بررسی میزان بیان ژن‌های PABP و PFK در گل‌های گرده‌افشانی نشده نخل خرمای رقم برحی حاصل از تکثیر با کشت بافت و پاجوش به روش qRT –PCR

سیده‌زهرا حسینی موسوی[۱*]، موسی موسوی[۱]، خلیل عالمی سعید[۲]

[۱] به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه باغبانی دانشگاه شهید چمران اهواز

[۲] دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

*نویسنده مسئول: zahramosavi670@yahoo.com

چکیده

روش متداول تکثیر نخل خرما استفاده از پاجوش می‌باشد به دلیل مشکلات و محدودیت‌هایی که این روش دارد در سال‌های اخیر تکثیر این گیاه از طریق کشت بافت رواج پیدا کرد. به‌طورکلی علاوه بر مزایای زیادی که روش کشت بافت دارد اما تکثیر گیاهان و ازجمله نخل خرما از این طریق در برخی موارد با یکسری مشکلات ریختی یا تنوع سوماکلونال مواجه می‌شوند. در این تحقیق بیان ژن‌های پلی آدنیلات بایندینگ (PABP) و فسفوفروکتوکیناز (PFK) گل‌های گرده‌افشانی نشده نخل خرمای رقم برحی تکثیر شده به روش پاجوش و روش کشت بافت در سه دوره رشدی اسپات با استفاده از تکنیک PCR کمی، بین نمونه‌های مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل بیانگر وجود تفاوت‌هایی جزئی در میزان بیان این ژن‌ها بین درختان کشت بافتی و پاجوشی این رقم در زمان‌های مختلف رشد گل بود.

کلمات کلیدی: **خرما، بیان ژن، تنوع سوماکلونال، کشت بافت، qRT -PCR**

مقدمه

در حال حاضر کشت بافت به‌صورت تجاری و گسترده برای تکثیر گیاهان مختلف استفاده می‌شود اما گاهی در گیاهانی که به‌وسیله‌ی کشت بافت تولید می‌شوند ممکن است تغییراتی نامطلوب (تنوع سوماکلونال) اتفاق بیفتد. این تغییرات در خرماهای کشت بافتی به‌صورت انواع فنوتیپ‌ها شامل برگ‌هایی با برگچه‌های پهن، سرعت رشد و نمو کم ، ناتوانی در تولید گل‌آذین و گل‌های چند برچه‌ای، اختلال در گرده‌افشانی و تلقیح، میوه‌های کوچک، پاکوتاهی و برخی عوارض دیگر ممکن است دیده شود که باعث اختلال در رشد و باردهی این گیاه می‌شود (McCubbin *et al.*,2000). این تغییرات و عدم ثبات نهال‌های کشت بافتی موجب ضرر و زیان به کشاورزانی خواهد شد که با اعتماد کامل این گیاهچه‌های تکثیر شده از طریق کشت بافت را خریداری نموده و استفاده می‌نمایند، تشخیص علت این تغییرات می‌تواند راهکار مناسب برای رفع این‌گونه معایب باشد و در صورت اثبات موقتی بودن می‌تواند سبب جلب اعتماد نخل کاران شده و باعث گردد که با اطمینان بیشتری از نخل‌های حاصل از کشت بافت بهره‌برداری نمایند.

هدف از انجام این تحقیق مقایسه نخل خرمای رقم برحی حاصل از کشت بافت با پایه مادری از طریق برخی ژن‌های بیان شده در گل‌های آن، و همچنین بررسی مکانیسم احتمالی مولکولی بیان این ژن‌ها در گرده‌افشانی و تلقیح خرماست. یک ژن ناحیه خاصی از DNA است، که حاوی اطلاعات لازم برای ساخت یک پروتئین ویژه است. بیان ژن فرآیندی است که طی آن اطلاعات موجود در DNA به پروتئین تبدیل می‌شوند. دو ژن بررسی شده در این تحقیق پلی آدنیلات بایندینگ و فسفو فروکتوکیناز می‌باشند که هر یک به‌نوعی در فرآیند بیان ژن و گلدهی گیاه نقش مهمی ایفا می‌کنند. در ژن پلی آدنیلات بایندینگ نقش آن به‌گونه‌ای است که دم پلی آدنیلات RNA پیامبر را از اثر تجزیه و هضم توسط آنزیم ریبونوکلئاز حفاظت می‌نماید (Safari *et al.*,2003). این پروتئین به دم پلی آدنیلی mRNA متصل شده و هم در حفاظت و هم در اتصال mRNA به ریبوزوم و تنظیم میزان ترجمه نقش دارد (Kahvejian *et al.*, 2005) اغلب بافت‌ها حداقل به مقدار کمی گلوکز نیازمندند. گلوکز توسط آنزیم هگزوکیناز و با مصرف ATP و تبدیل آن به ADP به گلوکز ۶ فسفات تبدیل می‌شود. گلوکز ۶ فسفات

