تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد پانزدهم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۱

http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.3815.1920

مقاله پژوهشی

شناسایی مسیرها و ژن‌های دارای بیان افتراقی پس از تنش سرما در نیشکر، با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و آنالیز RNA-seq

محمود فولادوند[۱]، آسا ابراهیمی[۱*]، مهدی رهایی[۲]، وحید شریعتی جونی[۳]

۱. گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی مولکولی گیاهی، پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
نیشکر
تنش سرما
پرولین
مالون دی‌آلدئید
بیان افتراقی ژن‌ها

تاریخ دریافت:
۱۳۹۹/۰۷/۲۷

تاریخ پذیرش:
۱۳۹۹/۰۹/۱۹

تاریخ انتشار:
تابستان ۱۴۰۱

۱۵(۲): ۵۴۱-۵۵۰

چکیده

با توجه به حساسیت نیشکر به سرما، به‌منظور شناسایی مسیرها و ژن‌های دارای بیان افتراقی در ارقام نیشکر در هنگام تنش سرما و استفاده از آن‌ها در برنامه اصلاح نبات نیشکر، پس از وقوع سرمای ۱/۲ ^{o}C- در دی‌ماه ۱۳۹۴، تعداد ۴۵۴ رقم نیشکر با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و آنالیز RNA-seq، در مزرعه تحقیقاتی موسسه تحقیقات نیشکر خوزستان موردبررسی قرار گرفت. در مرحله اول با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی، ارقام متحمل و حساس در برابر سرما، انتخاب شدند. در مرحله دوم در سال ۱۳۹۵، پس از تنش سرما، شاخص‌های بیوشیمیایی از قبیل پرولین[۱] و مالون دی‌آلدئید[۲]، در ارقام متحمل افزایش بیشتری پیدا کرد و بر این اساس دو رقم BR00-01 و TUC66-107 به ترتیب به‌عنوان متحمل‌ترین و حساس‌ترین رقم نسبت به سرما شناسایی شدند. سپس این ارقام در سردخانه تحت تنش دمای ۲ ^{o}C- به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. در مرحله سوم، استخراج RNA، توالی‌یابی به روش RNA-seq و ساخت کتابخانه cDNA انجام گردید. سپس آنالیز بیان و تفسیر ژن‌های دارای بیان افتراقی انجام گردید. نتایج بررسی واکنش مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ارقام نیشکر به تنش سرما نشان داد ارقامی که در مرحله مورفولوژیکی میزان تحمل بیشتری به تنش سرما دارند، همین ارقام در مرحله بررسی بیوشیمیایی نیز ازنظر میزان پرولین و MDA در سطح بالاتری نسبت به ارقام حساس قرار می‌گیرند. در بررسی مولکولی نیز در هنگام تنش سرما، مسیرهای بیوسنتز فعال شامل بیوسنتز آرژنین، اسیدهای آمینه پرولین، فنیل پروپانوئید، ریبوفلاوین و مسیر پیام‌رسان MAPK شناسایی شدند که در هنگام تنش سرما، بیان ژن‌های تنظیم‌کننده آن‌ها، در رقم مقاوم افزایش بیان بیشتری نسبت به رقم حساس داشت. همچنین ژن PR_1 در مسیر پیام‌رسان MAPK شناسایی گردید که با کاهش دما، در رقم مقاوم افزایش بیان بیشتری نسبت به رقم حساس از خود نشان داد.

مقدمه

تنش‌های غیرزنده محدودیت‌های عمده‌ای برای حداکثر بهره‌وری محصول در مناطق مختلف آب و هوایی ایجاد می‌کنند. مشخص شده است که ژن‌های ناشی از تنش سرما در تنش آبی نیز بیان می‌شوند و بالعکس (Baker, 1994). بعلاوه، ارتباط متقابل بین ژن‌های مسئول پاسخ به تنش‌هایی مانند خشکی، شوری و سرما گزارش شده است (Shinozaki, 2003; Yamaguchi-Shinozaki, 2006). درک سازوکار ژنتیکی واکنش گیاه نسبت به تنش‌های غیرزیستی، برای فائق آمدن بهتر بر شرایط تنش تحمیل‌شده بر گونه‌های زراعی، ضروری است. بررسی وضعیت سرمازدگی مزارع نیشکر طی یک دوره ۳۸ ساله، در هفت‌تپه نشان داد، هنگامی‌که درجه حرارت هوا تا حدود صفر درجه سلسیوس

