جداسازی ژن‌های آکواپورین در ژنوتیپ آذران گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

سیده سمانه حسینی [۱]، نوراله احمدی [۲*]، عباس یداللهی [۳]، امید رسولی [۴]
۱ و ۴- دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد. ۲ و۳- استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران.
* نویسنده مسئول : نوراله احمدی ahmadin@modares.ac.ir

چکیده

اتیلن یک هیدروکربن گازی و تنظیم کننده رشد گیاهی است. القاء پیری یا ریزش گلبرگ به وسیله اتیلن، به تنظیم رونویسی ژن‌های *ACS* و *ACO* و نیز ژن‌های دریافت کننده اتیلن وابسته می‌باشد.این آزمایش با هدف جداسازی ژن‌های اکواپورین درژنوتیپ آذران گل محمدی برای نخستین بار انجام گردید. پس از تیمار با اتیلن و جداسازی RNA و ساخت cDNAs، پاره توالی ژن‌های *PIP1* و *TIP2* در ژنوتیپ آذران جداسازی شدند. نتایج نشان داد دوژن *PIP1* و *TIP2* در گلبرگ‌های گل محمدی ژنوتیپ آذران بیان می‌شوند. ژن‌های جدا شده فوق‌الذکر، ارزش انتظار را با ژن‌های همولوگ خود در خانواده رزاسه داشتند.

کلمات کلیدی: اتیلن، جداسازی ژن، گل محمدی، *PIP*، *TIP*.

مقدمه

اتیلن یک هیدروکربن گازی و تنظیم کننده رشد گیاهی است که تأثیر زیادی بر رشد و نمو گیاه دارد.تأثیرات اتیلن شامل فرآیندهای رسیدن میوه، ریزش و پیری برگ، جوانه گل و گل می‌باشد(Reid, 1995). به طور کلی، در اکثر گیاهان حساس به اتیلن ریزش تحت تاثیر اتیلن تسریع می‌گردد (Van Doorn, 2002). به نظر می‌رسد آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی نقش اصلی را در انجام فرآیند ریزش بر عهده داشته باشند که اندونوکلئازها و پلی‌گالاکترونازها آنزیم‌های عمده‌ای هستند که تاکنون مطالعه شده‌اند (Beno-Moualem*et al.*, 2004).رفتار رزهای گلدانی در پاسخ به تیمار اتیلن خارجی، بسته به کولتیوار، متفاوت است (Ahmadi*et al.*, 2008). اتیلن چه در درون گیاه تولید شود و چه به صورت خارجی به کار برده شود، پس از دریافت توسط گیرنده‌ها و انتقال سیگنال، سبب تحریک بیان برخی از ژن‌های دخیل در فرایند پیری می‌گردد. دریافت اتیلن، اولین مسیر درگیر شدن اتیلن در فعال شدن رونویسی است (Ahmadi*et al.*, 2009).در رزها، اتیلن به‌وسیله خانواده‌ای از گیرنده‌ها که مشابه هیستیدین کینازهای دو جزئی عمل می‌کنند، دریافت می‌شود.در رزها، بعد از قرارگیری در معرض اتیلن، برخی ژن‌ها شامل ژن Programmed-cell-death-like، ژنdrugresistance- like Pleiotropic، ژن Plastid FtsHprotease-like و Cysteine protease در ناحیه ریزش گلبرگ بیان می‌شوند(Ahmadi*et al.*, 2009). در ناحیه ریزش گلبرگ‌ها در *Rosa bourboniana*، بیان Expansin gene به‌وسیله اتیلن افزایش می‌یابد که تحت شرایط طبیعی نیز القا می‌شود (Sane *et al.*, 2007).اخیراً ژن *RhLAC* از *Rosahybrid*cv Lavender جدا شده است. میزان بیان ژن *RhLAC*درLavender، در نمونه‌های تیمار شده با اتیلن به صورت قابل توجهی بیشتر از نمونه‌های تیمار نشده است. به نظر می‌رسد که کپی‌های چندگانه‌ای از این ژن در رزها وجود داشته باشد (Ahmadi*et al.*, 2009). القاء پیری یا ریزش گلبرگ به وسیله اتیلن، به تنظیم رونویسی ژن‌های *ACS* و *ACO* و نیز ژن‌های دریافت کننده اتیلن وابسته می‌باشد (Xue*et al.*, 2008).*ACO* به‌وسیله یک خانواده چندژنی کوچک رمزگذاری می‌شود. ژن‌های *ACO* در پاسخ به شرایط محیطی و نموی به صورت متفاوتی تنظیم می‌شوند. در برخی موارد اتیلن بیان ژن‌های *ACS* و *ACO* را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Ma *et al.*, 2006). *Rh-PIP1* یک ژن آکواپورین پاسخ دهنده