توسط آنزیم فسفوگلکوایزومراز به فرکتوز ۶ فسفات تبدیل می‌شود. فرکتوز ۶ فسفات توسط آنزیم فسفوفرکتوکیناز (PFK)و با مصرف ATP و تبدیل آن به ADP به فرکتوز ۱و ۶ دی فسفات تبدیل می‌گردد (Safari *et al* ., 2009). قندها نقش خیلی مهمی را به خاطر دارا بودن منبع انرژی در تشکیل و توسعه تولیدمثل جنسی در گیاه ایفا می‌کنند. در گیاهان، در چندین مرحله کلیدی در تشکیل ارگان‌های جنسی از زمان شروع گلدهی تا بوجود آمدن میوه به‌عنوان تنظیم‌کننده در روابط متقابل مراکز مصرف و تولید در کل گیاه در شرایط استاندارد یا در شرایط تنش و همچنین رشد و توسعه و درنهایت تظاهر صفات ژن عمل می‌کنند. بدون در نظر گرفتن انرژی حاصل، قندها نقش بسزایی را به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ها در بروز صفات ژنتیکی بازی می‌کنند. در گیاهان قندها در تنظیم ژن‌های مختلفی نقش دارند که شامل ژن‌های مرتبط با فرآیند گلدهی و تنظیم مراکز مصرف و تولید مرتبط با تنش نیز می‌شود. فروکتوز ازجمله قندهایی است که در گلدهی گیاهان نقش مهمی ایفا می‌کند و ازجمله قندهای اصلی است که گل‌آذین‌های در حال رشد را تغذیه می‌کند (Lebon *et al*., 2010).

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی از خرمای رقم برحی از مرکز تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور واقع در شهرستان اهواز تهیه شدند. نخل‌هایی که از آن‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت همگی در سن حداقل ۲ سال باردهی بودند. از هر رقم خرما ۳ نخل به‌عنوان تکرار در نظر گرفته شد. از هر نخل ۳ عدد اسپات تهیه شد که هر یک از اسپات‌ها در یک دوره‌ی رشدی مختلف بوده و از لحاظ ظاهری نیز در اندازه‌های کوچک، متوسط، و بزرگ بودند. پس از جداسازی گل از اسپات‌ها بلافاصله آن‌ها را در فویل آلومینیومی پیچیده و پس از قرار دادن در ازت مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

استخراج RNA به‌وسیله‌ی کیت Ribospin^{TM}PLANT ساخت شرکت Gene All کره‌ی جنوبی طبق پروتوکل مربوطه انجام شد. برای بررسی کمیت و کیفیت RNA از نانو دراپ و الکتروفورز افقی با ژل آگارز استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت RB MMLV Reverse Transcriptase ساخت شرکت زیست فناوران رنا طبق پروتکل مربوطه انجام شد. غلظت cDNA ساخته شده توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. برای اثبات حضور ژن‌های موردنظر در cDNA حاصل واکنش زنجیر ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهایی که از ژن‌های موردنظر طراحی شدند انجام شد. توالی پرایمرهای موردنظر (۱۰۰bp) در جدول شماره (۱) نشان داده شده است.

