگرهای ژن دهیدرین. M: نشانگر مولکولی (Vivantice DNA ladder)؛ C: شاهد؛ SD7: ۷ روز طول روز کوتاه؛ LT7: ۷ روز سرما؛ (SD: Short Day, LT: Low Temperature).



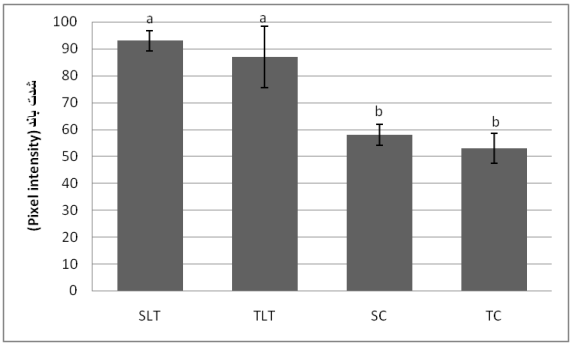
شکل ۷- میزان بیان ژن دهیدرین در شاخسارهای باززایی شده‌ی شاهد و تیمارها ۷ روز سرما و ۷ روز طول روز کوتاه. میزان بیان ژن در اثر تیمار سرما افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد دارد و در اثر تیمار طول روز کوتاه نسبت به شاهد تفاوتی نشان نمی‌دهد. C: شاهد؛ SD7: ۷ روز طول روز کوتاه؛ LT7: ۷ روز سرما؛ (SD: Short Day, LT: Low Temperature). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $P<0.05$ است.



شکل ۸- نیم‌رخ الکتروفورزی باندهای حاصل از واکنش RT-PCR قطعه ۲۱۶ جفت بازی، با استفاده از آغازگرهای ژن مرجع. M: نشانگر مولکولی (Vivantice DNA ladder)؛ SLT: ۷ روز تیمار سرما در دانه‌رُست؛ TLT: ۷ روز تیمار سرما در شاخسارهای باززایی شده؛ SC: شاهد دانه‌رُست؛ TC: شاهد شاخسار باززایی شده؛ (SLT: Seedling Low Temperature, TLT: Tissue culture Low Temperature, SC: Seedling Control, TC: Tissue culture Control).



شکل ۹- نیم‌رخ الکتروفورزی باندهای حاصل از واکنش RT-PCR قطعه ۱۵۶ جفت بازی، با استفاده از آغازگرهای ژن دهیدرین. M: نشانگر مولکولی (Vivantice DNA ladder)؛ SLT: ۷ روز تیمار سرما در دانه‌رُست؛ TLT: ۷ روز تیمار سرما در شاخسارهای باززایی شده؛ SC: شاهد دانه‌رُست؛ TC: شاهد شاخسار باززایی شده؛ (SLT: Seedling Low Temperature, TLT: Tissue culture Low Temperature, SC: Seedling Control, TC: Tissue culture Control).



شکل ۱۰- میزان بیان ژن دهیدرین در دانه‌رُست‌ها و شاخسارهای باززایی شده شاهد و تیمار ۷ روز سرما. SLT: ۷ روز تیمار سرما در دانه‌رُست؛ TLT: ۷ روز تیمار سرما در شاخسارهای باززایی شده؛ SC: شاهد دانه‌رُست؛ TC: شاهد شاخسار باززایی شده. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $P<0.05$ است. (SLT: Seedling Low Temperature, TLT: Tissue culture Low Temperature, SC: Seedling Control, TC: Tissue culture Control).

بحث

بیان طبیعی ژن دهیدرین در گیاهان

میزان پروتئین دهیدرین در سلول‌های گیاهان چوبی همراه با تغییرات فصلی تغییر می‌کند. در گیاهان چوبی مانند غان و هلو نشان داده شده است که میزان پروتئین دهیدرین با شروع پاییز، شروع به افزایش می‌کند و در اواسط زمستان که گیاه عادت به سرما کرده است، به بیشینه رسیده، در اواخر بهار همراه با عادت‌زدایی، کاهش می‌یابد (Yakubov *et al.*, 2005). Yakubov و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که پروتئین دهیدرین پسته نیز در جوانه‌های گل‌آذین نر چنین تغییرات فصلی را نشان می‌دهد. Rorat و همکاران (۲۰۰۴) اظهار داشتند که دهیدرین‌ها به طور تقریبی در همه بافت‌های رویشی، در زمان رشد بهینه، بیان پایینی داشته و در سلول‌ها حضور دارند. Richard و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که در حالت طبیعی، در میزان رونوشت ژن دهیدرین بین

