بررسی بیان دو ژن *DREB* و *AP2* در گیاه فندق (*Corylus avellana*) تحت تنش شوری

فرشته پورقهرمان*[۱]، محمدرضا فتاحی مقدم[۲]، ذبیح اله زمانی[۳]
*[۱]کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
[۲]استاد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
[۳]استاد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
*نویسنده مسئول:porghahreman.f@ut.ac.ir

چکیده

شوری یکی از فاکتورهای اصلی محیطی محدود کننده تولید در گیاهان زراعی و باغی است. در تحقیق حاضر، میزان رونوشت ژنهای DREB و AP2 در زمان های مختلف بعد از اعمال تیمار شوری در دو رقم از گیاه فندق (سقورب و فرتیل) توسط روش PCR در زمان واقعی بررسی گردید. سطح رونوشت ژن DREB در رقم فرتیل در ۱۲ ساعت بعد از اعمال تیمار به میزان قابل توجهی افزایش یافت که در مقایسه با گیاهان شاهد معنی دار بود. در حالیکه بیان این ژن در رقم سقورب در ۷۲ ساعت بعد از عمال تیمار نسبت به شاهد افزایش داشت.بیان ژن AP2 در رقم سقورب بعد از اعمال تیمار شوری کاهش بیان نشان داد ولی میزان رونوشت این ژن در رقم فرتیل بعد از تیمار شوری بصورت پیوسته افزایش یافته و در ۷۲ ساعت به بیشترین میزان خود رسید.

کلمات کلیدی: فندق، سطح رونوشت، بیان ژن، PCR در زمان واقعی.

مقدمه

شوری یکی از فاکتورهای اصلی محیطی محدود کننده تولید در گیاهان زراعی و باغی است زیرا اکثر گیاهان زراعی به شوری ناشی از وجود نمک در خاک حساس هستند. در اغلب موارد تاثیر منفی شوری به افزایش یون های سدیم و کلر و تاثیری که این یون ها بر بقا و توقف مکانیسم های مختلف گیاه می گذارند نسبت داده می شود. اگرچه هر دو عنصر سدیم و کلر موجب اختلالات فیزیولوژیکی در گیاه می شوند، ولیکن کلر بسیار خطرناک تر است. مطالعات مولکولی و بیوشیمایی بر روی عکس العمل گیاهان در برابر تنش شوری نشان داده است که آن ها در برابر این تنش ها رادیکال های هیدروکسید، سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن از خود نشان می دهند. در هر صورت تاثیر تنش شوری روی گیاهان بستگی به غلظت، زمان مواجه شدن با تنش، ژنوتیپ گیاهی و عوامل محیطی دارد (Tanou *et al*, 2009).

خانواده ژنی AP2/ERF بزرگترین گروه از عامل های رونویسی اختصاصی گیاهی است که دارای چهار زیر خانواده به نام هایAP2 ، RAV، ERFو DREB می باشد. از بین این خانواده تعدادزیادی از اعضای زیر خانواده DREB ، از گیاهان مختلف جداسازی و شناسایی شده اند و مشخص شده است که این گروه از عامل های رونویسی با تنظیم بیان ژن ها از طریق اتصال به عناصر عملگر سیس موجود در راه انداز ژن های مرتبط با تحمل گیاهان به تنش های غیرزنده نقش دارند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). زیر خانواده AP2 دارای دو دومین تکراری متصل شونده به DNA از نوع AP2/ERF می باشد در حالی در زیر خانواده ERF فقط یک دومین از این نوع مشاهده می شود. دومین AP2در ابتدا به عنوان یک موتیف حفاظت شده در آرابیدوپسیس شناسایی گردید که در مرحله نمو در زمان گلدهی موثر بود (Wu *et al*, 2015). براساس نتایج تحقیق chen و همکاران (۲۰۱۳) روی گیاه برنج (*Oryza sativaL*) تحت تنش شوری (۱۵۰ میلی مولار سدیم کلرید)، بیشترین میزان بیان ژن DREB2 در ۲۴ ساعت بعد تنش به ده برابر تیمار شاهد (زمان صفر) رسید، و در یک ساعت و شش ساعت بعد تنش به ترتیب ۶ و ۷ برابر شاهد بود.

