اولین همایش یافته‌های نوین در محیط زیست و اکوسیستم‌های کشاورزی
برگزارکننده: دانشگاه تهران، پژوهشکده انرژی‌های نو و محیط زیست
پایگاه اینترنتی همایش: AgroCongress.ir

روند بیان ژن های *CLsHSP18.1A* و *CcNAC2* در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس هندوانه آجیلی (*Citrullus lanatus*) به تنش خشکی با استفاده از روش نیمه کمی RT-PCR

زهرا السادات قائمی راد[۱]، سعید رضا وصال[۲]، ناد علی بابائیان جلودار[۳]، ناد علی باقری[۳]

۱- دانشجوی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه ساری (Z.ghaemi1367@yahoo.com)

۲- عضو هیأت علمی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- عضو هیأت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه ساری

چکیده

تنش خشکی مهمترین عامل کاهش تولید محصولات گیاهی در اکثر نقاط دنیا می‌باشد که سبب کاهش رشد گیاه از طریق تغییر فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاه می‌شود. در پاسخ به تنش خشکی مجموعه‌ای از ژن‌ها با الگوهای مختلف القا یا خاموش می‌شوند. از ژن‌های کلیدی پاسخ دهنده به این تنش در گیاهان *CLsHSP18.1A* و *CcNAC2* می‌باشند که در این آزمایش روند بیان آن‌ها در زمان‌های مختلف پس از قطع آبیاری در دو ژنوتیپ متحمل و حساس هندوانه بذری شامل C6 و C12 با سه تکرار به **روش نیمه کمی** RT-PCR اندازه گیری شد. در ژنوتیپ C6، چهار روز تنش خشکی باعث افزایش ۲/۵ برابری و معنی دار ژن *sHSP* نسبت به شاهد شد ($p \leq$ ۰/۰۵) و در ژنوتیپ حساس ۱/٤ برابر نسبت به شاهد بیان این ژن افزایش نشان داد. سنجش نیمه کمی ژن *NAC* در ژنوتیپ C6 بیانگر بیشترین افزایش(۱/۲۵ برابری نسبت به شاهد) بود که دو روز پس از تنش مشاهده شد. نمونه گیری سوم در چهار روز پس از تنش بیانگر کاهش معنی دار بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ بود به طوری که در ژنوتیپ حساس C12 نسبت به شاهد تفاوت معنی دار مشاهده نشد. از سوی دیگر در مورد هر دو ژن، ژنوتیپ C6 بیان بسیار بیشتری نسبت به ژنوتیپ حساس C12 داشته است که در تمام تیمارهای خشکی این تفاوت معنی دار بود. به این ترتیب، روند کلی بیانگر افزایش معنی داری بیان هر دو ژن در پاسخ به تنش خشکی بود.

کلمات کلیدی: بیان ژن، خشکی، هندوانه آجیلی، *CLsHSP18.1A* و *CcNAC2*.

مقدمه

تنش‌های غیرزیستی و زیستی سالانه منجر به افت شدید عملکرد محصولات کشاورزی می‌شوند که سهم هر کدام به ترتیب حدود ۷۰ درصد و ۳۰ درصد برآورد شده‌است. در این میان، تنش خشکی با اهمیت‌تر از سایر تنش های غیر زیستی گزارش شده است (حسین، ۲۰۰٦). تنش خشکی تاثیر معنی داری بر صفات مورفولوژیکی گیاه از جمله طول ساقه و ریشه، وزن خشک ساقه و ریشه داشته که حاصل از تغییرات در تجمع محصولات بیوشیمایی و بیان ژن است (منصاح و همکاران، ۲۰۰۹).

