

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

سید رضا طبائی عقدانی

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

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۴/۸

### خلاصه

سازگاری در مقابل سرما<sup>۱</sup> و تغییر بیان ژن<sup>۲</sup> در واکنش به درجه حرارت های پایین مورد مطالعه قرار گرفتند. کشت های رویانزا از جو زراعی ایجاد و از کالوس به عنوان یک سیستم جایگزین برای گیاه کامل<sup>۳</sup> در مطالعات سازگاری به سرما و بیان ژن های 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 رویان های نارس اثر درجه حرارت های پایین (۶/۲ C) (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) بر روی تحمل به سرما<sup>۴</sup> و بیان ژن های القاء شونده در واکنش به سرما، بررسی شد. همچنین اثرات دمای محیط رشد اولیه (۲۵ C) و با ۲۰/۱۵ C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) کالوس قبل از انتقال به دمای ۶/۲ C و مدت زمان (۵ و ۱۰ روز) قرار گرفتن در دمای ۶/۲ C بر میزان سرما سختی<sup>۵</sup> و بیان ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. تحمل به سرما در کالوس های تحت تیمارهای مختلف با انجام آزمون انجماد<sup>۶</sup> و با استفاده از روش رنگ آمیزی تترازولیوم<sup>۷</sup> و ارزیابی زنده ماندن 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<sup>۸</sup> هیبریداسیون mRNA با cDNAهای HmGlt4 و HmAPt1 (از گروه ژنی LTPs<sup>۹</sup>)، به منظور ارزیابی میزان mRNA های مربوط به این ژن ها انجام شد. نتایج بدست آمده نشان دادند که کالوس در دمای ۶/۲ C سرما سخت شده و بیان ژن های فوق الذکر در آن افزایش می یابد، که تغییر بیان آنها در برابر سرما در مرستم گیاه کامل نیز گزارش شده است.

واژه های کلیدی: سازگاری به سرما، سرما سختی، بیان ژن، دمای پایین بالاتر از نقطه انجماد، ژن های القاء شونده در مقابل

سرما، تجمع mRNA، روش رنگ آمیزی تترازولیوم، نوردزن بلاتینگ<sup>۱۰</sup>، کالوس، کشت های رویانزا

### مقدمه

می گردد. 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 می یابد (۱۸ و ۱۹). سرما سختی در پاییز و زمستان به بالاترین حد خود می رسد. در بهار دماهای بالا منجر به

سازگاری به سرما از مهمترین عوامل حفظ کننده گیاهان مناطق معتدل در مقابل یخ زدگی می باشد. 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

- |   |                       |   |                         |
|---|-----------------------|---|-------------------------|
| 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 |   |                         |

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 کالوس‌ها 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 کالوس‌ها بازکشت آنها روی محیط کشت فوق انجام شد. ارزیابی سرما سختی

کالوس‌های رویان‌ها به مدت ۲ هفته در هر یک از دماهای ۲۵°C و ۱۵°C (۲۰/۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) بازکشت و به منظور ایجاد سازگاری به سرما، کشت‌های 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 قطعه‌های ۱۰۰ میلی‌گرمی کالوس در ۵ تکرار از تیمارهای مختلف درون لوله‌های شیشه‌ای قرار داده شدند. همچنین به منظور جلوگیری از پدید آمدن سوپرکولینگ، یک قطعه محیط کشت منجمد روی کالوس‌ها در داخل لوله‌ها قرار داده و با استفاده از روش پیشنهادی توسط پیرس و مک دونالد (۲۶) انجماد کالوس‌ها در دماهای ۲-، ۴-، ۶-، ۹-، ۱۲- و ۱۵- درجه سانتی‌گراد 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 (۲۳±۲) نگهداری شدند. تحمل کالوس‌ها در مقابل یخ زدگی با روش رنگ آمیزی ترازولیوم برآورد گردید. قدرت زنده ماندن کالوس‌ها بر اساس شدت رنگ قرمز ایجاد شده در آنها در یک مقیاس صفر (کالوس‌های بدون رنگ، با سلول‌های کاملاً مرده در اثر یخ زدگی) تا ۱۰ (شاهد، کالوس‌های یخ نزده)، ارزیابی گردید. ارزیابی بیان ژن

مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم کالوس از تیمارهای مختلف در نیتروژن

کاهش تحمل گیاه در مقابل سرما و بر طرف شدن فرایند سازگاری 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 کنترل‌کننده سرما سختی 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 سرما سختی و یا بر طرف شدن آن به راحتی امکان پذیر نیست. در این رابطه محدوده ۱۰-۰ درجه سانتی‌گراد پیشنهاد شده است، که بالاتر از آن سرما سختی 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 متابولیکی گیاهان در درجه حرارت‌های 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 پپتیدها 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 mRNA‌های مربوط به گروه ژنی Dehydrins در دوره سازگاری به سرما در بروموس و چاودار گزارش شده است (۳۰). در این مطالعه امکان وقوع فرایند سرما سختی و تغییر بیان ژن در واکنش به درجه حرارت‌های پایین در سطح سلول گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر درجه حرارت‌های پایین بالاتر از صفر بر میزان تحمل به سرما و بیان ژن‌های القائی در مقابل سرما در کالوس‌های تولید

۰/۰۱ مول  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ، ۰/۰۰۱ مول EDTA، pH: ۷/۴،  
Denhardt's  $\times 5$  (Denhardt's  $\times 100$  عبارتست از: ۲٪ (وزن  
در حجم) از BSA، فیکول، PVP، ۰/۵ درصد SDS، ۵۰٪  
فرماید و ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر DNA اسپرم سالمون<sup>(۷)</sup>،  
بعمل آمد.

کاوشرهای مورد نظر (HmAPIt1.1 و HmGIt4) به  
روش آغازگر تصادفی و با استفاده از کیت مخصوص  
(MBI-Fermentas) با نشانگر  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  نشاندار شدند.  
هیبریداسیون RNA با کاوشگرهای مذکور و در داخل محلول  
هیبریداسیون فوق الذکر در دمای  $42^\circ\text{C}$  انجام شد. پس از آن  
خودپرتونگاری<sup>(۸)</sup> با استفاده از فیلم حساس (فوجی آر ایکس) در  
 $70^\circ\text{C}$  - تا ظهور لکه ها یا نوارهای مشخص، انجام گرفت.  
همچنین با استفاده از دانسیتومتر نشانه‌های حاصل از هیبریداسیون  
مورد ارزیابی کمی قرار گرفت.

### نتایج

کالوس‌های جو ابتدا در هر یک از دماهای  $25^\circ\text{C}$  و  
 $15^\circ\text{C}/20$  (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت)، رشد نموده و پس از آن  
تحت دمای  $2^\circ\text{C}/6$  (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز  
قرار گرفتند تا آثار دما و مدت زمان تاثیر آن بر میزان سرماسختی و  
mRNA ژنهای القاء شونده در مقابل سرما مورد ارزیابی قرار  
گیرند. جزئیات مربوط به عوامل مختلف بر مقاومت به سرما در  
شکل‌های شماره ۲ و ۱ 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  $6^\circ\text{C}$  (۱۴ ساعت) و  
 $2^\circ\text{C}$  (۱۰ ساعت) بیشتر از آنهایی بود که رشد آنها در دماهای  $25^\circ\text{C}$   
و یا  $15^\circ\text{C}/20$  (شب/روز) انجام گرفت. اما افزایش دوره  
رشد تحت دماهای پایین ( $2^\circ\text{C}/6$ ) از ۵ به ۱۰ روز نه تنها  
باعث افزایش تحمل کالوس نگردید، بلکه کاهش زنده مانی  
را در دماهای پایین انجماد ( $9^\circ\text{C}$  -) به همراه داشت  
(جدول ۱).

