

### بررسی بیان برخی از ژن های مسیر اتیلن در رز (*Rosa hybrida*) با استفاده از روش Real-Time PCR

حنیفه سید حاجی زاده (۱)، خدیجه رضوی (۲)، یونس مستوفی (۳)، ذبیح اله زمانی (۴)، ابراهیم طلعتی (۵)

۱- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، آذربایجان شرقی، مراغه، ایران ۲- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، بلوار پژوهش، تهران، ایران ۳ و ۴- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران ۵- کارشناس زراعت و اصلاح نباتات، شرکت عمران شهر جدید پردیس، ایران

اتیلن یکی از ترکیبات تنظیم کننده رشد گیاهی است که نقش های زیادی را در گیاهان از جوانه زنی بذر تا ژیری و ریزش گل و میوه ایفا می کند. در این پروژه الگوی بیان دو ژن از ژن های درگیر در مسیر انتقال سیگنال اتیلن (*RhCTR1* و *RhCTR2*) طی پیری گلبرگ در دو رقم رز 'بلک مجیک' و 'ماروسیا' که از نظر عمر گلدانی متفاوت هستند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده بیان افزایشی ژن *RhCTR1* طی باز شدن گل در هر دو رقم می باشد به طوریکه میزان بیان این ژن در رقم ماروسیا بطور معنی داری بیشتر از رقم بلک مجیک بود. در هیچ کدام از رقم ها، تفاوتی در بیان ژن *RhCTR2* در مراحل مختلف باز شدن گل مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: رز (*Rosa hybrida*)، *RhCTR1* و *RhCTR2*، الگوی بیان ژن، حساسیت به اتیلن

مقدمه

رز یکی از مهمترین گل های شاخه بریده در بین گیاهان زینتی می باشد. شواهد موجود در مورد نحوه عمل اتیلن نشان دهنده دخالت یک خانواده ژنی از گیرنده ها می باشد که قادر به تشکیل کمپلکس با کینازها هستند و *CTR1* نامیده می شوند. مولر و همکاران (۲۰۰۲) بیان ۲ همولوگ ژن *CTR* (*RhCTR1* و *RhCTR2*) را در ۲ رقم رز مینیاتوری که از نظر عمر پس از برداشت و حساسیت به اتیلن با هم متفاوت بودند (مولر و همکاران، ۱۹۹۸؛ مولر و همکاران، ۲۰۰۰ الف و ب) در طی پیری گل با روش RT-PCR بررسی کرده و دریافتند که بیان *RhCTR1* در طول پیری گل افزایش می یابد، درحالیکه بیان *RhCTR2* در طول نمو گل، یکنواخت می باشد. از طرف دیگر بیان هر دو ژن با قرار گرفتن در معرض اتیلن خارجی، افزایش یافت (مولر و همکاران، ۲۰۰۲). هدف از این پژوهش بررسی الگوی بیان دو ژن مهم (*RhCTR1*) و (*RhCTR2*) درگیر در مسیر انتقال علائم اتیلن به منظور درک بهتر مفاهیم تنظیم بیان ژن طی پیری گل رز می باشد.

مواد و روش ها

برای انجام این پژوهش پایه های سالم و عاری از شته و بیماری دو رقم رز (*Rosa X hybrida*) با نام های 'بلک ماجیک' (با عمر گلدانی کوتاه) و 'ماروسیا' (با عمر گلدانی بلند) از گلخانه هیدروپونیک جهاد کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران برای انجام آزمایش انتخاب شدند. سپس گلبرگ ها در دو مرحله (الف) مرحله ۲ (غنچه باز نشده ولی گلبرگ ها نمایان هستند) و (ب) مرحله ۸ (گل کاملاً باز شده و پرچم ها نمایان هستند) (وانگ و همکاران، ۲۰۰۴) برداشت شده و فوراً در نیتروژن مایع برای استخراج RNA گذاشته شدند. RNA کل و با کیفیت بالا، از ۱۰۰ میکروگرم بافت گیاهی و با استفاده از کیت استخراج RNA کپاژن تهیه شد. پس از استخراج RNA، cDNA ی تک رشته ای مربوط به هر ژن با استفاده از ۵ میکروگرم RNA کل و کیت ProtoScript ساخته شد. بر اساس منابع موجود (مولر و

همکاران، ۲۰۰۰ الف و ب) از آغازگرهای مذکور در جدول ۱ برای بررسی کمی بیان ژن های فوق استفاده شد. از ژن S rRNA بعنوان استاندارد داخلی استفاده شد.

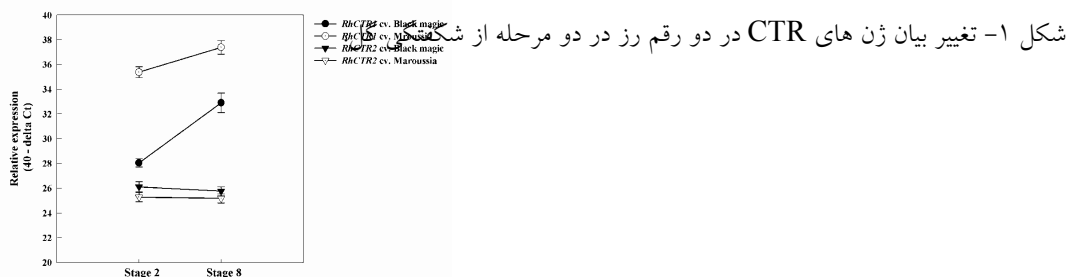
جدول ۱ - آغازگرهای مورد استفاده در بررسی کمی CTR ها