گیاهان اغلب در سطح مولکولی و سلولی به کمبود آب پاسخ می‌دهند و مجموعه‌ای از ژن‌ها با الگوهای مختلف القا یا خاموش می‌شوند (بارتلز و همکاران، ۲۰۰۵؛ شینوزاکی و همکاران، ۲۰۰۷). اگرچه استفاده از روش‌هایی چون میکروواری (ریزارایه) و شناسایی و فهرست نمودن پروتئین‌ها، اطلاعات انبوهی در مورد بیان ژن‌های متاثر از تنش را به دنبال داشته است (مومنی و همکاران، ۱۳۸۹) اما آنالیز انفرادی این ژن‌ها برای اثبات صحت این اطلاعات لازم می‌باشد. گذشته از آن اغلب اطلاعات مربوط به بیان ژن‌ها در گیاهان در پاسخ به خشکی، از مطالعه بر روی گیاهان مدل چون آرابیدوپسیس بدست آمده است که نمی‌تواند الزاما در مورد سایر گیاهان صادق باشد (جاین و چاتوپادهای، ۲۰۱۰). لذا می‌توان با ارزیابی نیمه کمی بیان ژن‌های منتخب و مرتبط با خشکی در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس در هندوانه، مقدمات شناسایی ژن‌های تاثیرگذار و کلیدی در ایجاد گیاهان تراریخت متحمل به خشکی را فراهم نمود..

در این راستا توجه کمتری به گیاه هندوانه آجیلی (*Citrullus lanatus*) شده است که نیازمند بررسی‌های بیشتر موردی و دقیق‌تر بیان ژن‌های کلیدی آن در پاسخ به تنش خشکی می‌باشد. یکی از ژن‌های کلیدی و موثر در تحمل به تنش خشکی در این گیاه *CLsHSP18.1A* می‌باشد که از ژن‌های کلیدی کد کننده پروتئین‌های کوچک شوک حرارتی می باشد. آکاشی و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی پروتئوم هندوانه وحشی در شرایط تنش خشکی افزایش معنی دار بیان ۲۳ پروتئین را شناسایی کردند که ٦٥٪ آن ها پروتئین‌های شوک حرارتی بودند. آنالیز کمی چند ژن کلیدی با استفاده از تکنیک real-time PCR، تائید کننده افزایش بیان ژن *sHSP* در پاسخ به سه روز تنش خشکی در این بررسی بود.

بیان دو مورد از عوامل رونویسی *CcNAC2* در *Citrullus colocynthis* در پاسخ به چندین تنش مختلف توسط وانگ و همکاران در سال ۲۰۱٤ ارزیابی شد. این عوامل رونویسی نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان و همچنین پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارند. تنش‌های مختلفی مانند خشکی، شوری، زخم، آبسزیک اسید و دیگر هورمون‌ها باعث افزایش معنی دار هر دو ژن شدند. وانگ و همکاران تنش خشکی را با استفاده از PEG اعمال کردند که بیشترین افزایش در تظاهر ژن *NAC* پس از ۲٤ ساعت مشاهده شد (وانگ و همکاران، ۲۰۱٤). هدف از این مطالعه، بررسی نیمه کمی روند بیان ژن‌های کلیدی *sHSP* و *NAC* در دو نمونه متحمل و حساس هندوانه به ترتیب شامل C6 و C12 در پاسخ به تنش خشکی می‌باشد.

مواد و روش ها

در این بررسی دو ژنوتیپ متحمل و حساس هندوانه به خشکی شامل C6 و C12 بر اساس ارزیابی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی اولیه در آزمایش‌های پیشین (داده‌ها در حال انتشار)، انتخاب گردید. روند بیان ژن‌های *sHSP* و *NAC* نسبت به ژن خانه دار *Actin 154* با استفاده از روش نیمه کمی RT-PCR با سه تکرار بررسی شد و توسط نرم افزار TotalLab مقدار کمی بیان هر ژن در زمان‌های صفر (شاهد) دو و چهار روز پس از تنش خشکی محاسبه گردید.

ابتدا بذرها شستشو و سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، در شرایط مرطوب و استریل در ژرمیناتور جوانه دار شدند. بذرهایی که به صورت یکسان جوانه زده بودند در گلدان‌های محتوی ۲ کیلوگرم مخلوطی از خاک–ماسه–خاکبرگ به نسبت ۱:۱:۱ کاشته شد و به صورت کاملاً یکسان هر ٤٨ ساعت یکبار آبیاری شد و در گلخانه رشد یافتند. سه هفته پس از کاشت، تیمار تنش خشکی به صورت قطع آبیاری انجام شد و در زمان های شروع تنش (شاهد)، ۲ و ٤ روز پس از شروع تنش نمونه گیری‌ها انجام شده و در دمای ۷۰– درجه سلسیوس نگهداری شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام گردید.