به اتیلن است که نقش مهمی را در توسعه غشای سلولی گلبرگ‌های رز به عهده دارد. آکواپورین‌ها کانال‌های جذب آب هستند که نقش تنظیمی در توسعه سلولی را به عهده دارند. در گیاهان، آکواپورین‌ها شامل پروتئین‌های اصلی غشای پلاسمایی[1] و پروتئین‌های اصلی تونوپلاست[2]می‌باشند. *PIP* و *TIP* به ترتیب در غشای پلاسما و تونوپلاست قرار دارند و تقریباً در تمام بافت‌های گیاهی یافت می شوند (Li et al., 2009). در طی فرآیند پیری رزهای مینیاتوری، در کولتیوارهای با ماندگاری کم، بیان ژن *ACS* افزایش می‌یابد، اما در کولتیوارهای با ماندگاری طولانی، بیان این ژن کم است. همچنین مشخص گردید است که بیان ژن *ACO* در مراحل آخر نمو گل، افزایش می‌یابد. در گل رز، تیمار با اتیلن سبب القاء بیان ژن *Rh- ACS3*در گلبرگ‌ها می‌شود(Muller *et al.*, 2000).

گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) یکی از گونه‌های مهم رز بومی ایران، هم به عنوان یک گیاه زینتی و هم به عنوان گیاه دارویی جهت تهیه اسانس، دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. با توجه به نیاز برنامه‌های اصلاحی گل محمدی به اطلاعات اساسی اولیه، این آزمایش با هدف جداسازی ژن‌های اکواپورین انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۱ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، انجام گرفت. به منظور تیمار با اتیلن، ابتدا شاخه‌ها به طول ۴۰-۳۰ سانتی‌متر از بوته‌های گل محمدی موجود در باغ تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس جدا شده و پس از حذف گل‌های باز و غنچه‌های گل سقط شده و نیز برش دوباره‌ی[3] انتهای ساقه‌ها در زیر آب، شاخه‌ها به گلدان‌های شیشه‌ای حاوی ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول HQS انتقال داده شدند. پس از انتقال گلدان‌های شیشه‌ای به درون آکواریوم‌های شیشه‌ای، درب آکواریوم‌ها با استفاده از چسب به‌طور کامل بسته شد تا نسبت به اتیلن غیر قابل نفوذ باشند. سپس تیمار با اتیلن (غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲، ۴ و ۱۰ مایکرولیتر بر لیتر) بوسیله‌ی سرنگ همیلتون و از محل سپتوم‌های موجود در قسمت درپوش به داخل آکورایم تزریق گردید.

استخراج RNA، تیمار DNase و ساخت cDNA

به منظور استخراج RNA از کیت استخراج RNA[4] (Invitek) InvisorbR Spin Plant RNA Mini Kitاستفاده شد. سپس کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد در دستگاه الکتروفورز تعیین گردید.جهت انجام تیمار DNase،RNA۱۴µl، ۰/۲۵µl DNaseI، ۰/۵µl RNase inhibitor، ۲ µl DNase buffer 10X و ۳/۲۵ µl آب دوبار تقطیر به یکمیکروتیوب[5] ۰/۲ میلی‌لیتری اضافه و میکروتیوب به مدت نیم ساعت در دستگاه ترموسایکلر (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. سپس ۲µl EDTA به میکرو تیوب اضافه و مجدداً ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر قرار داده شدند. سپس با استفاده از الکتروفورز و ژل آگارز یک درصد، از حذف DNA از نمونه‌های تیمار شده با DNase اطمینان حاصل گردید. همچنین به منظور ساخت cDNA از کیت (ساخت شرکت ماکروژن) استفاده گردید.۷/۵µl از RNA تیمار شده به داخل میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری عاری از RNaseو سپس۱µl از پرایمر الیگو[6]اضافه شد.سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند.