اندام‌های مختلف گیاهان تفاوت‌هایی وجود. همچنین، Wisniewski و همکاران (۱۹۹۶) نشان داده‌اند که ممکن است چندین نوع دهیدرین در یک گیاه وجود داشته باشد که برخی به طور فصلی و برخی به طور دامی و ثابت بیان می‌شوند و همچنین، بعضی از دهیدرین‌ها تنها در برخی از اندام‌ها بیان می‌شوند. گزارش‌های محدودی در مورد بیان ژن دهیدرین در برگ‌ها وجود دارد، اما Puhakainen و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که مسیرهای انتقال پیامی که باعث تحمل به انجماد در بافت‌های ماندگار در زمستان مانند ساقه و جوانه‌های غان نقره‌ای (*Betula pendula* cv Roth) می‌شوند، در برگ‌های این گیاه نیز بیان می‌شوند. این محققان اظهار داشتند که برگ می‌تواند مدل خوبی برای بررسی وقایع مولکولی که در طول فرآیند عادت به سرما رخ می‌دهند، باشد. در این تحقیق نیز برگ به عنوان اندام مورد مطالعه انتخاب شد. نتایج RT-PCR نشان داد که ژن دهیدرین پسته در شرایط طبیعی یعنی شرایط گلخانه‌ای با طول روز بلند و دمای اتاق، میزان پایینی از بیان را در برگ دانه‌رُست‌ها داشت.

بیان ژن دهیدرین در اثر تنش‌های غیر زیستی مانند سرما

گیاهان در طول زندگی در معرض انواعی از تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند. آب‌گیری سلول، وجه مشترک تنش‌های غیر زیستی مانند سرما، خشکی و شوری است و بسیاری از ژن‌های پاسخگو به سرما، توسط این تنش‌ها نیز القا می‌شوند (Puhakainen *et al.*, 2004). در گیاهانی که در معرض آب‌گیری قرار گرفته‌اند سمیّت فلزی همراه با تولید گونه‌های اکسیژن آزاد امری عمومی است و دهیدرین‌ها می‌توانند به عنوان نظافتچی‌های رادیکال‌های آزاد حاصل از تنش اکسیداتیو عمل کنند. اتصال به فلز که از ویژگی‌های پروتئین‌های دهیدرین است، ممکن است با عملکرد سمّ‌زدایی مورد نیاز تحت شرایط تنش مرتبط باشد (Battaglia *et al.*, 2008). همچنین، شواهدی وجود دارد که دهیدرین‌ها از غیرفعال شدن آنزیم‌ها که در اثر آب‌گیری اتفاق می‌افتد، جلوگیری می‌کنند که این عمل به برهم‌کنش این پروتئین‌ها با سطوح آب‌گریز غشاها و پروتئین‌هایی که در حال واسرشت شدن هستند، وابسته است (Hara *et al.*, 2001). به علاوه، مارپیچ‌های α و ساختار بی‌نظم دهیدرین‌ها در فراهم کردن یا حفظ آب در محیط‌های ریز سلولی برای حفظ عملکرد و تثبیت ساختار ماکرومولکول‌ها و ساختارهای سلولی در زمان کمبود آب نقش مهمی دارند (Battaglia *et al.*, 2008). هورمون ABA در مسیرهای انتقال پیام بسیاری از ژن‌های پاسخگو به تنش دخیل است و در نتیجه بیان این ژن‌ها در اثر ABA خارجی نیز القا می‌شود (Puhakainen *et al.*, 2004).

پژوهش‌های بسیاری حاکی از آن است که ژن دهیدرین گیاهان در پاسخ به شرایط محیطی که باعث آب‌گیری می‌شوند، بیان می‌شود. مطالعات زیادی روی گیاهان چوبی، افزایش بیان ژن‌های مختلف دهیدرین را تحت تنش سرما، خشکی ، شوری، تیمار با ABA خارجی، پلی‌اتیلن گلیکول، جاسمونات و متیل جاسمونات و همچنین پس از زخم به طور قطعی بیان کرده‌اند (Yakubov, 2005). در این پژوهش نیز بیان ژن دهیدرین پس از تنش‌های سرمایی، افزایش پیدا کرد که با گزارش‌هایی که روی سایر گیاهان انجام شده‌اند، همخوانی دارد. با افزایش طول دوره سرما از ۱

تا ۱۴ روز افزایش بیشتری در بیان ژن دیده نشد، گرچه ممکن است با افزایش طول دوره سرما بیان اندکی افزایش پیدا کرده باشد، با وجود این، ممکن است افزایش آنقدر اندک باشد که در آزمایش نشان داده نشده است و ممکن است با افزایش بیشتر طول دوره تیمار که به تدریج باعث آب‌گیری بیشتری از سلول‌ها می‌شود، افزایش معنی‌داری دیده شود.