جدول (۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش

	آغازگر رفت	آغازگر برگشت
پلی آدنیلات بایندینگ (PABP)	GAGGCCCTGCAGATGTTAAATG	TCCTGCTGTGGCTGTTTATTTG
فسفوفروکتوکیناز (PFK)	GTGATGCGTTATAGCTGAGTGC	GTGGCCCTACGAAGAACAATTC

برای اندازه‌گیری مقدار رونویسی از هر ژن، واکنش پی سی آر در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Step One plus Real-tim PCR شرکت ABI و با اجزای ذکرشده در جدول (۲) انجام شد.

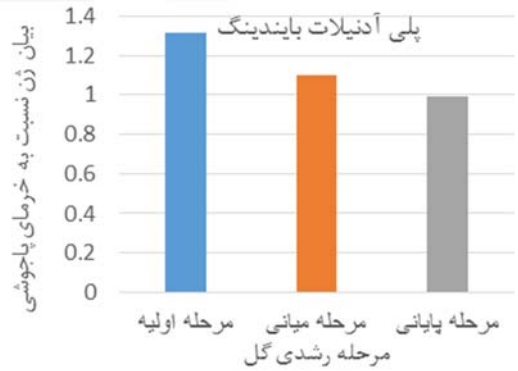
جدول (۲)-مخلوط واکنش Real time PCR

ماده شیمیایی	مقدار ماده برحسب میکرولیتر
آب دو بار تقطیر	۸/۵
آغازگر رفت	۱
آغازگر برگشت	۱
سایبرگرین	۱۲/۵
cDNA template	۲
حجم نهایی مخلوط واکنش	۲۵

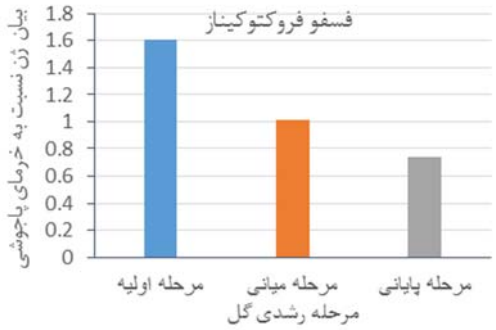
در این آزمایش از ژن 18SrRNA به‌عنوان کنترل استفاده شد.

نتایج و بحث

از روش لیواک که به‌اختصار روش ΔΔCT (اختلاف در تغییرات چرخه آستانه) نامیده می‌شود برای محاسبه‌ی میزان رونویسی استفاده گردید. نتایج به‌دست‌آمده پس از محاسبات و آنالیز بیان ژن توسط نرم‌افزار SAS9.1 تجزیه واریانس شد و به‌صورت نمودارهای شماره (۱) و (۲) نشان داده شده است.



نمودار (۱) اثر نوع تکثیر بر میزان بیان ژن PABP در سه مرحله رشدی گل



نمودار (۲) اثر نوع تکثیر بر میزان بیان ژن PFK در سه مرحله رشدی گل

بررسی میزان بیان ژن‌های پلی ادنیلات بایندینگ و فسفوفروکتوکیناز نشان داد که میزان بیان ژن پلی ادنیلات بایندینگ در خرمای کشت بافتی در دوره‌های مختلف رشد گل نسبت به خرمای پاجوشی تفاوتی نداشت اما میزان بیان ژن فسفوفروکتوکیناز اندکی کاهش یافته است ولی این کاهش معنی‌دار نبوده است.

(Ahmed *et al*., 2009) در آزمایشی بر روی ۱۸۰ گیاهچه و گیاهان مادری آن‌ها در رقم دگلت نور در تونس با استفاده از ۹ جفت پرایمر RAPD نشان دادند که هیچ‌گونه تفاوتی بین گیاهان مادری و گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت وجود ندارد. آن ها نتیجه گرفتند که هورمون تو، فور، دی نمی‌تواند تنوع سوماکلونال را القا کند. (Gurevich *et al*., 2005) تنوع ژنتیکی دو رقم خرمای پاجوشی و کشت بافت را با استفاده از نشانگر ای اف ال پی روی ۲۹ نمونه برحی و ۲۸ نمونه مجول پاجوشی و کشت بافت با استفاده از ۵ آغازگر مختلف بررسی کردند. در کل تعداد ۳۱۷ باند توسط این نشانگر ثبت شد. سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بین این دو رقم تشخیص داده شد. ۵۰ باند درون نمونه‌های برحی چند شکل بودند. درختان مجول تکثیر شده توسط کشت بافت سطح بالایی از چندشکلی نشان دادند (Tavan, 2014) در مقایسه بیان ژن‌های چالکون سنتاز، فسفوفروکتوکیناز، یوبی کوئیتین و متالوتیونین در برگ‌های نخل خرما در سه رقم برحی زاهدی و دیری با استفاده از روش PCR کمی نشان داد که در میزان بیان ژن‌های مدنظر تفاوت‌هایی بین ارقام و همچنین نوع تکثیر وجود دارد و بعضی از این ژن‌ها با یکدیگر همبستگی دارند. نتایج آزمایش نشان داد که بعضی از این ژن‌ها با هم همبستگی داشتند. وی در تحقیقات