IrHC2019

میوه فندق غنی از چربی ها، پروتئین ها و ویتامین ها است و نقش مهمی در بازار کشاورزی ایفا می کند و طعم دهنده های لبنی، نانوایی، شیرینی، آب نبات و شکلات است (Manfredi *et al*, 2018). ایران یکی از کشورهای مهم تولید کننده فندق در جهان محسوب می شود. قسمت های شمالی ایران به خاطر شرایط آب و هوایی مناسب برای تولید این گیاه از پتانسیل بالایی برخوردار است (ثابتی، ۱۳۸۵). تولید این گیاه در ایران تنها در قسمت هایی که شرایط رشدی مناسب می باشد، محدود شده است. بنابراین، برای به حداقل رساندن اثرات مضر تنش های شوری و خشکسالی، توسعه محصولات مقاوم در برابر استرس از طریق اصلاح و انتخاب ارقامی که قادر به تولید محصولات اقتصادی تحت این شرایط می باشند ضرروری است. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر تنش شوری بر الگوی بیان برخی ژن های خانواده عوامل رونویسی موثر در تنش شوری دو رقم فندق (فرتیل و سقورب) مورد مطالعه قرار گرفت و انتخاب رقم متحمل به شوری انجام شد.

مواد و روش ها

این تحقیق در گلخانه و محوطه گلخانه های گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشگاه تهران در تابستان ۱۳۹۶ برای آزمایشات مولکولی انجام شد. برای بررسی بیان دو ژن ، DREB و AP2 از خانواده فاکتورهای رونویسی، دو رقم از فندق های مورد بررسی (سقورب و فرتیل)، با توجه به نتایج فیزیولوژی انتخاب شدند و تنش شوری با سطح ۶۰ میلی مولار کلرید سدیم اعمال گردید. نمونه برداری برای بررسی بیان دو تا از ژن های فاکتور رونویسی قبل از اعمال تنش (شاهد)، ۱۲ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تنش شوری صورت گرفت.

برای استخراج RNA کل از از روش لیتیم‌کلراید (Liao *et al*, 2004) استفاده شد. برای تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از روش اسپکتوفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل (Thermo Scientific, Nanodrop, 2000C, USA) و نیز روش الکتروفروز RNA با ژل اگاروز یک درصد در بافر TAE1X استفاده شد. واکنش ساخت cDNA با استفاده از کیت تاکارا و طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد.

به منظور بررسی تغییر در میزان رونوشت ژنهای DREB و AP2 توسط روش PCR در زمان واقعی (qRT-PCR، آغازگرهای مناسبی «جدول۱» برای ژنهای مورد نظر با استفاده از از برنامه Primer Quest موجود در سایت IDT (Integrated DNA Technologies) طراحی و جهت سنتز به شرکت پیشگام ارسال گردید. سعی شد در طراحی آغازگرها طول آغازگر (۱۰۰ الی ۱۳۰ bp، درصد GC ۴۰ تا ۶۰ درصد)، مکمل بودن آغازگرها با هم و احتمال تشکیل حلقه مورد توجه قرار گیرد. غلظت پایه آغازگرها پس از سنتز، ۱۰۰ میکرومولار بود که توسط آب استریل به غلظت ۱۰ میکرومولار رسید. از ژن S۱۸ نیز به عنوان ژن مرجع استفاده شد.

جدول « ۱» توالی پرایمر های مورد استفاده برای real-time -PCR در رقم های فندق

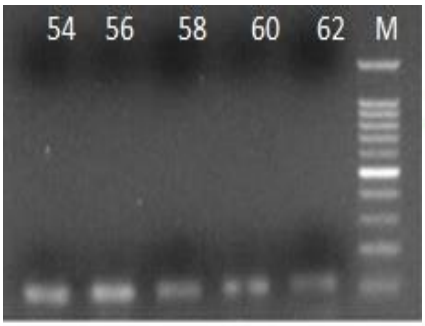
ژن	آغازگر	توالی ('5-'3)	دمای اتصال (°C) در سایت IDT	طول قطعه تکثیر شده (bp)
18S	F	GGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAAC	۵۸	۱۰۸
	R	CTCAATCTGTCAATCCTCACTATGTCTG	۵۸	
DREB	F	AGCGTGAAGGGTAGTTGTGAAG	۶۰	۱۶۷
	R	CTTTCCATGTCATCCTGATCG	۶۰	
AP2	F	AGCCCAATGAGAAGACAAGG	۵۹	۱۲۱
	R	TCGGCGAAGTTGAGACAAG	۵۹	

IrHC2019

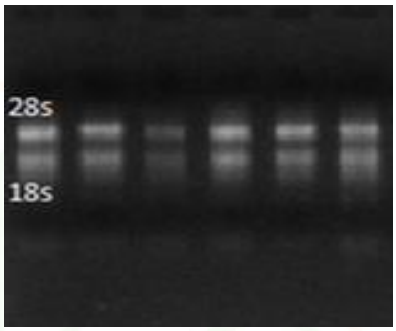
واکنش Real Time PCR با استفاده از کیت x HOT FIRepol, SYBR Green qPCRMix Plus۵ و طبق پروتکل دمایی Soleymani و همکاران (۲۰۱۷) انجام گرفت. و درنهایت، میزان بیان ژن های مورد نظر با استفاده از روش ΔΔCT (Pfaffl, 2001) بررسی شد.