[1]. Proline
[2]. Malone Di Aldehid= MDA

* نگارنده پاسخگو: آسا ابراهیمی. پست الکترونیک: dr.asaebrahimi@gmail.com

تنزل پیدا کند، علائم ظاهری اثر سرما بر روی نیشکر ظاهر می‌شود و در این صورت، برگ ارقام حساس به سرما، به رنگ بنفش درآمده، که دلیل بر ظاهر شدن مواد رنگی آنتوسیانین[1] است (Taherkhani et al. 2010). در روند طبیعی سرما، صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاه نیشکر به علت تنش سرما تغییر می‌کند.

پرولین[2] نقش مهمی در حفاظت ساختار سلولی، حمل‌ونقل و تنظیم اسمزی در سلول‌ها دارد. به همین دلیل در تقویت ظرفیت نگهداری آب گیاهان و محافظت از بافت گیاه در برابر آسیب‌های تنش سرما کمک می‌کند. افزایش میزان پرولین در گیاهان به‌منظور مقاومت در برابر تنش‌های محیطی دیده شده است (Li et al., 2013). مالون‌دی‌آلدئید یکی از محصولات پراکسیداسیون چربی غشایی است که محتوی آن می‌تواند درجه پراکسیداسیون چربی غشای سلولی و میزان آسیب در سلول را نشان دهد (Kim et al., 2001). تحت تنش دمایی پایین، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیشتر از یک حد معین در نیشکر باعث پراکسیداسیون چربی غشایی می‌شود که آن‌هم باعث تجمع MDA می‌شود. زمانی که درجه حرارت محیط کاهش پیدا می‌کند، پراکسیداسیون چربی غشایی در سلول‌های برگ نیشکر شدت پیدا می‌کند و باعث افزایش محتوای MDA می‌شود (Mc Cormick, 2006).

آنالیز ترانسکریپتوم رقم هیبرید CP72-1210 (حساس به سرما) و رقم وحشی TUS05-05 (متحمل به سرما) با استفاده از توالی‌های اسمبل شده نیشکر (SAS) از بانک اطلاعات SUCEST-FUN نشان داد که در کل، ۳۵۳۴۰ توالی اسمبل شده، قبل از تنش سرما و ۳۴۶۹۸ توالی سرهم شده، پس از تنش سرما، بیان‌شده‌اند. آنالیزها نشان داد که بیان بیش از ۶۰۰ ژن پس از بروز تنش سرما، در هر ژنوتیپ متفاوت است. حاشیه‌نویسی Blast2Go نشان داد که تفاوت عمده‌ای در پروفایل‌های بیان ژن، بین CP72-1210 و TUS05-05 پس از تنش سرما، در ژن‌های مربوط به فعالیت ناقلین غشایی، وجود دارد (YutingYang et al., 2018). با توجه به وقوع سرمای کمتر از صفر درجه سلسیوس در دی‌ماه و ایجاد خسارت به ارقام حساس نیشکر و جهت تولید و معرفی ارقام مناسب دشت خوزستان، بررسی عکس‌العمل ارقام مختلف نیشکر به تنش سرما، در برنامه اصلاحی نیشکر در خوزستان گنجانده شده است. در این راستا، به‌منظور بررسی عکس‌العمل ارقام مختلف نیشکر به سرما با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی، آزمایشی در دی‌ماه سال ۱۳۹۴، در موسسه تحقیقات نیشکر و صنایع جانبی خوزستان، شروع و طی سه سال، انجام گردید.

