بررسی فیزیولژیکی و مولکولی مقاومت به سرما در انگور

علی عبادی [1]، علیرضا سلامی [2]، امیر موسوی [3]، مریم کریمی [4]، ایمان هراتی [5]، مهناز پیله فروشان [6]

1، 2، 4، 5 و 6- به ترتیب استاد، استادیار و دانشجویان تحصیلات تکمیلی گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. 3- دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

چکیده

انگور یکی از محصولات مهم باغبانی است و کشور ایران از نظر تولید این محصول رتبه نهم را در بین کشورهای جهان بخود اختصاص داده است. یکی از مشکلات تولید انگور در ایران مسئله سرمازدگی های زمستانه و بهاره می باشد که هرساله خسارت قابل توجهی به تولید این محصول وارد می نماید.

در این تحقیق مکانیزم های فیزیولوژیک و مولکولی مقاومت در برخی بوته های برخی ارقام انگور باقی مانده از سرمای سال 1386 با بررسی نشت یونی، درصد سبز شدن قلمه ها، همسانه سازی ژن های عامل رونویسی (CBFs) و مطالعه میزان بیان آن ها مورد بررسی قرار گرفته است. به این منظور قلمه های بوته های مورد نظر در معرض دماهای 15- ، 18- ، 21- ، و 24- درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس نشت یونی ان ها اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که حتی بین بوته های متحمل به سرمای ارقام مختلف و همچنین دماهای مختلف اختلاف قابل توجهی وجود دارد. از سوی دیگر گیاهان تکثیر شده از این بوته ها در معرض دمای 4 درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس بیان ژن های CBF در ان ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با قرار گیری گیاهان در معرض سرما بیان ژن های مورد نظر تغییر می یابد و این روند بین ارقام و زمان های مختلف اندازه گیری متفاوت بود. در مجموع گیاهان متحمل تر دارای بیان بیشتر ژن های مورد نظر و در نتیجه درصد بالاتر سبز شدن جوانه ها پس از قرارگیری در معرض دماهای زیر صفر بودند. در ادمه تعدادی از این ژن ها همسانه سازی شده و توالی آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

کلمات کلیدی: انگور، سرمازدگی، نشت یونی، سبز شدن جوانه ها، ژن های عامل رو نویسی، همسانه سازی، بیان ژن

مقدمه:

گونه *Vitis vinifera* بیش از هفت هزار سال است که اهلی شده است و تا به امروز یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی در سطح جهان می‌باشد. کشت *V. vinifera* و دیگر گونه‌های ویتیس بیش از هر میوه دیگر، تقریبا 8 میلیون هکتار از زمین‌های سطح زمین را در بر می‌گیرد (آریو-گارسیا[1]، 2006).

رقم‌های گونه *V. vinifera* به خوبی در اقلیم‌های معتدله و نیمه خشک رشد و پرورش می یابند و می توانند تا حدودی دماهای یخزدگی و زیر یخزدگی را در زمستان تجربه کنند. گونه‌های ویتیس به عنوان گیاهان چند ساله خزان‌دار تحمل به یخزدگی را با توجه به یخزدگی های سالانه به دست می‌آورند. در سرمای تدریجی، رقم‌های *V. vinifera*، دماهای زمستان را تا منفی 15 درجه سانتی گراد بدون آسیب سرمایی تحمل می کنند، در حالی که گونه‌های آسیایی و آمریکای شمالی دماهای منفی 35 تا منفی 40 درجه سانتی‌گراد را می‌توانند تحمل کنند (مالینز[2] و همکاران، 1992؛ فنل[3] و همکاران، 2004).

[1] Arroyo-Garcia
[2] Mullins
[3] Fennell

یکی از مشکلات پرورش مو در اکثر نقاط ایران مسئله سرمازدگی‌های زمستانه و بهاره است .روش های سنتی مقابله با سرما(مواد شیمیایی و ضدیخ‌های گیاهی، آبیاری بارانی، استفاده از مولدهای تولید باد) گاهی از نظر هزینه و یا به علت آن‌که سرما ناگهانی که رخ می‌دهد کاربردی نمی باشد. بنابراین تولید رقم‌های جدید با کمیت و کیفیت مطلوب از نظر تولید میوه و متحمل به سرما حائز اهمیت می‌باشد. این امر از طریق بکارگیری روش‌های بهنژادی و بیوتکنولوژی امکان پذیر است.

بنابراین مشخص نمودن مکانیزم‌های مقاومت به سرما در گونه‌های مقاوم به سرما، شناسایی و جداسازی ژن‌های عامل مقاومت به سرما و انتقال آن به رقم‌های حساس مو می تواند این مشکلات را مرتفع نماید.

