شناسایی برخی از ژن های بیان شده تحت تیمار اتیلن در رز مینیاتوری با استفاده از روش Differential display-PCR

نوراله احمدی (۱)، هایکو میبوس (۲)، مارگارت سرک (۲)

۱- عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس ۲- انستیتوی گیاهان زینتی، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه لایبنیز هانوفر آلمان

اتیلن از جمله هورمون های گیاهی است که نقش شایانی را در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه ایفاء می نماید. اتیلن همچنین بعنوان عامل تسریع پیری و ریزش اندام ها، وظیفه مهمی را در مرحله پس از برداشت و بازاررسانی گیاهان زینتی بازی می نماید. مهم ترین اثرات نامطلوب اتیلن در رز، پیری زودرس و ریزش اندام هایی نظیر برگ، جوانه ها و گل می باشند. با استفاده از روش Differential display-PCR، پنج cDNAs که در رز مینیاتوری تحت تیمار اتیلن بیان شده بودند، شناسایی و جداسازی گردیدند. برای اولین بار جداسازی همسان ژن Laccase تحت تیمار اتیلن در این مطالعه گزارش گردید. این ژن در رز، یک پروتئین ۵۷۳ اسید آمینه ای که دارای سه ناحیه اکسیداز مس است. تجزیه و تحلیل بلات سادرن نشان داد که این ژن متعلق به یک خانواده چند ژنی است. مقایسه بیان نسبی نشان داد که این ژن بیشترین بیان را در مناطق ریزش گل و برگ و کمترین بیان را در پهنک برگ و دمبرگ دارد. این احتمال داده می شود که این ژن ممکن است نقشی در ریزش گل و برگ داشته باشد.

مقدمه:

هورمون اتیلن بعنوان یک هیدروکربن، در مقادیر بسیار ناچیز، اثرات عمده ای در فرایندهای مختلف رشد و نموی گیاه دارد. فرایندهایی چون جوانه زنی بذر، خمش برگ، تعیین یا تغییر جنسیت اندام زایشی، رسیدن میوه، پیری و ریزش اندامها عمدتا تحت تاثیر اتیلن می باشند. از نقطه نظر تجاری، اثرات نامطلوب اتیلن در زرد شدن ، پیری و ریزش برگ، ریزش گل و گلبرگ سبب کاهش کیفیت رزهای مینیاتوری میگردد. اتیلن چه بصورت تولید درون گیاهی و چه تولید توسط عوامل صنعتی نظیر سوختهای فسیلی، دود سیگار و مواد پلاستیکی سبب بروز عوارض ذکر شده و نتیجتا باعث کاهش طول عمر رز گلدانی و یا شاخه بریده میشود (Serek 1993, Serek and Andersen 1993).

بطور کلی ارقام رز و بویژه رزهای مینیاتوری نسبت به اتیلن واکنشهای متفاوتی را نشان میدهند. برای مثال رقم وانیلا نسبتا متحمل و رقم لاوندر حساس به اتیلن گزارش گردیده اند. (Müller et al 1998, Buanong *et al*., 2005)

اتیلن توسط خانواده ای از رسپتورها که عملکردی شبیه هیستیدین کاینیز دو بخشی باکتریایی دارند، جذب میشود. این دریافت اتیلن سبب غیر فعال شدن CTR و فعال شدن تنظیم کننده مثبت EIN2 میگردد. EIN2 سیگنال لازم را به EIN3 ، خانواده ای از فاکتورهای ترانسکریپشن، در پایین دست میفرستد. EIN3 به پروموتور ژن ERF1 متصل میشود و سبب فعال شدن نسخه نویسی آن دریک فرایند وابسته به اتیلن میگردد. فاکتورهای ترانسکریپشن ERF1 و EREBPs میتوانند با جعبه GCC در پروموتور ژنهای مورد نظر عکس العمل نشان داده و واکنشهای پایین دستی مرتبط با اتیلن را فعال می سازند.

هدف از این آزمایش، شناسایی ژنهای بیان شده تحت تیمار اتیلن در رز مینیاتوری با روش Differential display-PCR میباشد. این تکنیک بعنوان روشی ساده و سریع در جداسازی ژنها بوسیله لیانگ و پاردی معرفی گردیده است (Liang and Pardee 1992).

مواد و روش ها:

در این آزمایش، رز مینیاتوری رقم لاوندر با اتیلن به غلظت ۱,۵ میکروگرم بر لیتر بمدت ۷۲ ساعت تیمار گردید. از نمونه های دمگل، دمبرگ، پهنک برگ، منطقه ریزش برگ و گل و گلبرگ، RNA استخراج گردید. پس از خالص سالص سازی RNA و ارزیابی کیفیت آن، با انجام ترانسکریپتاز وارونه با استفاده از ۱۲ پرایمر ، یک کتابخانه cDNAs ایجاد گردید. با بکارگیری ۲۶ پرایمر تصادفی differential display- PCR انجام گردید.

نسبت بیان ژنهای جدا شده تحت تیمار اتیلن و کنترل بوسیله Real-time PCR ارزیابی گردید. جداسازی توالی کامل ژنLaccase با بکار گیری تکنیک RACE انجام پذیرفت. جهت انجام بلات سادرن، نمونه های DNA از رز دیپلوییدی و تتراپلوییدی استخراج گردید. عمل هضم بوسیله آنزیمهای محدود کننده EcoRI، EcoRV و XbaI انجام گردید.