خود نشان داد که اثر متقابل رقم و نوع کشت بر کاهش یا افزایش میزان بیان هر ژن تأثیرگذار است و اینکه این تغییر در راستای کاهش یا افزایش بیان باشد، به زمینه‌ی ژنتیکی ریز نمونه بستگی دارد.

در این تحقیق همان‌گونه که در نمودارها نشان داده شده است میزان بیان دو ژن موردبررسی در دوره‌های مختلف رشدی گل و همچنین در دو نوع تکثیر (کشت بافت و پاجوش) اختلاف چندانی نداشت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت‌های موجود می‌تواند ناشی از سایر عوامل تأثیرگذار و یا ژن‌های دیگر باشد.

منابع

Ahmed, O., Chokri, B., Noureddine, D., Mohamed, M. and Mokhtar, T. 2009. Regenration and molecular analysis of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) plants using RAPD markers. African Journal of Biotechnology 8(5):1-9.

Lebon, G. Wojnarowiez, B. Holzapfel, F. Fontaine, N. Vaillant-Gaveau and C.Cement.(2010). Sugars and flowering in the gerapevine (*Vitis vinifera L.*) published by oxford university press.

Gurevich, V., Lavi, u., and Cohen, Y. 2005 . Genetic variation in date palms propagated from offshoots and tissue culture. Journal of the American Society for Horticultural Science 130(1): 24-33

Kahvejian, A., Y.V.and Sukarieh, R. 2005. Mammalian Poly(A)-binding Protein is a eukaryotic translation initiation factor, Which acts via multiple mechanisms. Genes Dev. 19: 104-113

McCubbin, M.J, J. Van. S. and Zaid, A. 2000. A Souhern African survet conducted for off-types on date Palms Produced using somatic embryogenesis. Proc. Date Palm Intl. Symp., Windhoek, Namibia.P.68-7

Safari, M. 2003. Basics of Agriculturral Biochemistry. Publishing and Printing Institue of Tehran University. P 325-326

Tavan, z, 2014,Comparison of gene expression of tissue culture Plants, Plant shoots to date by qRT-PCR technique, Masters Thesis, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan.

Expression of PABP and PFK Gene in Non-Pollinated Flowers of Tissue Derived and Offshoot Date Palm Trees (cv. Barhee) Using Qrt-PCR

Sayedeh Zahra Hosseini Mousavi [*1], Mousa Mousavi[1], Khalil Alami Saeid[2]
[1] Department of Horticulture, Shahid Chamran University of Ahvaz
[2] Department of Agriculture Biotechnology,Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan
[*]*Corresponding Author: zahramosavi670@yahoo.com*

Abstract

Date palm Is propagated conventionally through offshoot but this method has several limitations. Recently propagation of date palm through tissue culture was developed and become an important commercial method. However, in some cases the tissue culture derived plantlets show a series of deformations due to the somaclonal variation. In this study we checked the trueness to typness of date palm cv. Barhee derived from tissue culture and evaluation the expression of PABP and PFK genes in no pollinated flowers using Quantitative qRT- PCR method and compared with offshoot trees. The results indicated that a slightly non-significant deference was observed between tissue derived and offshoot trees.
***Keywords*: Date Palm, Gene Expression, Somaclonal Variation, Tissue Culture, qRT -PCR**