استخراج RNA با استفاده از روش های مختلفی بررسی و در نهایت کیت ستونی Total RNA Extraction Kit (تکاپوزیست، تهران) بالاترین کیفیت و کمیت استخراج را در پی داشت. در ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت اندام هوایی تازه، توسط هاون عاری از RNase به خوبی ساییده شد. پس از آن بافت پودر شده سریعاً به لوله‌های ۱/۵ میلی لیتری انتقال یافت و ۳۰۰ میکرولیتر بافر Lysis به آن افزوده شد. پس از ورتکس شدید به مدت ۱۵–۳۰ ثانیه و ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ، ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول اضافه و در دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه مجدداً سانتریفیوژ گردید. پس از افزودن ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به محلول رویی، به ستون spin منتقل و سانتریفیوژ شد. پس از شستشو با بافرهای اولیه و ثانویه و سپس اتانول ۷۰٪، RNA استخراج شده بدست آمد. به منظور حصول RNA خالص، ۱۰ ماکرولیتر از RNA های استخراج شده با استفاده از آنزیم DNase شرکت فرمنتاز تیمار شده و سپس در دمای ۷۰– درجه سانتی گراد نگهداری شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ تایید شده و غلظت آن توسط نانودراپ (مدل دستگاه Thermo Scientific) اندازه گیری شد.

رشته مکمل (cDNA) برای ۵ میکرولیتر RNA در هر نمونه، با استفاده از کیت 2-steps RT-PCR Kit (سیناکلون، تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده و آنزیم M-Mulv، سنتز شد. شرایط واکنش زنجیره ای پلی مراز بر اساس جدول ۱ انجام شد و توالی آغازگرها در جدول ۲ فهرست شده است.

جدول ۱: شرایط دمایی، زمان و تعداد چرخه‌های واکنش PCR در مراحل مختلف تکثیر.

مراحل	دما و زمان مورد استفاده	تعداد چرخه
واسرشت سازی اولیه	۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه	۱
واسرشت سازی	۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ ثانیه	۳۵
اتصال آغازگرها (برای *Actin* و *NAC*)	٤۸ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه	
اتصال آغازگرها (برای *sHSP*)	۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه	
بسط	۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه	
بسط نهایی	۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه	۱

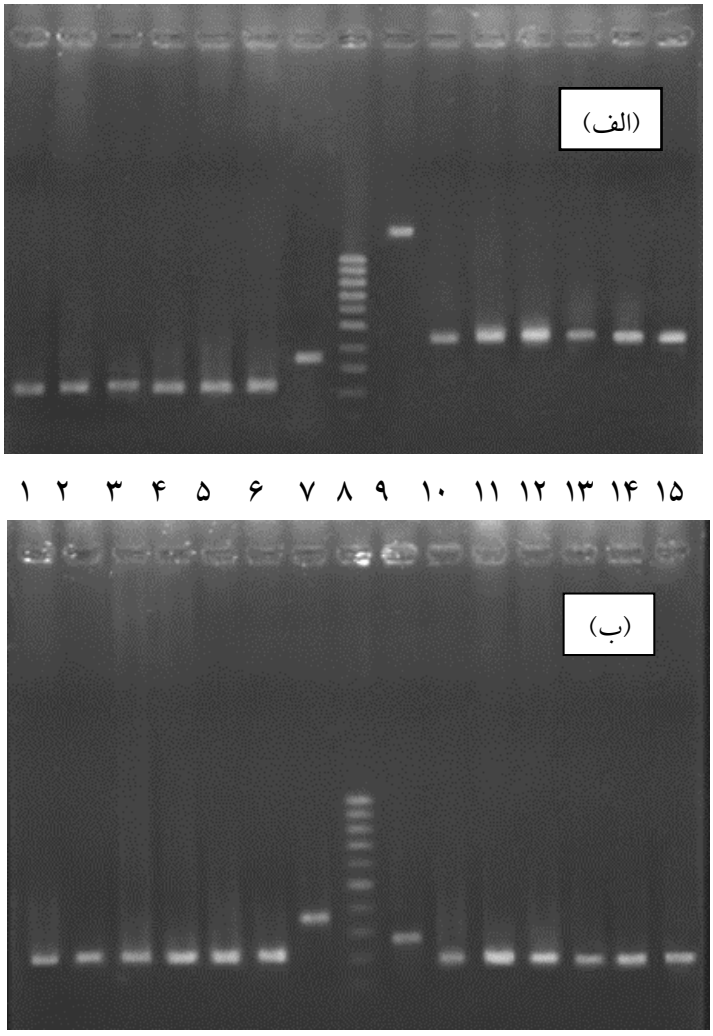
جدول ۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده به منظور تکثیر ژن های *CcActin 154*، *CLsHSP18.1A* و *CcNAC2*.