به منظور مشخص نمودن مکانیزم‌های مقاومت به سرما و استفاده از آن برای مقاوم‌سازی رقم‌های مطلوب تجاری، این تحقیق با تکیه بر عوامل رونویسی *CBFs* که در مقاوم شدن گیاهان به سرمازدگی و یخزدگی نقش بسزایی دارند، انجام گردید و در کنار آنها اندازه گیری آنزیم های پراکسیداز، کاتالاز، پروتئین کل و میزان سبز شدن قلمه ها بعد از قرار گیری در دماهای یخ زدگی انجام شد.

مواد و روش ها:

قلمه‌گیری از رقم‌های بیدانه سفید، شاهرودی، اتابکی، خلیلی دانه‌دار قوچان، عسکری، بیدانه قرمز و رجبی از ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی و قلمه‌گیری از بوته‌های گلدانی گونه ویتیس ریپاریا در گلخانه‌های گروه علوم باغبانی در آذرماه سال 1390 تهیه و جهت اطمینان از رفع نیاز سرمایی، قلمه‌ها به مدت یک ماه در سردخانه با دمای دو درجه سانتی‌گراد در ماسه مرطوب نگه‌داری شدند. تعدادی از این قلمه ها جهت بررسی تحمل به یخزدگی در دستگاه سرماساز قرار گرفتند و تعدادی از قلمه‌ها نیز پس از ریشه‌دار شدن در گلدان‌های حاوی ماسه، در گلدان‌های محتوی ترکیب محیط کشت خاک، خاک برگ و ماسه به نسبت 1:1:1، کشت شدند و پس از این که به اندازه کافی رشد کردند، جهت اعمال تیمار سرمایی و بررسی بیان ژن‌های مورد نظر و تعدادی از آنزیم های فعال در رفع گونه های اکسیژن فعال مورد استفاده قرار گرفتند.

استفاده از دستگاه سرماساز، بر اساس روش لیندن و پالونن (2000) جهت بررسی تحمل به یخزدگی صورت گرفت. دماهای مورد عبارت بودند از: 15- ، 18- ، 21- ، و 24- درجه سانتی‌گراد. پس از آن تحمل به یخ زدگی قلمه ها با بررسی نشت یونی،میزان سبز شدن جوانه ها و بررسی میکروسکوپی میزان زنده مانی جوانه ها انجام شد.

به منظور کلون سازی و بررسی بیان ژنهای مختلف نیاز به استخراج DNA و RNA میباشد که به ترتیب از روش توماس و همکاران (1993) و حیدری و همکاران (2011) استفاده شد. به منظور بررسی تفاوت های احتمالی بین توالی نوکلئوتیدی ناحیه کد کننده ژنهای CBFs، تمامی این ژنها کلون شده و توالی یابی شدند.

نتایج و بحث:

در این تحقیق پس از انجام آزمایش‌های بررسی بازیابی و سبز شدن قلمه ها ، نشت یونی و بررسی میکروسکوپی جوانه ها مشخص شد که پس از اعمال تنش یخ زدگی در دماهای 15- ، 18- ، 21- ، و 24- درجه سانتی‌گراد بیشترین میانگین درصد

سبز شدن در بین بوته های متحمل رقم های گونه وینیفرا مورد بررسی، به ترتیب مربوط به رقم های خلیلی دانه‌دار، بیدانه سفید، شاهرودی و اتابکی بودکه با توجه به تطابق میزان سبز شدن قلمه ها پس از اعمال تنش یخزدگی و همچنین میزان بیان ژن CBF4 تحت تنش سرمایی چهار درجه سانتی‌گراد ، احتمال آن می‌رود که رقم خلیلی دانه دار، رقم متحمل‌تری نسبت به سایر رقم های گونه وینیفرای مورد بررسی نسبت به تنش‌های سرمایی و یخزدگی باشد. در تمامی ارقام بجز رقم خلیلی دانه دار بیان ژن CBF4 در زمان 4 ساعت حداکثر بود و بعد از آن کاهش یافت، در رقم خلیلی دانه دار حداکثر بیان در زمان دوازده ساعت مشاهده شد که علت این امر شاید تحمل بیشتر این رقم نسبت به دماهای پایین و نیاز دیرتر برای بیان این ژن در رقم خلیلی باشد. بررسی های اولیه بیان ژن CBF3 در انگور ریپاریا و شاهرودی نشان داده است که در رقم ریپاریا بیان این ژن در زمان چهار ساعت حداقل بود و پس از آن با گذشت زمان تا پنج روز بعد از تنش بیان ژن افزایش داشته است در حالیکه در رقم شاهرودی بیان ژن CBF3 چنین روندی را طی نکرد و پس از چهار ساعت روند کاهشی بیان ژن مشاهده گردید. در آزمایش انجام شده توسط زایو[4] و همکاران (2006) نیز بیان ژن CBF3 پس از گذشت یک روز افزایش یافت و بیان تا چندین روز تداوم داشت. مقایسه نشت یونی قلمه های ارقام مورد بررسی نشان داد که رقم بیدانه سفید، خلیلی و اتابکی در یک گروه قرار داشته و کمترین میزان نشت یونی را نسبت به رقم شاهرودی نشان دادند. قلمه های گونه ریپاریا درصد بالاتری از سبز شدن را نسبت به ارقام گونه وینیفرا نشان دادند..