[1]Plasma Membrane Intrinsic Proteins (PIPs)
[2]Tonoplast Intrinsic Proteins (TIPs)
[3]Recut
[4]RNA Extraction Kit
[5]Micro tube
[6]Oligo

سپس۱ µl، dNTP(20 mM) ۵µl بافر واکنش رونویسی معکوس[7] ۲ (۵ X)، ۴µlDTT[8](100 mM) و۵µl کلرید منیزیم ($MgCl_2$) (۲۵ mM) و ۱µlآنزیم RNase inhibitor به میکروتیوب‌ها اضافه گردید.در پایان، ۰/۵µl آنزیم M-MLV Reverse Transcriptase Rnase H- (200 U/µl) اضافه و به آرامی با محتویات میکروتیوب مخلوط شد.میکروتیوب‌ها به مدت یک ساعت در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از اتمام برنامه، نمونه‌ها جهت نگهداری، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

انجام PCR نمونه‌های cDNA با پرایمر ژن کنترل داخلی و پرایمرهای ژن‌های مورد نظرو توالی‌یابی ژن‌های تکثیر شده

در این پژوهش، ژن Actinبه عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت.به منظور انجام واکنش PCR، ابتدا ۶µl Master mix(شرکت Ampliqon)، ۱µl پرایمر پیشرو و معکوس (۲/۵ پیکومول بر میکرولیتر) به میکروتیوب‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد به هر میکروتیوب میزان ۲µl از محصول cDNA رقیق شده اضافه شد تا حجم نمونه به ۱۲µl برسد و عمل تکثیر بصورت ذکر شده در جدول ۱صورت گرفت. در طی انجام هر واکنش PCR از کنترل منفی به منظور تضمین عدم وجود آلودگی و کنترل مثبت برای تأیید درستی کارکرد هر یک از واکنش‌گرها و دستگاه PCRاستفاده شد.DNAگل محمدی با روش CTAB(Doyle and Doyle, 1987) استخراج و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از اطمینان از ساخت cDNA، ژن‌های مرتبط با اتیلن مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی مراحلی که برایPCR ژن Actin بیان شد، در مورد این ژن‌ها نیز انجام شد. با استفاده از الگوی cDNA و انجام فرآیند PCR، تکثیر باندهای ژن‌های *PIP1* و *TIP*انجام گردید ومحصولات PCR بصورت تجاری توالی‌یابی شدند. توالی‌یابی ژن‌های مورد مطالعه در این آزمایش، توسط شرکت ماکروژن (در کره جنوبی) صورت گرفت.

جدول ۱-برنامه واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر

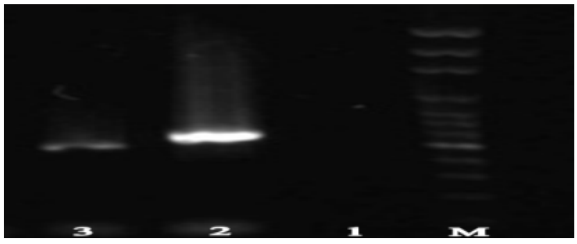
مرحله	حرارت (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۳۰
واسرشته‌سازی	۵۸	۴۰
اتصال	۷۲	۳۰
طویل شدن	۷۲	۳۰۰
تعداد چرخه‌های تکثیر ۳۳ تا می‌باشد		

نتایج

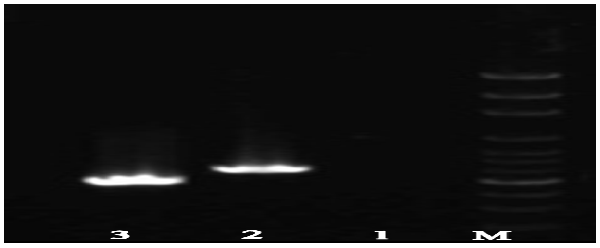
پس از انجام PCR و تکثیر cDNA، بارگذاری محصول ژن‌ها بر روی ژل آگارز انجام گرفت که در نتیجه آن، باندهای مورد نظر با اندازه تقریبی ۵۰۰ جفت باز (برای هر دوژن) روی ژل مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). نتایج نشان داد که هر دو ژن در گلبرگ گل محمدی ژنوتیپ آذران نسخه‌برداری می‌شوند. همچنین پس از توالی‌یابی ژن‌های مورد مطالعه، با استفاده از نتایج بدست آمده، فرآیند بلاست در