بیان ژن دهیدرین در اثر تغییر طول روز

فرآیند عادت به سرما شامل دو مرحله مشخص است. در ابتدا، کاهش طول روز باعث توقف رشد و ایجاد خفتگی می‌شود و افزایش حدواسطی در تحمل به انجماد به دست می‌آید. سپس، در مرحله دوم با قرارگیری گیاه در معرض دماهای سرد و سپس دماهای انجماد بیشینه تحمل به انجماد در گیاهان به دست می‌آید و بخش‌های ماندگار در زمستان قادر به بقا در دماهای انجماد می‌شوند (Puhakainen *et al.*, 2004). فیتوکروم‌ها، حسگرهای نوری مسؤول درک طول روز در گیاهان هستند. درک تغییرات نوری توسط این گیرنده‌ها مسیرهای انتقال پیامی را در سلول‌ها فعال می‌کند که سبب تغییر در بیان برخی ژن‌ها شده، پاسخ‌های عملکردی و نموی به میزان نور داده می‌شود (Welling *et al.*, 2002). گزارش‌هایی درباره افزایش بیان ژن دهیدرین در اثر کوتاه شدن طول روز به تنهایی وجود دارد (Welling *et al.*, 2002؛ Marian *et al.*, 2004؛ Puhakainen *et al.*, 2004؛ Welling *et al.*, 2004؛ Wisniewski *et al.*, 2006). طول روز کوتاه نیز باعث آب‌گیری متوسطی از سلول‌ها به ویژه سلول‌های جوانه‌ها می‌شود که این آب‌گیری ممکن است نتیجه تجمع موادی مانند پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها باشد (Welling *et al.*, 2002). نتایج این محققان نشان داد که طول روز کوتاه و سرما، از دو مسیر مستقل افزایش بیان دهیدرین را القا می‌کنند. Puhakainen و همکاران (۲۰۰۴) اظهار داشتند که طول روز کوتاه به تنهایی تأثیر بسیار اندکی بر بیان ژن دهیدرین در برگ‌های غان نقره‌ای داشت، اما سلول‌ها را برای درک بعدی سرما حساس‌تر کرد و بیان ژن دهیدرین در گیاهانی که پیش از تیمار سرما، مدتی در شرایط طول روز کوتاه قرار گرفته بودند نسبت به گیاهانی که تنها تیمار سرما دیده بودند، بسیار بالاتر بود. این اثر همیارانه (synergistic effect) طول روز کوتاه و سرما، گیاه را به سختی بیشینه در زمستان می‌رساند.

در این پژوهش، اثر تیمار طول روز کوتاه روی برگ پسته بررسی شد، اما حتی ۱۴ روز پس از تیمار نیز افزایشی در میزان بیان ژن دهیدرین دیده نشد. ممکن است طول دوره تیمار (بیشینه ۱۴ روز) به اندازه کافی زیاد نبوده تا تغییری در میزان بیان ایجاد شود. همان‌طور که Welling و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که بیان دهیدرین در صنوبر دورگه (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* Michx) پس از ۲۱ روز از تیمار روز کوتاه اندکی افزایش پیدا کرد، گرچه در تحقیق Puhakainen و همکاران (۲۰۰۴) حتی یک روز تیمار روز کوتاه، بیان ژن دهیدرین غان را اندکی افزایش داد. همچنین، ممکن است که افزایش بیان به حدی پایین بوده که در آزمایش نشان داده نشده است و ممکن است با افزایش طول دوره تیمار که به تدریج باعث آب‌گیری بیشتری از سلول‌ها می‌شود، افزایش معنی‌داری دیده شود. همچنین، ممکن است که این ژن دهیدرین (*PV-dhn*) که تنها ژن دهیدرین شناخته شده

در پسته است، تنها از طریق پاسخ به سرما موجب عادت به سرما می‌شود و پاسخگو به طول روز نیست. همان‌طور که Wisniewski و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که یکی از ژن‌های دهیدرین هلو (*Pronus persica*)، به نام *Ppdhn1* در اثر سرما و خشکی، و ژن دهیدرین دیگر آن *Ppdhn2* تنها با خشکی بیان می‌شوند و طول روز کوتاه روی بیان هیچ یک از آنها تأثیری ندارد. همچنین، Marian و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که از سه ژن دهیدرین *Rhododendron*، تنها یکی از آنها پاسخگو به هر دو عامل سرما و طول روز است و دو ژن دیگر تنها توسط پاسخ به سرما باعث عادت به سرما می‌شوند و طول روز روی بیان آنها اثری ندارد.