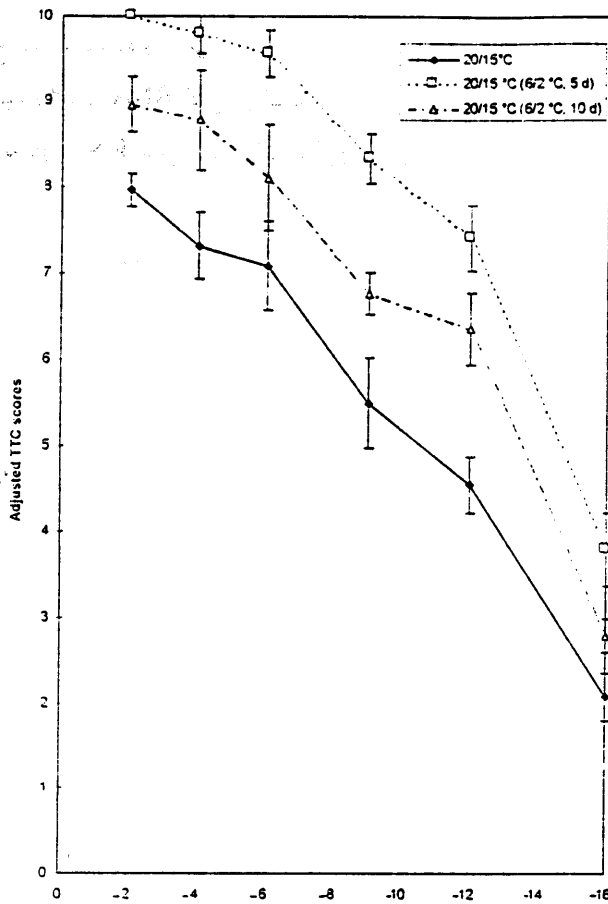
مایع منجمد نموده و با تغییر بافر<sup>(۱)</sup> روش استخراج RNA از اندامهای  
گیاه (۴۲)، RNA کل از کالوسها استخراج گردید. کیفیت  
نمونه‌های RNA با قراردادن یک میکروگرم از RNA کل در ژل  
۱٪ آگارز در داخل بافر TBE (۰/۰۸۹ مول Tris base،  
۰/۰۸۹ مول اسید بریک، ۰/۰۰۲ مول EDTA، pH: ۸، و با  
رنگ آمیزی توسط 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 و به یک غشاء نایلونی با بار مثبت به روش نورذرن بلاتینگ به  
کار گرفته شده توسط دان و همکاران (۶)، منتقل گردید.

کلون‌های HmGIt4 و HmAPIt1.1 (از گروه ژنی  
nsLTPs) بدست آمده از RNA استخراج شده از جو وحشی  
*Hmuringum* تحت دمای پایین، به ترتیب توسط پاول هریسون و  
جین ریگسون، به عنوان کاوشگر در ارزیابی تجمع mRNA در  
این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه میزان کافی از  
HmGIt4 از تراریز باکتریایی<sup>(۲)</sup> طبق روش معرفی شده توسط  
سمبروک و همکاران (۳۲) استفاده گردید. بدین ترتیب  
که cDNA قرار گرفته درون ناقل پلاسمیدی (pGEM5Zf)  
(پرومگا<sup>(۳)</sup>) حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیلین. به کلی باسیل (نژاد  
XL1Blue) منتقل گردید. پس از تکثیر کلونی‌های باکتری  
تراریخته. پلاسمید حامل HmGIt4 از کلی باسیل استخراج و  
cDNA فوق با استفاده از نوکلئاز محدودگر<sup>(۴)</sup> 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 منیائیس و همکاران (۲۱) تعیین گردید.

آماده سازی قبل از هیبریداسیون با انکو باسیون غشاء نایلونی حاوی  
RNA در دمای  $42^\circ\text{C}$  درون محلول هیبریداسیون حاوی  
SSPE  $\times 5$  (SSPE  $\times 1$  عبارتست از: ۰/۱۸ مول NaCl،