مواد و روش‌ها

بعد از وقوع سرمای ۱/۲ ^{o}C- در دی‌ماه ۱۳۹۴، تعداد ۴۵۴ رقم نیشکر که هرکدام دریک پلات به مساحت ۳۶m^2 دریکی از مزارع موسسه تحقیقات نیشکر خوزستان کشت شده بودند، با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی، موردبررسی قرار گرفتند. در این مرحله میزان خسارت به مریستم انتهایی، میزان کاهش سبزی برگ، میزان خشکیدگی کانوپی، میزان خسارت جوانه‌ها، میزان توسعه مغز[3] بعد از تنش سرما در همه ارقام اندازه‌گیری شد. بسته به میزان بروز این تغییرات در هر رقم، نمره‌ای به هر یک از ارقام داده شد، به‌طوری‌که به بروز حالت شدید، عدد ۳، حالت متوسط صفت، عدد ۲، حالت خفیف صفت، عدد ۱ و حالت بدون خسارت صفت، عدد صفر منتسب گردید. در ادامه نمرات کمی کسب‌شده توسط هر رقم در همه حالت‌ها باهم جمع و تحت عنوان «میزان حساسیت به سرما (C.T[4])» ثبت گردید (Taherkhani et al., 2010.). لذا این اعداد به‌عنوان معیار مقاومت یا حساسیت به سرما در مرحله مورفولوژیکی قرار گرفتند و بقیه اعداد نسبت به آن‌ها سنجیده و مرتب شدند (جدول ۱).

در ابتدا با استفاده از آزمون t، داده‌های حاصل از میانگین صفت «میزان تحمل سرما (C.T)» درکل ارقام، آنالیز و بر اساس آن تعداد ۵۴ رقم به‌عنوان ارقام مقاوم، به مرحله بعد راه پیدا کردند. این ارقام در شهریورماه ۱۳۹۵ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی کشت شدند. در دی‌ماه همان سال مجدداً کلیه ارقام ازنظر صفت «میزان تحمل سرما (C.T)» و طبق دستورالعمل مذکور در قدم نخست، موردبررسی و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه‌وتحلیل قرارگرفته و از بین ۵۴ رقم منتخب قدم نخست تعداد ۵ رقم مقاوم و ۵ رقم حساس انتخاب شدند. در مرحله دوم، از آبان ۱۳۹۵، در سه تاریخ ۱۴ آبان، ۲۶ آذر و ۱۷ دی‌ماه، مقدار شاخص‌های بیوشیمیایی پرولین و مالون دی‌آلدئید، در ۱۰ رقم منتخب مرحله قبل بر اساس دستورالعمل‌های موجود اندازه‌گیری شد.

[1]. Anthocyanin
[2]. Prolin
[3]. Pith
[4]. Cold tolerance

جهت اندازه‌گیری پرولین از روش بیتز و همکاران (Bates et al., 1973) و جهت اندازه‌گیری MDA از روش والنتوویک و همکاران (Valentovic et al., 2006) استفاده شد. پس از آنالیز داده‌های این مرحله، از بین ۱۰ رقم مرحله قبل تعداد ۲ رقم شامل یک رقم به‌عنوان مقاوم‌ترین (BR00-01) و یک رقم هم به‌عنوان حساس‌ترین (TUC66-107) رقم به تنش سرما انتخاب شدند. قلمه‌های دو رقم منتخب مرحله دوم جهت اعمال تنش و شروع مرحله سوم (مولکولی) در ۶ تکرار (گلدان) کشت و در شرایط کنترل‌شده گلخانه قرار گرفتند. کلیه عوامل رشد شامل دما (°C ۳۵-۲۵)، رطوبت (٪۷۵-٪۵۰) و نور (۲۳۰۰ w/m) بر اساس نیاز کنترل می‌شد. گلدان‌ها به مدت ۴ ماه در شرایط گلخانه رشد نموده، قبل از تنش سرما، به مدت ۳ روز در دمای °C ۳۰-۲۸ در اتاق سازگاری قرار گرفتند. در ادامه، جهت اعمال تنش سرما در سردخانه[1]، سه روز پس از مرحله سازگاری، گلدان‌های حاوی رقم مقاوم (۶ گلدان) و حساس (۶ گلدان) به مدت ۱۲ ساعت در معرض سرمای °C ۲- قرار گرفتند. قبل از اعمال تنش سرما از برگ هر رقم نمونه‌برداری شد تا به‌عنوان نمونه شاهد مورداستفاده قرار گیرد. نمونه‌ها بلافاصله درون ازت مایع قرار داده شد. در ادامه، ۶ و ۱۲ ساعت بعد از تنش، نسبت به نمونه‌گیری از برگ ارقام تحت تنش اقدام شد. در این مرحله از همه تکرارهای هر رقم (به تعداد ۶ تکرار یا گلدان) مقداری برگ برداشته و همه برگ‌ها تحت عنوان یک نمونه بالک (bulk) جهت ادامه بررسی، درون فویل آلومینیوم قرار داده می‌شد. جهت استخراج RNA از کیت کیاژن (Qiagen) استفاده شد. پس از استخراج RNA، تعداد ۶ نمونه (شامل یک نمونه شاهد + یک نمونه بعد از تنش ۶ ساعته + یک نمونه بعد از تنش ۱۲ ساعته برای هر دو رقم) به روش RNAstable و جهت توالی‌یابی به شرکت Novogene چین ارسال و توالی‌یابی با استفاده از پلتفرم Hiseq2500 انجام شد. پس از تائید کمیت و کیفیت RNAهای استخراج‌شده، توالی‌یابی به‌صورت Pair-end و به طول ۱۵۰ نوکلئوتید انجام گردید.