نتایج

برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز یک درصد استفاده شد. وضوح دو باند مربوط به ۲۸S rRNA و ۱۸S rRNA روی ژل الکتروفورز یک درصد نشان‌دهنده کیفیت خوب RNA استخراج‌شده بود «شکل۱آ». هم چنین برای اطمینان از کارکرد اختصاصی آغازگرهای طراحی‌شده و تعیین دمای مناسب اتصال این آغازگرها به رشته الگو، از PCR با شیب دمایی استفاده شد و مناسب‌ترین دما برای حداکثر کارایی آغازگرهای طراحی‌شده تعیین شد «شکل ۱ ب».



ب)

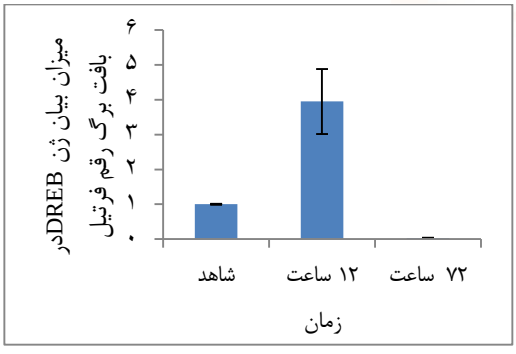


آ)

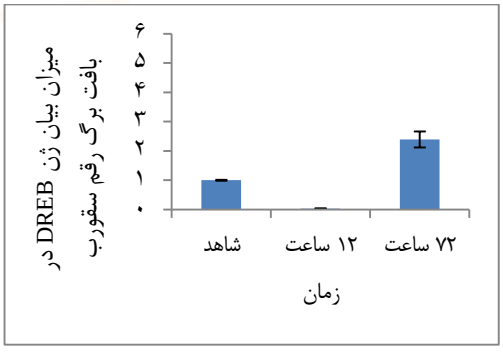
شکل « ۱ » آ) نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز یک درصد، ب) نتایج حاصل از واکنش PCR با پرایمرهای طراحی‌شده برای پیدا کردن دمای مناسب اتصال.

نتایج میزان بیان ژن DREB در رقم سقورب و فرتیل در شوری ۶۰ میلی مولار کلرید سدیم

همانطور که در« شکل۲ آ» مشاهده می شود در رقم سقورب در ۱۲ ساعت بعد تنش شوری میزان بیان به ۰/۰۲ مقدار بیان این ژن در تیمار شاهد (قبل اعمال تنش) رسید. و در ۷۲ ساعت بعد تنش افزایش بیان تقریبا به ۲/۵ رسید. که نشان از تاثیر شوری بر افزایش بیان این ژن دارد. در مجموع میزان افزایش بیان ژن چشمگیر نبود. در رقم فرتیل در ۱۲ ساعت بعد تنش شوری میزان بیان به ۴ برابر مقدار بیان این ژن در تیمار شاهد رسید. و در ۷۲ ساعت بعد تنش مقدار بیان تقریبا به صفر کاهش یافت. افزایش بیان در ۱۲ ساعت بعد تنش واکنش سریع رقم فرتیل را نشان می دهد «شکل ۲ب». که با نتایج پژوهش chen و همکاران (۲۰۱۳) روی گیاه برنج مطابقت داشت.



ب)



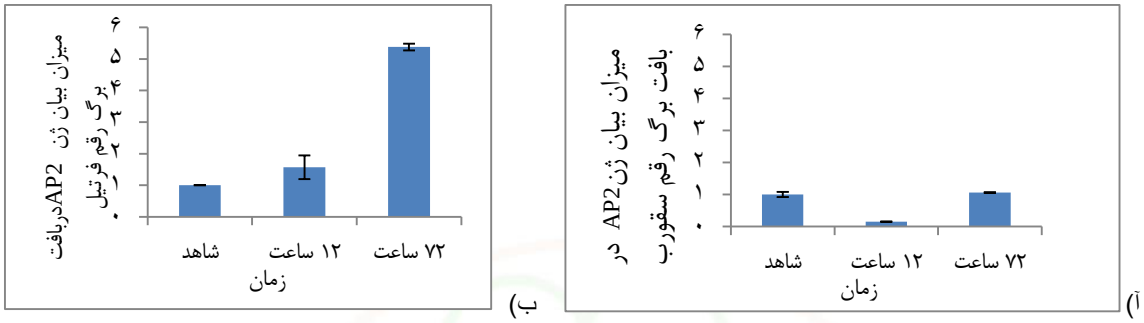
آ)