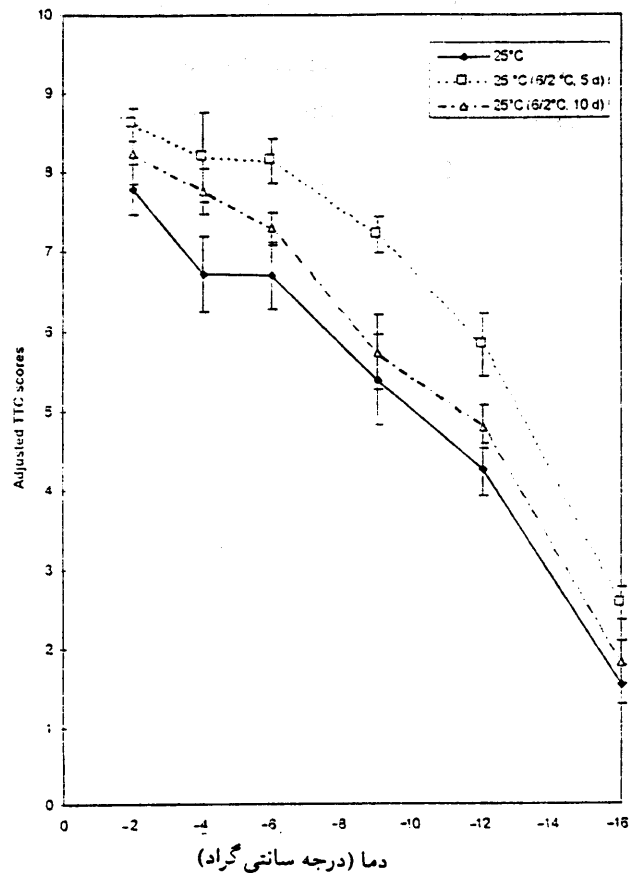
1. Extraction buffer	2. Bacterial transformation	3. Promega	4. Restriction nuclease
5. Bovine serum albumin	6. Polyvinyl pyrrolidone	7. Salmon sperm DNA	8. Autoradiography



شکل ۲- قدرت زنده مانی پس از انجماد در کالوس های جو کشت شده بر روی محیط کشت MS که ابتدا در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  / ۲۰ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) رشد نموده و پس از آن در دمای  $2^{\circ}\text{C}$  / ۶ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز قرار گرفتند. داده ها میانگین  $\pm$  خطای استاندارد مربوط به ۵ تکرار را نشان می دهند. داده های بدست آمده (به روش رنگ آمیزی تترازولیوم) از کالوس پس از انجماد در درجه حرارت های مختلف نسبت به مقادیر شاهد (کالوس نگهداری شده در درجه حرارت اتاق) تصحیح شده اند. داده های مربوط به شاهد از کالوس های قرار گرفته از قبل در دماهای  $15^{\circ}\text{C}$  / ۲۰ و  $2^{\circ}\text{C}$  / ۶ به مدت ۵ و ۱۰ روز، به ترتیب  $0.37 \pm 0.8$  /  $0.24 \pm 0.8$  و  $0.23 \pm 0.9$  /  $0.37 \pm 0.8$  می باشند.

$15^{\circ}\text{C}$  / ۲۰ بیشتر از کالوس های منتقل شده از دمای  $25^{\circ}\text{C}$  بود (جدول ۱).

سرماسختی کالوس تحت تیمارهای مختلف با در نظر گرفتن میزان  $LT_{50}$  (دمایی که باعث ۵۰ درصد مرگ و میر می گردد) نیز در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. داده های مربوطه نشان



شکل ۱- قدرت زنده مانی پس از انجماد در کالوس های جو کشت شده بر روی محیط کشت MS که ابتدا در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  رشد نموده و پس از آن در دمای  $2^{\circ}\text{C}$  / ۶ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ و ۱۰ روز قرار گرفتند. داده ها میانگین  $\pm$  خطای استاندارد مربوط به ۵ تکرار را نشان می دهند. داده های بدست آمده (به روش رنگ آمیزی تترازولیوم) از کالوس پس از انجماد در درجه حرارت های مختلف، نسبت به مقادیر شاهد (کالوس نگهداری شده در درجه حرارت اتاق) تصحیح شده اند. داده های مربوط به شاهد از کالوس های قرار گرفته از قبل در دماهای  $25^{\circ}\text{C}$  و  $2^{\circ}\text{C}$  / ۶ به مدت ۵ و ۱۰ روز، به ترتیب  $0.32 \pm 0.9$  /  $0.23 \pm 0.8$  و  $0.37 \pm 0.8$  /  $0.37 \pm 0.8$  می باشند.