جدول ۱. نمره دهی صفات موردبررسی در مرحله بررسی مورفولوژیکی

Table 1. Scoring the studied traits in morphological study stage

صفت مورفولوژیکی مورد اندازه‌گیری Morphological trait measured	عبارت توصیفی نشان‌دهنده وضعیت صفت (نمره کیفی) Descriptive expression indicating the status of adjective	نمره کمی Quantitative score
میزان خسارت به مریستم انتهایی Amount of damage to terminal meristem	بدون خسارت- خفیف- متوسط- شدید No damage, mild, moderate, severe	0-1-2-3
درصد سبزینگی کانوپی Percentage of canopy greenery	زیاد – متوسط – کم- خشکیدگی کامل Completely green, Half green, Low greenness, Complete drying	0-1-2-3
میزان خسارت جوانه‌ها Damage to buds	شدید- متوسط – خفیف- بدون خسارت No damage, mild, moderate, severe	0-1-2-3
میزان توسعه مغز Rate of Pith development	بدون توسعه‌یافتگی- توسعه‌یافته کم- توسعه‌یافته متوسط- توسعه‌یافته زیاد No development, low Developed, Medium development, High developed	0-1-2-3

داده‌های حاصل از توالی‌یابی برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی به‌منظور ارزیابی و مقایسه سطوح ترانسکریپتومی، قبل و بعد از تنش سرما، استفاده شدند. جهت همردیف‌سازی خوانش‌های پیرایش شده در مرحله قبل با ژنوم نیشکر، از توالی‌های ژنوم نیشکر در سایت: https://sugarcane-genome. cirad.fr/content/download استفاده شد. همچنین فایل GFF که مربوط به تفسیر ژن‌ها در نیشکر است از همین پایگاه دریافت گردید.