نتایج و بحث

در این مطالعه با ترکیب ۳۱۲ جفت پرایمر، تقریبا ۱۹۱۰ باند بدست آمد که از این تعداد ۸۸ باند پلیمورفیک تحت اتیلن بیان گردیدند. پس از تکرار واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون، تعداد باندهای پلیمورفیک به ۱۷ باند تقلیل پیدا کرد. از این تعداد، ۷ باند هیچگونه مشابهتی با توالیهای موجود در پایگاه داده ها نشان ندادند. توالیهای ۵ باند با ژنهایی از باکتریها و ویروسها مشابهت نشان دادند. ۵ باند باقیمانده دارای همولوگهایی از نوع ترانسکریپتور فاکتور و یا ژن های تولید کننده Laccase و Trehalose نشان دادند. از میان این ۵ cDNAs ۲ تا از دم جوانه گل و ۳ تا از دمبرگ جداسازی گردید. الگوی بیان هر کدام از cDNAs جدا شده، با ساخت پرایمر اختصاصی از توالی نوکلئوتیدهایشان و با روش Real-time PCR ارزیابی گردید. بیان تمامی ژنها در دم جوانه گل تیمار شده با اتیلن بیش از دو برابر کنترل بودند. بطوریکه بیان cDNAs شماره ۵ و ۴ در تیمار اتیلن به ترتیب ۵۴ و ۱۵ برابر کنترل بودند. در دمگل به استثنای cDNA شماره ۵ که بیانی ۱۰ برابر نشان داد، بیان چهار cDNAs دیگر کمتر از ۲ برابر بودند. cDNA شماره ۵ که بیان بالایی را تحت تیمار اتیلن نشان داد برای ارزیابی بیشتر انتخاب شد. ارزیابی توالی cDNA شماره ۵ در بانک داده ها، بترتیب ۷۷٪ و ۵۱٪ مشابهت با ژن Laccase در ذرت و آرابیدوپسیس را نشان داد. این قطعه cDNA که حاوی ۴۴۷ جفت باز بود، اصطلاحا *Rosa hybrid* Laccase (RhLAC) نامگذاری گردید. با روش RACE تمام توالی این ژن جدا سازی گردید. کل توالی حاوی ۲۰۰۵ جفت باز بود که یک پلی پپتید حدودا ۶۳ کیلو دالتونی را به رمز درمیاورد. سه ناحیه از خانواده اکسیداز مس در توالی ۵۷۳ اسید آمینه ای این ژن تشخیص داده شده است.

بلات سادرن و تجزیه DNA نشان داد که RhLAC بوسیله کپیهایی چند ژنی به رمز در میاید. هضم DNA بوسیله آنزیم EcoRI منتج به ارائه الگوی پیچیده ای شامل ۱۲ و ۱۰ باند جفت شده بترتیب در رز تتراپلوییدی و دیپلوییدی گردید. چنین الگوی مشابهی با دیگر آنزیمهای هضم نیز مشاهده گردید. بطور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان دادند که ژن Laccase از یک خانواده چند کپی میباشد.

بالاترین میزان بیان این ژن بترتیب در منطقه ریزش برگ، منطقه جوانه گل و گلبرگ بدست آمد. کمترین میزان بیان در پهنک برگ و دمبرگ و دم جوانه گل ثبت گردید. میزان بیان ژنLaccase در بخشهای مختلف برگ متفاوت بود بطوریکه شیب افزایشی بیان از پهنک برگ تا دمگل و منطقه ریزش مشاهده گردید.

بطور خلاصه، پنج قطعه cDNAs تحت تیمار اتیلن بوسیله differential display- PCR و طول کامل ژن Laccase با تکنیک RACE جدا سازی گردیدند. این احتمال وجود دارد که این ژن نقشی در فرایند ریزش اندامها در گیاه بازی کند.

منابع:

Buanong, M., Mibus, H., Sisler, E. and Serek, M. (2005). Efficacy of new inhibitors of ethylene perception in improvement of display quality of miniature potted roses (*Rosa hybrida* L.) Plant Growth Regul. 47: 29-38.

Müller, R., Andersen, A. and Serek, M. (1998). Differences in display life of miniature potted roses (*Rosa hybrida* L.). Scientia Horticulturae 76: 59-71.

Serek, M., (1993). Ethephon and silver thiosulfate affect postharvest characteristics of *Rosa hybrida* 'Victory Parade'. HortScience 28: 199-200.

Serek, M. and Andersen, A.S., (1993). AOA and BA influence on floral development and longevity of potted Victory Parade miniature rose. HortScience 28: 1039-1040.

Using differential display- PCR to isolate ethylene-responsive cDNAs in miniature roses (*Rosa hybrida*)

Noorollah Ahmadi, Heiko Mibus, Margrethe Serek

Abstract

Plant hormone ethylene, at trace amount regulates many physiological and developmental processes from seed germination to senescence. The effects of ethylene on display quality of ornamental plants are important. The most deteriorating effects on miniature rose quality appear as leaf yellowing and abscission, petal and flower wilting and abscission.

Five ethylene-induced cDNAs were isolated from miniature roses by applying differential display-PCR, three cDNAs from petioles and two cDNAs from pedicels. For the first time, a putative ethylene-responsive cDNA homologous to a laccase gene was identified. The differential expression level of these cDNAs was assayed in various tissues of non- and ethylene treated miniature roses. All cDNAs showed higher expression level in pedicels than petioles. The laccase homolog cDNA, termed RhLAC, encodes for a 573-amino-acid protein containing three conserved domains characteristics of the, multicopper oxidase family. Southern blot analysis showed that there are multiple copies of the RhLAC gene in roses. This study suggests that RhLAC gene may role in senescence and abscission in roses.