نام آغازگر	جهت	توالی آغازگر
CLsHSP18.1A-F	Forward	5□GCAACACTCTGCCTTCTTCC 3□
CLsHSP18.1A-R	Reverse	5□GCATCGACTGGAAAGAGACC 3□
CcNAC2-F	Forward	5□GTGCCGGATTTACAACAAGAA 3□
CcNAC2-R	Revese	5□AATCTTCGGCTTCTCGCTTC 3□
CcActin 154-F	Forward	5□CACCATCACCAGAATCCAGCACGA 3□
CcActin 154-R	Revese	5□GGCTCCACTCAACCCAAAGGCTAAC 3□

در انتها محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد تفکیک شدند تا از تکثیر اختصاصی ژن‌ها با اندازه مورد نظر اطم ینان حاصل گردد. برای این منظور ٤ میکرولیتر از هر نمونه، ۲ میکرولیتر گرین ویوور و ۱میکرولیتر لودینگ بافر در هر چاهک قرار داده شد و به مدت ۵۰ دقیقه در ولتاژ ۸٦ ولت الکتروفورز شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه سطوح بیان ژن کاندید مورد نظر در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس گیاه هندوانه پس از گذشت زمان‌های معین از تنش بررسی شد. بیان ژن *Actin* در زمان‌های مختلف پس از تنش تغییرات زیادی نشان نداد، بنابراین این ژن می تواند کنترل داخلی مناسبی برای آزمایش RT-PCR باشد (شکل ۱- الف و ب). نتایج حاصل حاکی از طراحی صحیح آغازگرها و تکثیر اختصاصی ژن مورد نظر بود و هیچ باند اضافه ای دیده نشد. در نمونه های کنترل مثبت و کنترل منفی نیز هیچ گونه باند



شکل ۱: بیان ژن‌های (الف) *sHSP* و (ب) *NAC* تحت تنش خشکی در دو ژنوتیپ متحمل (C6) و حساس (C12) هندوانه.

چاهک‌های شماره ۱ تا ٦: ژن خانه دار اکتین در C6 (۱ تا ۳) و در C12 (٤ تا ٦).

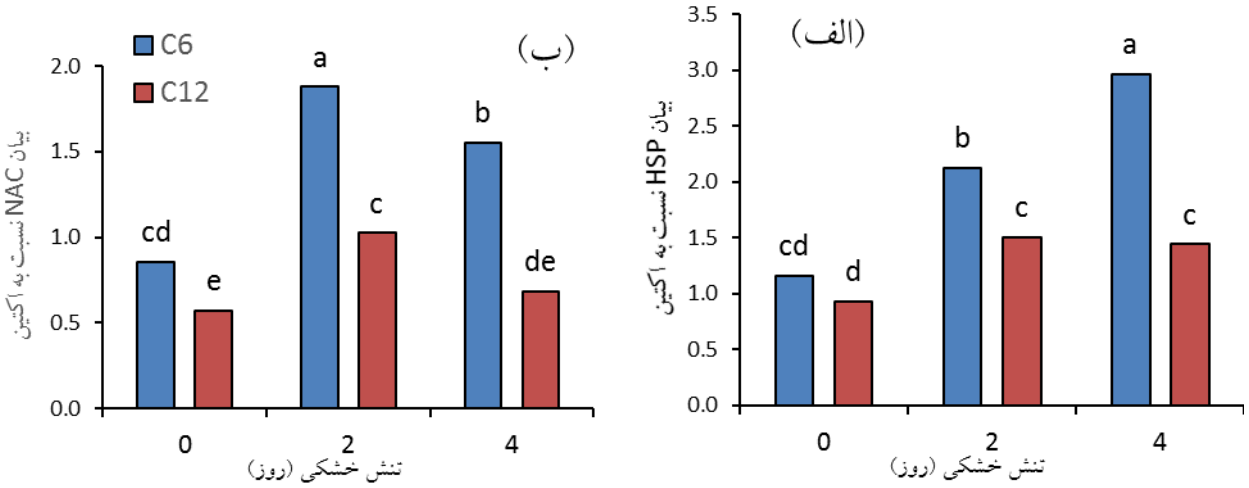
چاهک‌های ۷ تا ۹: کنترل مثبت (استفاده از DNA به عنوان الگو در PCR) برای ژن‌های اکتین (۷) و ژن مورد نظر (۹) و سایز مارکر مولکولی (۸).