تفاوت بیان ژن دهیدرین در اثر سرما بین گیاهان گلخانه‌ای و گیاهان در شیشه

روش‌های کشت در شیشه به روش‌های سنتی پرورش گیاه برای تغییر و پیشرفت گیاهان کمک زیادی کرده‌اند. از دهه ۱۹۴۰ مشخص شد که کشت بافت باعث تولید رقم‌هایی از طریق عادت‌دهی و ایجاد تنوع سوماکلونال می‌شود و از اوایل دهه ۱۹۷۰ این روش برای تولید گیاه با ویژگی‌های بهتر استفاده شد. این تنوع سوماکلونال در گیاهک‌های باززایی شده دیده می‌شود و ممکن است از قبل در سلول‌ها وجود داشته، یا از طریق کشت القا شده باشد. این تنوع ممکن است ژنتیک یا اپی‌ژنتیک باشد. تغییرات در گیاهک‌های باززایی شده توانایی زیادی برای کمک به کشاورزی و زراعت دارد، اما این توانایی هنوز در سطح وسیع استفاده نشده است. در کشت در شیشه ممکن است انواعی از سلول‌های جهش یافته تولید شوند که تفاوت‌های مفیدی مانند مقاومت به تنش، مقاومت به علف‌کش و مقاوت به آنتی‌بیوتیک نشان دهند. به هر حال، باززایی گیاهان با ویژگی‌های مطلوب در موارد محدودی گزارش شده است (Thorpe, 2007). در این مطالعه، در دانه‌رُست‌ها و شاخسارهای باززایی شده پسته، میزان بیان ژن در اثر تیمار سرما افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد دارد. اما میزان بیان ژن در شاخسارهای باززایی شده هم در حالت طبیعی (شاهد) و هم پس از تیمار سرما کمتر از بیان ژن در دانه‌رُست‌ها است، یعنی برگ شاخسارهای پسته باززایی شده در شیشه، در حالت طبیعی، تا حدودی کمتر از برگ گیاهان رشد کرده در زیوه، ژن دهیدرین را بیان می‌کردند که علت آن می‌تواند رطوبت بالای شرایط در شیشه و یا حتی حذف اثر شوری روی بیان این ژن باشد که این شرایط ایده‌آل برای دانه‌رُست‌های رشد کرده در خاک ممکن است فراهم نباشد. گرچه شاخسارهای در شیشه نیز مانند گیاهان گلخانه‌ای، پس از تیمار سرما قادر به افزایش بیان ژن دهیدرین بودند اما پس از تیمار نیز میزان بیان ژن در شاخسارهای در شیشه نسبت به گیاهان گلخانه‌ای که تیمار مشابهی دیده بودند، کمتر بود که علت آن می‌تواند پایین‌تر بودن بیان در حالت عادی در شاخسارهای در شیشه باشد، می‌توان احتمال داد که با افزایش طول دوره یا پایین آوردن دمای تیمار سرما، میزان بیان ژن در شاخسارهای در شیشه به سطح دانه‌رُست‌ها برسد.

مطالعات مروری در این تحقیق گزارشی درباره مقایسه بیان ژن دهیدرین بین گیاهان در شیشه و گیاهان رشد کرده در شرایط عادی نشان نداد. به هر حال، Palonen و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که پس از

تیمار سرما، شاخسارهای در شیشه‌ی تمشک (*Rubus idaeus* L.) نسبت به گیاهان رشد کرده در زیوه، کمتر قادر به افزایش کربوهیدرات‌های محلول (که در زمان عادت به سرما، در سلول‌ها افزایش می‌یابد) در سلول‌ها بودند و LT_{50} (دمایی که در آن مرگ گیاهان در اثر تنش، ۵۰ درصد است) مشاهده شده در گیاهان در شیشه بالاتر از LT_{50} گیاهان رشد کرده در زیوه بود.

همچنین، Guy و همکاران (۱۹۸۷) نشان دادند که گیاهان اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) رشد کرده در شیشه مانند گیاهان رشد کرده در خاک، پس از قرارگیری در معرض تیمار سرما، قادر به عادت به سرما بودند و تحمل به انجماد خود را افزایش دادند، اما میزان تحمل به دست آمده در آنها تا حدودی کمتر از گیاهان رشد کرده در خاک بود.