ژن	آغازگر پیشرو	آغازگر پسرو
CTR1	5'-GATGGCGCCAGAAGTCC-3'	5'-GCCCAGCAAGCCTCAAT-3'
CTR2	5'-GTCGCGCTTGAAACATAACA-3'	5'-AACAGGGGGATCAACTTCTTT-3'
18s rRNA	5'-CGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACA-3'	5'-CCACCACCCATAGAATCAAGAAAGAG-3'

واکنش Real Time RT-PCR با استفاده از دستگاه Fast Real Time PCR مدل ۷۵۰۰ (شرکت Applied Biosystems) و با کاربرد کیت qPCR SYBR Green (DYNAmo HS, Finnzymes, Finland). طبق دستورالعمل موجود در کیت برای بررسی الگوی بیان ژن های جداسازی شده انجام گرفت. داده های بدست آمده از PCR کمی با استفاده از نرم افزار Statistica مدل ۸ مورد تجزیه قرار گرفته و مقایسه میانگین ها با استفاده از Least (LSD) و در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد انجام شد. سپس بیان نسبی هر یک از قطعات محاسبه شده (دریل و همکاران، ۲۰۰۶) و نمودارهای مربوط با کمک نرم افزار SigmaPlot رسم شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی درصد بیان نسبی قطعات *CTR1* و *CTR2* طی مرحله ۲ (غنچه) و مرحله ۸ (گل) رز 'بلک ماجیک' نشان داد که بین درصد بیان نسبی هر دو قطعه، تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد طی مراحل مختلف نموی رز 'بلک ماجیک' وجود دارد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود، درصد بیان نسبی *CTR1* در هر دو رقم و در هر دو مرحله افزایش معنی دار نشان داد. نتایج مشابهی در هنگام پیر شدن گل رزهای مینیاتوری (مولر و همکاران، ۲۰۰۲) و در دو رقم گل رز شاخه بریده (تان و همکاران، ۲۰۰۶) گزارش شده است. بیان *CTR1* در رقم 'ماروسی' بیشتر است ولی افزایش سطح بیان آن از مرحله ۲ به مرحله ۸ در 'بلک ماجیک' قابل توجه است. از نتایج حاصل می توان نتیجه گرفت احتمالاً "ماندگاری گل بیشتر با افزایش سطح بیان این ژن ها در مراحل مختلف شکفتگی گل کاهش می یابد تا تغییر مقدار آنها. برای تایید این فرضیه تحقیقات بیشتر ضروری است. همچنین از داده های حاضر می توان نتیجه گرفت احتمالاً" رقم 'ماروسی' نسبت به اتیلن حساس نیست و از مدل استاندارد مسیر انتقال پیام اتیلن می توان استنباط کرد که افزایش بیان *CTR1* می تواند منجر به کاهش حساسیت نسبت به اتیلن شود (تان و همکاران، ۲۰۰۶). نتایج بدست آمده با یافته های شیبویا و همکاران (۲۰۰۲) در میخک مشابه است و فرضیه تنظیم منفی گیرنده های اتیلن را تایید می کند (هوآ و همکاران، ۱۹۹۸ ب؛ چن و همکاران، ۲۰۰۵). در مقایسه سطح بیان *CTR2* در دو رقم گل تغییر معنی دار مشاهده نشد (شکل ۱). همچنین سطح بیان این ژن در دو مرحله از شکفتگی گل در دو رقم تغییر معنی دار نشان نداد. بعلاوه نتایج نشان داد که سطوح بیان *CTR2* در همه حال کمتر از *CTR1* است و حتی در طی پیری گل در دو رقم بدون تغییر باقی می ماند. بنابراین فرض بر آن است که رفتار این ژن مشابه رفتار یک ژن ساختاری است و نتایج مشابه در دو رقم رز شاخه بریده (تان و همکاران، ۲۰۰۶) و رز های مینیاتوری (مولر و همکاران، ۲۰۰۲) گزارش شده است.



## منابع علمی

- Nabigol, A., Naderi, R., Mostofi, Y., Khalighi, A., Bujar, M. 2009. Soluble Carbohydrates Content and Ethylene Production in Cut Rose Cultivars. Hort. Environ. Biotechnol. 50, 122-126.
- Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Sato, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Ueda, T., Nakao, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T. 2000. Aureusidin synthase: A polyphenoloxidase homolog responsible for flower coloration. Science. 290, 1163-1166.
- Müller, R., Owen, C.A., Xue, Z.T., Welander, M., Stummann, B.M. 2002. Characterization of two CTR-like protein kinases in *Rosa hybrida* and their expression during flower senescence and in response to ethylene. Journal of experimental botany. 53, 1223-1225.

### Investigation of expression level of some genes involvement in ethylene transduction pathway in *Rosa hybrida* using Real time PCR

#### Abstract

Ethylene is one of the plant growth regulators which plays different roles from seed germination till senescence and abscission of fruits and flowers. The expression pattern of two genes involvement in ethylene transduction pathway (*RhCTR2* and *RhCTR1*) during petal senescence of two rose cultivars "Black magic" and "Marroussia" with different longevity were investigated in the present study. Results showed that the expression level of *RhCTR1* increased during stages of flower opening in both cultivars and the level of *RhCTR1* expression in cv. Marroussia was significantly more than that in cv. Black magic. Also there was no significant difference between two cultivars in level of *RhCTR2* expression level during different flower opening stages.

Key words; *Rosa hybrida*, *RhCTR2* and *RhCTR1*, gene expression pattern, ethylene sensibility