چاهک‌های ۱۰ تا ۱۵: بیان نیمه کمی ژن مورد نظر در زمان های شاهد، ۲ و ٤ روز بعد از تنش خشکی در ژنوتیپ‌های C6 (چاهک‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲) و در ژنوتیپ‌های C6 (چاهک‌های ۱۳، ١٤ و ۱۵).

اضافه ای مشاهده نشد.

تجزیه تحلیل بیان ژن‌های مذکور نشان داد که هر کدام از ژنوتیپ‌ها پاسخ متفاوتی به تنش خشکی نشان می‌دهند (شکل ۲). ژن کد کننده پروتئین‌های شوک حرارتی در ژنوتیپ متحمل هنداونه (C6) بر اثر تنش خشکی افزایش معنی داری نسبت به

شاهد نشان داد (p ã ۰/۰۵)، به طوری که با ادامه روند تنش خشکی این افزایش ادامه داشت. از سوی دیگر بیان این ژن در ژنوتیپ حساس به خشکی در هندوانه (C12) افزایش معنی داری پس از دو روز خشکی داشته و در چهار روز تنش تقریبا بدون تغییر باقی ماند است. در مقایسه با ژنوتیپ متحمل که در تیمار چهار روز تنش خشکی افزایش ۲/۵ برابری نسبت به شاهد داشت، ژنوتیپ حساس ۱/٤ برابر نسبت به شاهد افزایش بیان داشت (شکل ۲–الف). منطبق با یافته‌های این بررسی، در مطالعه آکاشی و همکاران (۲۰۱۱) نیز بیان ژن *sHSP* در پاسخ به سه روز تنش خشکی در هندوانه وحشی افزایش معنی داری نشان داد.



شکل ۲: بیان ژن‌های (الف) *CLsHSP18.1A* و (ب) *CcNAC2* در ژنوتیپ‌های متحمل (C6) و حساس (C12) هندوانه بذری در پاسخ به صفر، دو و چهار روز تنش خشکی.

نتایج آزمون RT-PCR و آنالیز نیمه کمی بیان ژن *NAC* نشان می‌دهد که بیان این ژن دو روز پس از تنش خشکی به بیشترین میزان خود می‌رسد که این خود می تواند ناشی از آغاز حد بحرانی تنش آبی در گیاه باشد. در هر سه نمونه گیری، بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل C6 به صورت معنی داری بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (p ã ۰/۰۵). ژنوتیپ C6 با ۱/۲۵ برابر افزایش معنی دار نسبت به شاهد بیشترین افزایش بیان را در دو روز پس از تنش داشت. نمونه گیری سوم در چهار روز پس از تنش بیانگر کاهش معنی دار بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ می‌باشد به طوری که در ژنوتیپ حساس C12 نسبت به شاهد تفاوت معنی دار مشاهده نشد (شکل ۲–ب). منطبق با گزارش‌های موجود، تغییرات در تظاهر ژن *NAC* در هندوانه در ابتدا کم بوده و با گذشت زمان در ۲٤ ساعت پس از تنش خشکی به بیشترین میزان خود رسیده است (وانگ و همکاران، ۲۰۱٤).