شکل« ۳ » میزان بیان نسبی ژن DREB در بافت برگ نسبت به نمونه شاهد. آ) رقم سقورب، ب) رقم فرتیل

IrHC2019

نتایج میزان بیان ژن AP2 در رقم سقورب در شوری ۶۰ میلی مولار کلرید سدیم

در رقم سقورب در ۱۲ ساعت بعد تنش شوری میزان بیان به ۰/۲ مقدار بیان این ژن در تیمار شاهد رسید. و در ۷۲ ساعت بعد تنش مقدار بیان تقریبا مساوی مقدار بیان این ژن در تیمار شاهد رسید «شکل ۳ آ». در رقم فرتیل در ۱۲ ساعت بعد تنش شوری میزان بیان به ۲ برابر مقدار بیان این ژن در تیمار شاهد رسید. و در ۷۲ ساعت بعد تنش مقدار بیان تقریبا به ۶ برابر مقدار بیان این ژن در تیمار شاهد رسید «شکل ۳ ب».



شکل « ۳ » میزان بیان نسبی ژن AP2 در بافت برگ نسبت به نمونه شاهد. آ) رقم سقورب، ب) رقم فرتیل

در مجموع، این مطالعه نشان داد که رقم سقورب حساسیت بیشتری به تنش شوری دارد. در رقم مذکور میزان بیان دو ژن مورد مطالعه نسبت به رقم فرتیل کمتر بود. رقم فرتیل در مقایسه با رقم سقورب، در موقعیت بهتری قرار دارد و آسیب کمتری دیده است که از آن می توان در برنامه های به نژادی بهره جست.

منابع

ثابتی، حبیب اله. ۱۳۸۵. "جنگل ها، درختان و درختچه های ایران". ۲۶۱-۲۶۰

Chen, Z., Pan, Y. H., An, L. Y., Yang, W. J., Xu, L. G. and Zhu, C. 2013. Heterologous expression of a halophilic archaeon manganese superoxide dismutase enhances salt tolerance in transgenic rice. Russian journal of plant physiology, 60(3), 359-366.

Soleymani, F., Taheri, H., and Shafeinia, A. R. 2017. Relative expression of genes of menthol biosynthesis pathway in peppermint (Mentha piperita L.) after chitosan, gibberellic acid and methyl jasmonate treatments. Russian journal of plant physiology, 64(1), 59-66.

Liao, Z., Chen, M., Guo, L., Gong, Y., Tang, F., Sun, X. and Tang, K. 2004. Rapid isolation of high-quality total RNA from Taxus and Ginkgo. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 34(3), 209-214.

Manfredi, M., Robotti, E., Quasso, F., Mazzucco, E., Calabrese, G., and Marengo, E. 2018. Fast classification of hazelnut cultivars through portable infrared spectroscopy and chemometrics. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 189, 427-435.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic acids research, 29(9), e45-e45.

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of experimental botany, 58(2), 221-227.

Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G. and Job, D. 2009. Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. The Plant Journal, 60(5), 795-804.

Wu, Z. J., Li, X. H., Liu, Z. W., Li, H., Wang, Y. X. and Zhuang, J. 2015. Transcriptome-based discovery of AP2/ERF transcription factors related to temperature stress in tea plant (Camellia sinensis). Functional and integrative genomics, 15(6), 741-752.

IrHC2019

Investigation of expression of DREB and AP2 genes in Hazelnut (Corylus avellana) under salinity stress

Fereshteh Pourghahraman * [1], Mohammad Reza Fattahi Moghadam [2], Zabih Allah Zamani [3]
* [1] MSc, University College of Agricultural & Natural Resources, University of Tehran, Karaj
[2] Professor of Horticultural Sciences, University College of Agricultural & Natural Resources, University of Tehran, Karaj
[3] Professor of Horticultural Sciences, University College of Agricultural & Natural Resources, University of Tehran, Karaj
*Corresponding Author: porghahreman.f@ut.ac.ir

Abstract

Salinity is one of the main environmental factors limiting production of crops and gardens. In this study, the transcript level of DREB and AP2 genes at different times after salinity treatment was investigated in two cultivars of hazelnut (Seghorb and Fertile) by real time PCR assay. The expression of DREB gene in Fertile cultivar significantly increased in 12 hours after treatment, which was significant compared to control plants While the expression of this gene in Seghorb cultivar significantly increased at 72 hours after the treatment. The AP2 gene expression in Seghorb cultivar had a reduction after treatments, but the transcription level of this gene in Fertile cultivar increased continuously after salinity treatment and in 72 hours it reached its peak.

***Keywords*:** hazelnut, transcriptional surface, gene expression, real time PCR.

IrHC2019