دمای رشد کالوس قبل از انتقال به درجه حرارت های پایین نیز بر روی میزان افزایش تحمل به سرما مؤثر بود. اگرچه کالوس های کشت شده در دماهای  $25^{\circ}\text{C}$  و  $15^{\circ}\text{C}$  / ۲۰ ابتدا از نظر مقاومت به یخ زدگی اختلاف معنی داری نشان ندادند، اما پس از قرار گرفتن در درجه حرارت  $2^{\circ}\text{C}$  / ۶ سرماسختی کشت های انتقال یافته از محیط

## 1. Lethal temperature

1 2 3 4 5 6



شکل ۳- میزان تجمع mRNA در کالوس جو (*Hordeum vulgare*) کشت شده در ۲۵°C و ۱۵°C / ۲۰ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) بر روی محیط کشت MS و انتقال یافته به مدت ۵ و ۱۰ روز به دمای ۶/۲°C (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت). کلون HmGht4 به عنوان کاوشگر در ارزیابی نورژن مورد استفاده قرار گرفت.  
 ۱- ۱۵°C / ۲۰ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) (شاهد) ۲- ۲۵°C (شاهد) ۳- ۱۵°C / ۲۰ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز  
 ۴- ۲۵°C به ۶/۲°C به مدت ۵ روز ۵- ۱۵°C / ۲۰ (۱۴ ساعت/۱۰ ساعت) 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 ترازولیوم 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			6/2 °C, 5 days		6/2 °C, 10 days		6/2 °C, 5 days	
	vs			vs		vs		vs	
	20/15 °C			6/2 °C, 0 days		6/2 °C, 0 days		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 تفاوت های معنی دار در سطح ۰/۱، ۰/۰۵ درصد و عدم وجود تفاوت معنی دار را نشان می دهند.

کالوس های انتقال یافته از ۱۵°C / ۲۰ 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

می دهند 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

جدول ۲ - تحمل در مقابل بیخ زدگی (بر حسب LT50) 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					
۲۰/۱۵°C (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت)			۲۵°C		
۶/۲°C ← ۲۰/۱۵°C	۶/۲°C ← ۲۰/۱۵°C	۲۰/۱۵°C	۶/۲°C ← ۲۵°C	۶/۲°C ← ۲۵°C	۲۵°C
۱۰ روز	۵ روز		۱۰ روز	۵ روز	
-۱۴/۷°C	-۱۵/۷°C	-۱۲/۹°C	-۱۳/۲°C	-۱۴/۲°C	-۱۲/۷°C

جدول ۳ - داده های دانسیتمتری 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 متعاقباً در درجه حرارت ۶/۲°C برای مدت ۵ روز (\* تنظیم شده اند).

دانسیته نسبی		تیمار
HmGh4	HmAP1t 1.1	
۰/۲۴	۰/۲۶	شاهد (۲۰/۱۵°C)
۰/۱۳	۰/۰۵	شاهد (۲۵°C)
۱/۰۰	۱/۰۰	۲۰/۱۵°C ← ۶/۲°C به مدت ۵ روز*
۰/۰۷	۰/۰۷	۲۵°C ← ۶/۲°C به مدت ۵ روز
۰/۶۱	۰/۵۴	۲۰/۱۵°C ← ۶/۲°C به مدت ۱۰ روز
tr	۰/۰۳	۲۵°C ← ۶/۲°C به مدت ۱۰ روز

tr : دانسیته نسبی کمتر از ۰/۱ %

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 بررسی قرار گرفت. درجه حرارت رشد قبل از دوره سازگاری اگرچه مستقیماً بر مقاومت کالوس در برابر بیخ 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

اختلافاتی در میزان بیان آنها نشان داد. نتایج مربوط به هیبریداسیون با کائوشگر HmGlt4 در شکل شماره ۳، و داده های حاصل از دانسیتمتری نتایج نوردرزن با هر دو ژن در جدول شماره ۳ نشان داده شده اند. میزان mRNA های هیبرید شده با کائوشگرهای HmAP1.1 و HmGlt4 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 نشان ندادند. همچنین میزان mRNA های مربوط به ژن های مورد مطالعه، در