منابع

Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garciarrubio, A., Campos, F. and Covarrubias, A. (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. Plant Physiology 148: 6-24.

Guy, C. L., Hummel, R. L. and Haskell, D. (1987) Induction of freezing tolerance in spinach during cold acclimation. Plant Physiology 84: 868-871.

Hara, M., Terashima, S. and Kuboi, T. (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. Plant Physiology 58: 1333-1339.

Jan, J., Mahboob-ul-Hussain, and Andrabi, K. (2009) Cold resistance in plants: a mystery unresolved. Electronic Journal of Biotechnology 12(3):1-15.

Janska, A., Marsik, P., Zelenkova, S. and Ovesna, J. (2010) Cold stress and acclimation- What is important for metabolic adjustment? Plant Biology 12: 395-405.

Marian, C., Eris, A., Krebs, S. and Arora, R. (2004) Environmental regulation of a 25 kDa dehydrin in relation to *Rhododendron* cold acclimation. Journal of American Society for Horticultural Science 129: 354-359.

Murashige, T. and Skooge, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Palonen, P., Buszard, D. and Donnelly, D. (2000) Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown *in vitro* and *in vivo*. Physiologia Plantarum 110: 393-401.

Puhakainen, T., Li, C., Boije-Malm, M., Kangasjarvi, J., Heino, P. and Palva, T. (2004) Short-day potentiation of low temperature-induced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. Plant Physiology 136: 4299-4307.

Richard, S., Morency, M. J., Drevet, C., Jouanin, L. and Seguin, A. (2000) Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stress. Plant Molecular Biology 43: 1-10.

Rorat, T., Grygorowicz, W. J., Irzykowski, W. and Rey, P. (2004) Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. Planta 218: 878-885.

Thorpe, T. A. (2007) History of plant tissue culture. Molecular Biotechnology 37: 169-180.

Tilkat, E. and Onay, A. (2008) Direct shoot organogenesis from *in vitro*-derived mature leaf explants of pistachio. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 45: 92-98.

Welling, A., Moritz, T., Palva, T. and Junttila, O. (2002) Independent activation of cold acclimation by low temperature and short photoperiod in hybrid aspen. Plant Physiology 129: 1633-1641.

Welling, A., Rinne, P., Vihera-Aarnio, A., Kontunen-Soppela, S., Heino, P. and Palva, T. (2004) Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). Journal of Experimental Botany 55: 507-516.

Wisniewski, M., Bassett, C., Renaut, J., Farrell, R., Tworkoski, T. and Artlip, T. (2006) Ddifferential regulation of two dehydrin genes from peach (*Pronus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. Tree Physiology 26: 575-584.

Wisniewski, M., Close, T. J., Artlip, T. and Arora, A. (1996) Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants. Physiologia Plantarum 96: 496-505.

Yakubov, B., Barazani, O., Shachack, A., Rowland, L. J., Shoseyov, O. and Golan-Goldhirsh, A. (2005) Cloning and expression of a dehydrin-like protein from *Pistacia ver*a L. Trees 19: 224-230.

Effects of cold and short day treatments on dehydrin gene expression in seedlings and regenerated shoots of pistachio (*Pistacia vera* L.)

Elaheh Zamani Bahramabadi, Farkhondeh Rezanejad * and Hosseinali Sasan

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Abstract

Cold stress is a major environmental factor that limits the agricultural products. Plants can increase their cold and freezing tolerance by being exposed to short days and cold, non freezing temperatures, a process known as cold acclimation. In the period of cold acclimation that causes dehydration of cells, dehydrin proteins accumulate inside the cells and protect the membranes and macromolecules structure. Pistachio (*Pistacia vera* L.) is a tree species characteristic of arid zone, which is exposed to extreme temperatures. In this study, the effects of cold and short day treatments on dehydrin gene expression were investigated in seedlings and regenerated shoots of pistachio cultivar Badami. The results showed that cold treatment increased the gene expression meaningfully compaired to the control. The short day treatments had no effect on dehydrin gene expression. Because the regenerated plants may encounter somaclonal variations and thus show different responses to stresses, a comparison was made between *in vivo* and *in vitro* grown plants with respect to the rate of gene expression, under similar cold treatment. Comparison of the plants grown *in vivo* and *in vitro* showed that dehydrin gene expression was lower in regenerated shoots under natural condition and after cold treatment.

Key words: Pistachio, Dehydrin, Short day period, Cold acclimation, *in vitro* culture

* Corresponding Author: frezanejad@uk.ac.ir