[1]. Cool Chamber

پس از انجام آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها و به دست آمدن مقادیر بیان، آنالیز غنی‌سازی ژن‌ها انجام و محصولات ژن‌ها[1] بر اساس طبقه‌بندی KEGG، دسته‌بندی گردید. چون در زمان تفسیر و تجزیه‌وتحلیل ژن‌های دارای بیان افتراقی و ترسیم مسیرها، توالی‌یابی ژنوم نیشکر هنوز انجام نشده بود و عملکرد همه ژن‌های این گیاه مشخص نشده است، از گیاه سورگوم (*Sorghum bicolor*) به‌عنوان نزدیک‌ترین گونه به نیشکر جهت تفسیر عملکردی ژن‌ها استفاده شد و عملکرد ژن‌های این گیاه ملاک آنالیز و تفسیر قرار گرفت. پس از دریافت نتایج حاصل از آنالیز بیان افتراقی ژن و جدا کردن ژن‌های دارای بیان افتراقی، آنالیز مسیرها با استفاده از پایگاه داده Kobas انجام گردید. در ادامه به‌منظور غنی‌سازی مسیرها[2]، مسیرهای معنی‌دار با Corrected P-Value<0.05 برای ژن‌های دارای افزایش[3] و کاهش بیان[4] شناسایی شد.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز صفت میزان تحمل سرما (C.T) در بررسی مورفولوژیکی ۱۳۹۴ در جدول شماره ۲ آورده شده است. به علت زیاد بودن تعداد داده، تنها به ذکر بالاترین ارقام ازنظر صفات موردراندازه‌گیری اکتفا شده است. در این مرحله، تعداد ۵۴ رقم متحمل شناسایی شدند.

جدول ۲. جدول مقایسه میانگین صفت تحمل به سرما (C.T) در ارقام نیشکر

Table 2. Comparison table of mean cold tolerance (C.T) in sugarcane cultivars

Cold tolerance	میزان تحمل سرما (C.T.)	
گروه Group	میانگین Mean	رقم cultivars
A	10.09	BJ97-19
A	10.84	CP50-28
A	10.76	C88-356
A	9.70	L61-67
A	9.32	BR00-01

در بررسی مورفولوژیکی سال ۱۳۹۵، تجزیه واریانس صفت میزان تحمل سرما (C.T) در ۵۴ رقم منتخب این مرحله، انجام شد (جدول ۳). نتایج این آنالیز نشان داد که ارقام موردبررسی ازنظر صفت میزان تحمل سرما (C.T) اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ باهم دارند. در این مرحله تعداد ۵ رقم مقاوم و ۵ رقم حساس جهت بررسی از طریق شاخص‌های بیوشیمیایی در مرحله بعد (دوم) انتخاب شدند.

در شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب محتوای پرولین و مالون-دی‌آلدهید (MDA) در ۵ رقم متحمل و ۵ رقم حساس در سه تاریخ سه تاریخ ۱۴ آبان ماه، ۲۶ آذرماه و ۱۷ دی‌ماه ۱۳۹۵، مشاهده می‌شود.

جدول ۳. تجزیه واریانس صفت تحمل به سرما (C.T) در ارقام نیشکر

Table 3. analysis of variance for cold tolerant trait (C.T) in sugarcane cultivars

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS (C.T)
تکرار Rep.	2	0.52
تیمار (رقم) Treatment	53	17.87**
خطا Error	106	0.16

R^2=0.98, CV=5.13, **= Significant at 1% Level, ns= non-Significant

نتایج تعیین کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA ارسالی در جدول شماره ۵ نشان داده شده است. در این جدول میانگین OD260/280، OD260/230 و مقیاس RIN (RNA integrity number) یا میزان یکپارچگی RNA گزارش شده است.