با مقایسه تغییرات بیان در ژن‌های *sHSP* و *NAC* مشخص می‌شود که میزان تغییرات بیان ژن *sHSP* به صورت معنی داری بیشتر از دیگری بوده و با ادامه تنش خشکی، روند افزایشی بیان را ادامه داده است. از سوی دیگر در مورد هر دو ژن، ژنوتیپ C6 بیان بسیار بیشتری نسبت به ژنوتیپ حساس C12 داشته است که در تمام تیمارهای خشکی این تفاوت معنی دار بود (شکل ۲).

منابع

۱. **مومنی، ن. و شکوهی فر، ف. (۱۳۸۹).** فینگر پرینت DNA تعدادی از ارقام خربزه ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR. دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران. دانشگاه فردوسی مشهد.

2. **Akashi, K., Yoshida, K., Kuwano, M., Kajikawa, M., Yoshimura, K., Hoshiyasu, S., Inagaki, N., and Yokota, A. 2011**. Dynamic changes in the leaf proteome of a C3 xerophyte, Citrullus lanatus (wild watermelon), in response to water deficit. Planta 233, 947-960.

3. **Bartlez, N. Danin-Poleg, Y. Tzuri, G.Karchi, Z. Lavi, U. Cregan, P.B. 2005.** Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Curcubitaceae species. ت Theoretical and Applied Genetics.93(8): 1282-1290.

4. **Chain, M., and Chaobad. 2010.** Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melon*.). Theoretical and applied Genetics. 110: 802-811.

5. **Hussain, S.S. 2006.** Molecular breeding for abiotic stress tolerance: drought perspective. Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences 43, 189-210.

6. **Mensah, J., Obadoni, B., Eruotor, P., and Onome-Irieguna, F. 2009.** Simulated flooding and drought effects on germination, growth, and yield parameters of sesame (*Sesamum indicum* L.). African Journal of Biotechnology 5, 1249-1253.

7. **Shinozaki,. k and Yamaguchi-Shinozaki, k. 2007.** Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Jornal of Experimental Botany, 58. 221-227.

8. **Wang, Z., Rashotte, A.M., Moss, A.G., and Dane, F. 2014**. Two NAC transcription factors from Citrullus colocynthis, CcNAC1, CcNAC2 implicated in multiple stress responses. Acta Physiologiae Plantarum 36, 621-634.

اولین همایش یافته‌های نوین در محیط زیست و اکوسیستم‌های کشاورزی
برگزارکننده: دانشگاه تهران، پژوهشکده انرژی‌های نو و محیط زیست
پایگاه اینترنتی همایش: AgroCongress.ir

Gene express changes for *CLsHSP18.1A* and *CcNAC2* in tolerant and sensitive genotypes of seeded watermelon (*Citrullus lanatus*) in response to drought stress using semi-quantification RT-PCR

Ghaemi, Z.[1], S. Vessal[2], N. Babaean Jelodar[3] and N. Bagheri[3]

[1.] Master student in Agricultural Biotechnology

[2.] Academic member of Ferdowsi University of Mashhad, Research Center for Plant Sciences

[3.] Academic members of Agricultural and Natural Resources University of Sari.

Abstract

Drought stress is the most important factor in reducing the production of vegetable crops in many parts of the world, influencing plant growth through changes of physiological, biochemical and molecular processes. In response to drought stress, a set of genes with different patterns are induced or silence. *CLsHSP18.1A* and NAC are critical genes in responding to stress in plants that their expression were measured with three replications in the current study. The results indicated a significant increase of expression in both genes in response to drought stress. In C6, four days of drought stress caused 2.5 fold increase of *sHSP18.1A* compared to control (p ã 0.05), but in the susceptible C12, the expression decreased 1.4 fold compared to control. Semi-quantitative measurement of *CcNAC2* gene in C6 represents the highest increase (1.25-fold relative to controls) after two days of stress. Third sampling in four days after stress showed significant decrease in the expression of this gene in both genotypes; however, there was not a significant expression difference in susceptible C12 compared to control. On the other hand, both genes had more express with significant difference in C6 compared to C12.

Keywords: *CLsHSP18.1A* and *CcNAC2*, Drought, Edible seeded watermelon, Gene expression.