طولاني شدن دوره سرماسختي اشاره دارد. بنا بر اين داده هاي مربوط به اثر طول دوره سازگاري بر تحمل در برابر يخ زدگي در كالوس، با گزارشات موجود در مورد گياه كامل مطابقت ندارد، كه ممكن است به دليل تأثير عوامل مختلفی باشد كه مي توانند كالوس را كه كاملا به تغذيه مصنوعي وابسته است، تحت تأثير قرار دهند. روش ارزيابي نورژن بلائينگ به منظور مطالعه mRNA هاي شبيه به ژن هاي HmAPI1.1 و HmGlt4 (از گروه ژني nsLTPs) بكار گرفته شد. نظر به اينكه غشاء سيتوپلاسمي تحت تأثير كم آبي ناشي از يخ زدگي سلول قرار مي گيرد، تغيير در رفتار اين غشاء به ويژه در طول فرايند سازگاري مي تواند به افزايش تحمل در مقابل سرما كمك نمايد (۳۷). دليل اين امر ممكن است تغييرات انجام گرفته در تركيب ليبيدهاي موجود در غشاء سيتوپلاسمي (۳۶) شامل افزايش در نسبت فسفوليبيدها باشد (۳۸)، و مي تواند با سياليت<sup>۱</sup> غشاء هاي سيتوپلاسمي در اثر افزايش در نسبت اسيدهاي چرب اشباع نشده به اسيدهاي چرب اشباع شده باشد (۳۱)، كه با كاهش تدريجي دماي محيط و اغلب از اواسط اكتوبر تا اواسط دسامبر در طبيعت اتفاق مي افتد (۴۹). تغييرات در تركيب ليبيدهاي غشاء سيتوپلاسمي در دوره سازگاري مستلزم انتقال بعضي از ليبيدها از محل تشكيل آنها به غشاء سيتوپلاسمي مي باشد (۳)، واز جمله انتقال فسفاتيديل كولين<sup>۲</sup> به غشاء سيتوپلاسمي است كه تشكيل آن در آندوپلاسميك رتيكولوم<sup>۳</sup> گزارش شده است (۴۸). پروتئين هاي انتقال دهنده ليبيدها (LTPs) جابجايي ليبيدها را بين سيستم هاي غشايي مختلف تسهيل مي نمايند (۳) و انتقال انواع مختلف ليبيدها بوسيله پروتئين هاي موسوم به nsLTPs توسط يامادا (۴۸) گزارش شده است. نتايج بدست آمده در اين پژوهش در موافقت با بيان ژن هاي گروه LTPs در واكنش به تنش هاي محيطي است كه توسط هيوز و پيرس (۱۶)؛ دان و همكاران (۷)؛ موليئا و گارشاالمندو (۲۳) و وايت و همكاران (۴۵) در گونه هاي مختلف گياهي گزارش شده است. نقش اين ژن ها در افزايش تحمل گياه در برابر تنش هاي محيطي نظير سرما، خشكي و حتي حفاظت در مقابل عوامل بيماريزا (۴)، مي تواند به دليل شركت آنها در تشكيل كوتيكول باشد (۳۴، ۳۹، ۵ و ۴۰)، كه گياه را از تنش هاي محيطي محافظت مي نمايد. به طور كلي ميزان mRNA هاي هپريد شده به موازات

۱۵°C / ۲۰ (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) در مقايسه با كشت هاي انجام گرفته در ۲۵°C پس از قرار گرفتن به مدت ۵ و ۱۰ روز در دماي ۲°C / ۶ (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) مقاومت بيشتري را در برابر انجماد نشان دادند (جدول ۱). آثار متفاوت دماهاي رشد فوق الذكر قبل از دوره سازگاري ممكن است مربوط به دماي ۱۵°C (در محيط ۱۵°C / ۲۰) باشد، كه سرماسختي مي تواند در اين دما در كالوس شروع شود و يا به دليل رشد كندتر كالوس در دماي فوق باشد. همچنين با توجه به اينكه اين دما حدود ۱۰ درجه پايين تر از درجه حرارت معمولي (۲۵°C) براي رشد كالوس مي باشد، قرار گرفتن كالوس ها تحت دماي مذكور ممكن است منجر به مصرف پايين تر و در نتيجه كاهش كمتر مواد مغذي نظير قندها گردد كه مي توانند به ايجاد و افزايش سازگاري به سرما در كالوس مؤثر باشند. علاوه بر اين، كاهش سريع درجه حرارت رشد روند ايجاد سرماسختي را بسيار كند نموده و در چنين مواقعي درجه حرارت هاي زير صفر در بافت هاي با سرماسختي كمتر صدمه شديد تري وارد مي نمايند. بنا بر اين كالوس هاي كشت شده در ۲۵°C پس از ورود به دوره سرماسختي با از دست دادن ۱۹ تا ۲۳ درجه به دماي ۶°C (۱۴ ساعت) و ۲°C (۱۰ ساعت) مي رسند و آسيب وارده به سلولها در اين حالت بيشتري از زماني است كه دماي محيط ۱۴ يا ۱۳ درجه تغيير مي نمايد تا كالوس ها از دماي ۱۵°C / ۲۰ به ۲°C / ۶ برسند.