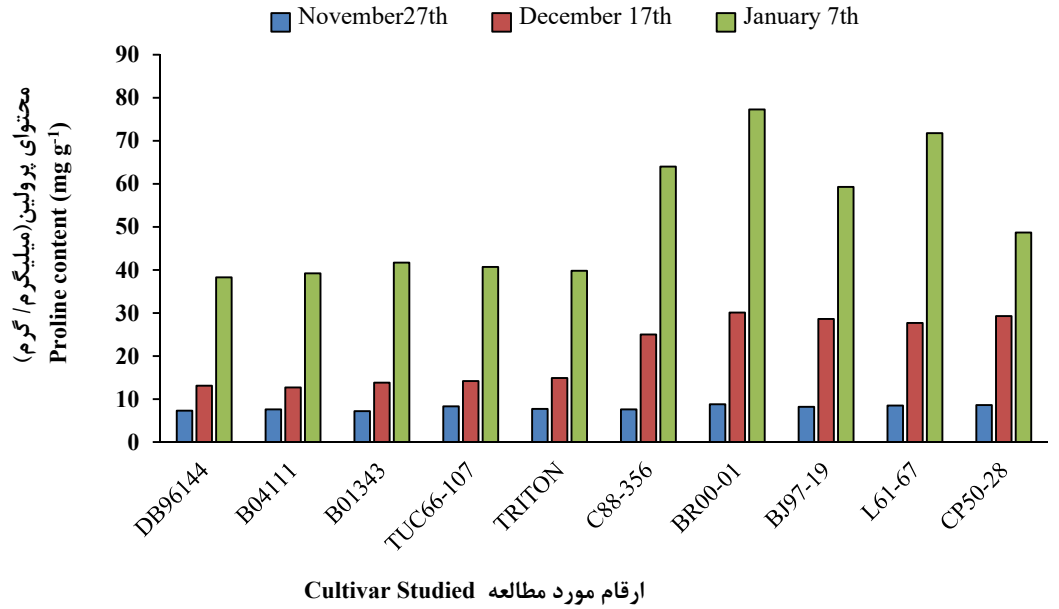
نتایج حاصل، نشان داد که تعداد زیادی از ژن‌ها دارای بیان افتراقی هستند. خلاصه ژن‌های دارای بیان افتراقی در مقایسه‌های مختلف بین دو رقم مقاوم و حساس در جدول ۶ مشاهده می‌شود.

در شکل ۳، نتایج دسته‌بندی عملکرد ژن‌های دارای بیان افتراقی در مقایسه‌های مختلف مشاهده می‌شود.

پس از آنالیز مسیر، نتایج مسیرهایی که به‌احتمال ۹۵ درصد اختلاف بیان ژن‌های درگیر در آن‌ها در رقم حساس و مقاوم به تنش سرما مرتبط بود، مشخص گردید. هنگامی‌که رقم حساس به مدت ۶ و ۱۲ ساعت، تحت تنش سرمای ۲- درجه سلسیوس قرار گرفت، تعداد ۵ گروه ژنی شناسایی شد که دارای بیان افتراقی بودند. در این تیمار ژن PR1، در مسیر پیام‌رسان MAPK، بیان افتراقی نشان داد (شکل ۴). در مقایسه رقم مقاوم و حساس، هنگامی‌که هر دو تحت تنش

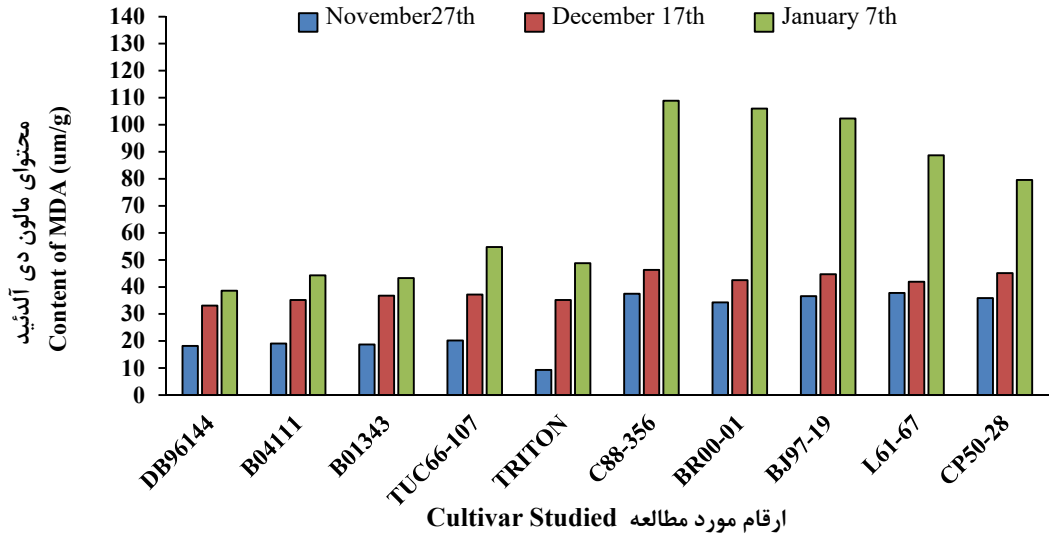
[1]. GO Enrichment
[2]. Phathway Enrichment
[3]. UP Regulate
[4]. Down Regulate