[7]Reaction Buffer 2
[8]Dithiothreitol

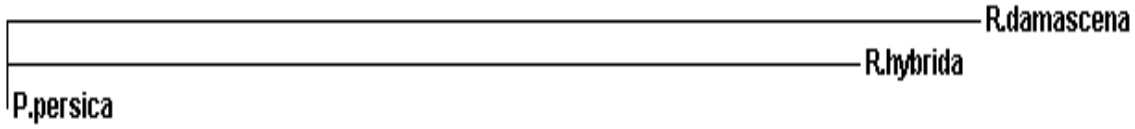
سایت NCBI[9] انجام گردیده و میزان همپوشانی توالی بدست آمده با گیاهان دیگر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، توالی حاصل از توالی‌یابی ژن *PIP1* و *TIP1* به ترتیب با توالی گزارش شده در *Rosa hybrida* و *Malus prunifolia* همپوشانی بالایی نشان داد. پس از انجام بلاست ژن‌های *PIP1* و *TIP1*، میزان قرابت آن با برخی گیاهان که توالی تقریباً مشابه داشتند توسط ClustalW2[10] در قالب نمودار درختی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج گواه از این بود که ژن *PIP1* گیاهان مورد بررسی در سه کلاس قرار گرفتند که توالی ژن *PIP1* در ژنوتیپ آذران گل محمدی خود به تنهایی در یک کلاس مجزا قرار گرفت و قرابت آن با *Rosa hybrid* بیشتر از *Prunus persica* بود (شکل ۳). از نظر توالی ژن *TIP1*، تشابه توالی *TIP1* در گل محمدی با *Pyrus communis* و *Malus prunifolia* بیشتر و با *Helianthemum almeriense* کمتر بود (شکل ۴).



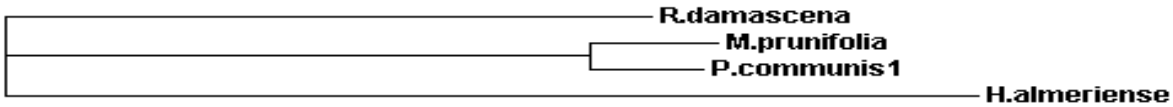
شکل ۱- تایید رونویسی قطعه ۵۰۰ جفت باز ژن *TIP*در ژنوم گلبرگ گل محمدی ژنوتیپ آذران تیمار شده با غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام اتیلن (M- مارکر وزنی، ۱- کنترل منفی ژن *TIP*، ۲- کنترل مثبت *TIP*، ۳- محصول PCR ژن *TIP*



شکل ۲- تایید رونویسی قطعه ۵۰۰ جفت باز ژن *PIP1* در ژنوم گلبرگ گل محمدی ژنوتیپ آذران تیمار شده با غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام اتیلن (M- مارکر وزنی، ۱- کنترل منفی ژن *PIP1*، ۲- کنترل مثبت *PIP1*، ۳- محصول PCR ژن *PIP1*).



شکل ۳- تجزیه کلاستر ژنوتیپ آذران گل محمدی و برخی گیاهان نزدیک به آن از نظر توالی ژن *PIP1*.



شکل ۴- تجزیه کلاستر ژنوتیپ آذران گل محمدی و برخی گیاهان نزدیک به آن از نظر توالی ژن *TIP1*.

[9] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
[10] http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

بحث

اتیلن سنتز شده در یک گیاه یا اتیلنی که به صورت خارجی به کار برده می‌شود، بر بیان گیرنده‌ها و ژن‌های درگیر در مسیر انتقال سیگنال اتیلن تأثیر می‌گذارد. دریافت اتیلن، اولین مسیر درگیر شدن اتیلن در فعال شدن رونویسی است (Ahmadi*et al.*,2009). Rh-*PIP1* یک ژن آکواپورین پاسخ دهنده به اتیلن است که نقش مهمی را در توسعه غشای سلولی گلبرگ‌های رز به عهده دارد (Li *et al.*, 2009). آکواپورین‌ها کانال‌های جذب آب هستند که نقش تنظیمی در توسعه سلولی را به عهده دارند. گزارشات بیان کرده‌اند که بیان ژن‌های آکوآپورین بوسیله ABA، GA3 و تنش‌ها در گیاه تنظیم می‌شوند (Maurel and Chrispeels 2001). به طور کلی براساس نتایج حاصل از این آزمایش نیز مشخص گردید که در حضور اتیلن، دو ژن *PIP1* و *TIP1* در گلبرگ گل محمدی بیان می‌شوند. گزارش شده است که در ریشه‌های گیاه آرابیدوپسیس، تنش شوری بیان ژن*PIP2;5* را کاهش می‌دهد (Boursiac*et al.*, 2005). همچنین بر اساس گزارشات، بیان ژن *PIP1* در رزها با باز شدن گل‌ها ارتباط دارد و بیان آن به‌وسیله اتیلن تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Li *et al.*, 2009). نتایج بلاست توالی‌های بدست آمده در این آزمایش نیز نشان داد که توالی ژن *TIP1* گل محمدی، با توالی ژن‌های *TIP* جدا شده از *Malusprunifolia*، *Pyruscommunis*، *Helianthemumalmeriense*، *Prunuspersica*مشابهت داشته و همچنین ژن *PIP1* جدا شده از گلبرگ گل محمدی با توالی ژن‌های *PIP* جدا شده از *Rosa hybrid*، *Prunus persica*، *Tulipa gesneriana* مشابهت دارد.