انتقال كالوس ها به دماي پايين تر از شرايط عادي رشد، افزايش مقاومت سلول ها را در برابر يخ زدگي به دنبال داشت، كه در موافقت با گزارشات موجود در مورد تأثير مثبت دوره سازگاري بر ميزان سرماسختي در گياه كامل جو (۹، ۲۸، ۲۹) مي باشد. اما با افزايش دوره سازگاري تحمل سلول ها در برابر سرما كاهش يافت و در نتيجه كالوس هاي قرار گرفته تحت دماي ۲°C / ۶ (۱۴ ساعت / ۱۰ ساعت) به مدت ۵ روز، سرماسختي بيشتري را از كشت هاي نگهداري شده به مدت ۱۰ روز در اين دما نشان دادند (شكل هاي ۱ و ۲، جدول ۱). نتايج اين بخش از مطالعه در مغايرت با پيشنهادهات مربوط به تأثير سستيم طول دوره سرماسختي بر تحمل به سرما براي مثال در يونجه (۴۷) مي باشد. اگرچه امكان عدم افزايش تحمل به سرما با طولاني تر شدن دوره سازگاري تحت دماي پايين وجود دارد (۴۶)، اما كمتر گزارشي به كاهش تحمل گياه در نتيجه

عنوان عاملی مهم در تأمین نیازهای سلول باشد. تغییر در غلظت اجزای محیط کشت می تواند بر سرماسختی و بیان ژنهای عامل مقاومت به سرما تأثیر بگذارد. دمای بالاتر رشد یعنی  $25^{\circ}\text{C}$  که 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 گردد. زمان نیز می تواند دارای اثر باشد. افزایش مدت زمان نگهداری حتی در درجه حرارت پایین ( $6/2^{\circ}\text{C}$ ) که تحت آن رشد کالوس هرچند به میزان کم ادامه دارد می تواند بر غلظت ترکیبات مختلف محیط 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.

الگوی سازگاری و تحمل کالوس به سرما تغییر می نماید، و همبستگی مثبتی بین میزان بیان ژن در واکنش به سرما و سطح تحمل سلول ها در مقابل یخ زدگی وجود دارد. انتقال کالوس های جو از محیط اولیه رشد به دمای پایین  $6/2^{\circ}\text{C}$  به تغییر افزایشنده mRNA های مربوط به ژن های فوق انجامید، اما با طولانی تر شدن زمان نگهداری کالوس تجمع mRNA کاهش می یابد. همچنین دمای بالا ( $25^{\circ}\text{C}$ ) در دوره مقدماتی رشد قبل از انتقال به درجه حرارت پایین ( $6/2^{\circ}\text{C}$ ) در مقایسه با  $20/15^{\circ}\text{C}$  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 سرما و بیان ژن دلالت دارد. دلیل بروز تأثیرات مذکور می تواند ترکیبات محیط کشت به

## REFERENCES

## مراجع مورد استفاده

۱. طبائی عقدائی، س. ر. و آ. 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 characterization 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. Nucleotide sequence and molecular analysis 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  $1\alpha$  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. Plant 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-temperature-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 temperature 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. Fritsch, 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. Schellekens, 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. Wolfrain, 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. Chemical and biophysical changes in plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz. cv. Goroji). *Plant Physiol.*, 76: 257-265