در بررسی های آنزیمی انجام شده نیز رقم خلیلی دانه دار در سطح برابر با گونه های انگور متحمل به سرما فعالیت کاتالاز و پراکسیداز را نشان داد و از سایر انگورهای وینیفرا متمایز گردید و ارقامی مانند شاهرودی و بیدانه سفید جزو ارقامی بودند که کمترین فعالیت آنزیم های قید شده را داشتند. آنزیم کاتالاز در بازه زمانی هشت ساعت بعد از تنش به حداکثر فعالیت رسید و پس از آن تقریبا به طور ثابت فعالیت داشت و تغییرات چشمگیری نشان نداد. در مورد آنزیم گوائیکول پراکسیداز بازه زمانی 12 ساعت حداکثر فعالیت آنزیم مشاهده شد و بعد از آن با کنترل شرایط تنش به صورت یکنواخت و ثابت فعالیت میکند. میزان پروتئین کل اندازه گیری شده در زمان های مختلف نشان داد که در زمان 12 ساعت حداکثر میزان پروتئین کل تجمع یافت و در بین ارقام وینیفرا رقم خلیلی دانه دار و در کنار آن انگور آمریکایی ریپاریا حداکثر میزان پروتئین کل را داشتند.

آنچه از آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی و مقایسه آن‌ها با هم، حاصل گردید این است که بین توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن *CBF4* در رقم‌های بیدانه سفید، شاهرودی، Chardonnay، Hamburg، Tamnara و گونه‌های *V. riparia*، *V. amurensis* و *M. rotundifolia* تفاوت چندانی وجود ندارد و تفاوت تک نوکلئوتیدی مشاهده شده تغییر زیادی در توالی پروتئینی ایجاد نکرد لذا تفاوت‌های جزئی که در ناحیه کد کننده ژن *CBF4* و توالی آمینواسیدی آن در رقم‌ها و گونه‌های انگور مورد بررسی وجود دارد احتمالا نمی تواند منجر به تفاوت در تحمل به سرما گردد، خیلی محتمل نمی‌باشد، اما به نظر می‌رسد آن‌چه موجب تفاوت در تحمل به سرما بین رقم‌ها و گونه‌های حساس و مقاوم می‌شود، تغییرات بیان ژن *CBF4* در سطح RNA و پروتئین و همچنین تغییرات و تنظیماتی که پس از بیان و تولید محصول ژن *CBF4*، رخ می‌دهد، می‌تواند منجر به تفاوت در عملکرد نهایی ژن *CBF4* شود و همچنین تفاوت احتمالی در اندازه رگولون‌های این ژن در گونه حساس انگور (ویتیس وینیفرا) و گونه مقاوم انگور (ویتیس ریپاریا) می‌تواند تفاوت در تحمل به سرما در رقم‌ها و

[4]. xio

گونه‌های انگور گردد. پس از انتقال این ژن به وکتور pbs و کلون کردن این ژن در باکتری E.coli، برای تشخیص وجود قطعه در کلونی ها از کلونینگ پی سی آر استفاده شد و برای تائید حتمی آن برش قطعه با آنزیم های مرتبط انجام شد و پس آز آن پلاسمید حاوی قطعه کلون شده برای توالی یابی فرستاده شد نتایج توالی یابی تشابه 99% قطعه کلون شده با توالی ثبت شده برای این ژن را در بانک اطلاعات نشان داد. توالی یابی و کلونینگ دیگر ژنهای CBFs همچنان در دست بررسی می باشد.

منابع مورد استفاده

Arroyo-Garcia R, Ruiz-Garcia L, Bolling L, Ocete R, Lopez M, Arnold C, Ergul A, Soylemezoglu G, Uzun H, Cabello F, Ibanez J, Aradhya M, Atanassov A, Atanassov I, Balint S, Cenis J, Costantini L, Goris-Lavets S, Grando M, Klein B, McGovern P, Merdinoglu D, Pejic I, Pelsy F, Primikirios N, Risovannaya V, Roubelakis-Angelakis K, Snoussi H, Sotiri P, Tamhankar S, This P, Troshin L, Malpica J, Lefort F. and Martinez-Zapater, J. 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (Vitis vinifera L. ssp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms. Mol.Ecol.15,3707–3714

Mullins MG, Bouquet A, Williams LE. 1992. Biology of the grapevine: Cambridge University Press .

Fennell A. 2004. Freezing tolerance and injury in grapevines. Journal of Crop Improvement 10(1-2):201-235.

Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, Nassuth A. 2006. Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. Plant cell & environment 29(7): 1410-1421 .