Refrences

Ahmadi, N., Mibus, H. and Serek, M. 2008. Isolation of an Ethylene-induced Putative Nucleotide Laccase in Miniature Roses (*Rosa hybrida* L.). J Plant Growth Regul; 27:320–330.

Ahmadi, N., Mibus, H. and Serek, M. 2009. Characterization of ethylene-induced organ abscission in F1 breeding lines of miniature roses (Rosa hybrida L.).Postharvest Biology and Technology; 52: 260–266.

Beno-Moualem, D., Gusev, L., Dvir, O., Pesis, E., Meir, S. and Lichter, A. 2004.The effects of ethylene, methyl jasmonate and 1-MCP on abscission of cherry tomatoes from the bunch and expression of endo-1, 4-β-glucanases. Plant Science; 167: 499–507.

Boursiac, Y., Chen, S., Luu, DT., Sorieul, M., van den Dries, N. andMaurel, C. 2005. Early effects of salinity on water transport in Arabidopsisroots: molecular and cellular features of aquaporin expression.Plant Physiol. 139:790–805.

Li, Y., Wu, Z. and Gao, J. 2009. Regulation of the rose Rh-PIP2;1 promoter by hormones and abiotic stresses in Arabidopsis. Plant Cell Reports; 28 (2): 185-196.

Ma, N., Tan, H., Liu, X., Xue, J., Li, Y. and Gao, J. 2006. Transcriptional regulation of ethylene receptor and CTR genes involved in ethylene-induced flower opening in cut rose (Rosa hybrida) cv. Samantha. Exp. Bot; 57: 2763–2773.

Maurel, C. and Chrispeels, M.J. 2001.Aquaporins: a molecular entry intoplant water relations. Plant Physiol; 125:135–138.

Müller, R., Lind-Iversen, S., Stummann, B.M. and Serek, M. 2000. Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniature roses. J. Hortic. Sci. Biotechnol; 75, 12–18.

Reid, M.S., Dodge, L.L., Mor, Y. and Evans, Y. 1995. Effect of ethylene on rose opening.ActaHorticulturae, 261:215-220.

Sane, A.P., Tripathi, S.K. AND Nath, P. 2007. Petal abscission in rose (Rosa bourbonianavarGrussanTeplitz) is associated with the enhanced expression of an alpha expansin gene, RbEXPA1. Plant Sci; 172:481–487

Van Doorn, W.G. 2002. Effect of ethylene on flower abscission: a survey. Ann. Bot; 89: 689–693.

Xue, J., Tan, H., Yang, F., Ma, N. and Gao, J. 2008. Expression of ethylene biosynthetic and receptor genes in rose floral tissues during ethylene-enhanced flower opening. Journal of Experimental of Botany; 59 (8): 2161-2169.

Isolation ofaquaporins genes in ‘Azaran’ genotype ofDamask rose (*Rosa damascena* Mill.)

Seyede Samaneh Hosseini, Noorollah Ahmadi*,Abbas Yadollahi, Omid rasuli
Dept. of Horticultural Sciences, Tarbiat Modares Univesity, Tehran, Iran.

***Corresponding Author: Noorollah Ahmadi** ahmadin@modares.ac.ir

Abstract
The hydrocarbon ethylene is a gaseous plant hormone. Ethylene induces senescence phenomenand petal and flower abscission in harmony with accumulation of transcripts from ethylene biosynthesis and receptor genes. Consequently, this resulted in up-regulation of some genes involved in organ abscission or leaf yellowing.This research was conducted for isolation of twopartial mRNAs sequences in 'Azaran' genotype of damask rose, for the first time. After ethylene treatment, RNA extraction and cDNA synthesis, partial mRNAs sequences were isolated from 'Azaran' ecotype. Results indicated that these two partial cDNAs are expressed under ethylene treatment. These genes had similarity with their homologus genes from several species of the *Rosaceae* family.
Keywords: Damask rose, Ethylene, Gene isolation, *PIP*, *TIP*.