سرمای ۲- درجه سلسیوس قرار گرفتند، تعداد ۹ گروه ژنی شناسایی شد که دارای بیان افتراقی بیان بودند. این گروه‌های ژنی، در رقم حساس، دارای کاهش بیان و در رقم مقاوم، دارای افزایش بیان بودند. در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید، تعداد ۴ ژن، در رقم مقاوم، افزایش بیان نشان داد که این موضوع بیانگر مشارکت این ژن‌ها، در تنظیم و کنترل مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید است (شکل ۵).



شکل ۱. محتوای پرولین در سه تاریخ متفاوت در ارقام موردمطالعه

Fig. 1. Proline content, on three different dates, in studied cultivars



شکل ۲. محتوای مالون دی آلدئید (MDA) در سه تاریخ متفاوت در ارقام موردمطالعه

Fig. 2. Malondialdehyde content (MDA), in three different histories, in studied cultivars

جدول ۵. خلاصه بررسی کمی و کیفی نمونه‌های ارسالی

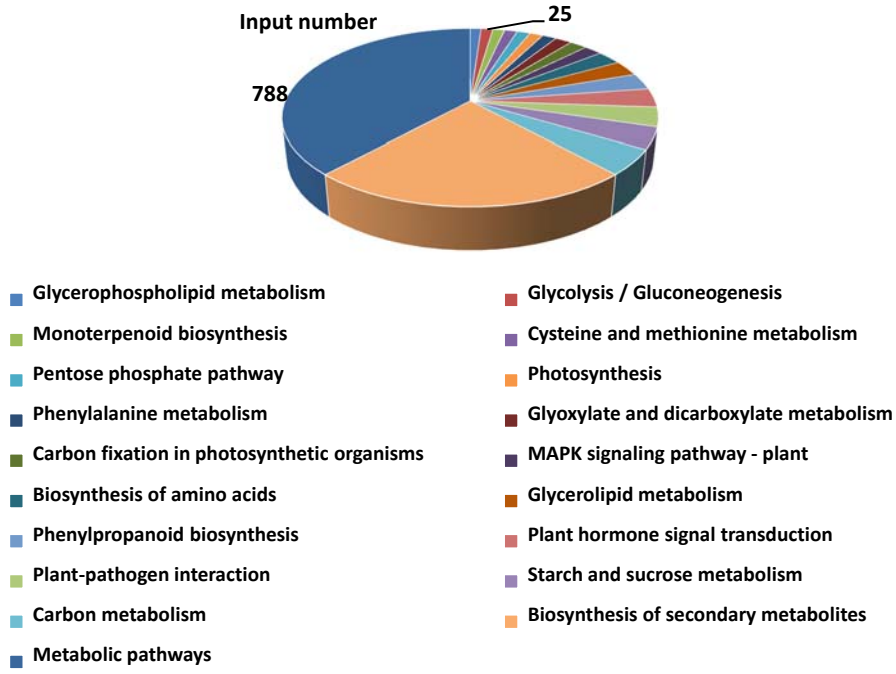
Table 5. Summary of quantitative and qualitative review of submitted samples

ردیف NO	نام نمونه Sample name	کد نمونه Sample ID	$OD_{260/OD280}$	$OD_{260/OD230}$	یکپارچگی RNA RIN	نتیجه کیفیت نمونه sample QC Result
1	19452	FKRN190315691-1A	2.79	0.8	8.1	PASS
2	19069	FKRN190315693-1A	1.75	0.64	8.2	PASS
3	19018	FKRN190315694-1A	1.7	1	8.4	PASS
4	19866	FKRN190315695-1A	2.33	0.96	8.1	PASS
5	19507	FKRN190315696-1A	2.6	0.57	7.7	PASS
6	19881	FKRN190315697-1A	5	1.11	7.9	PASS

جدول ۶. خلاصه‌ای از آمار ژن‌های به‌دست‌آمده از آنالیز بیان افتراقی با $q<0.05$

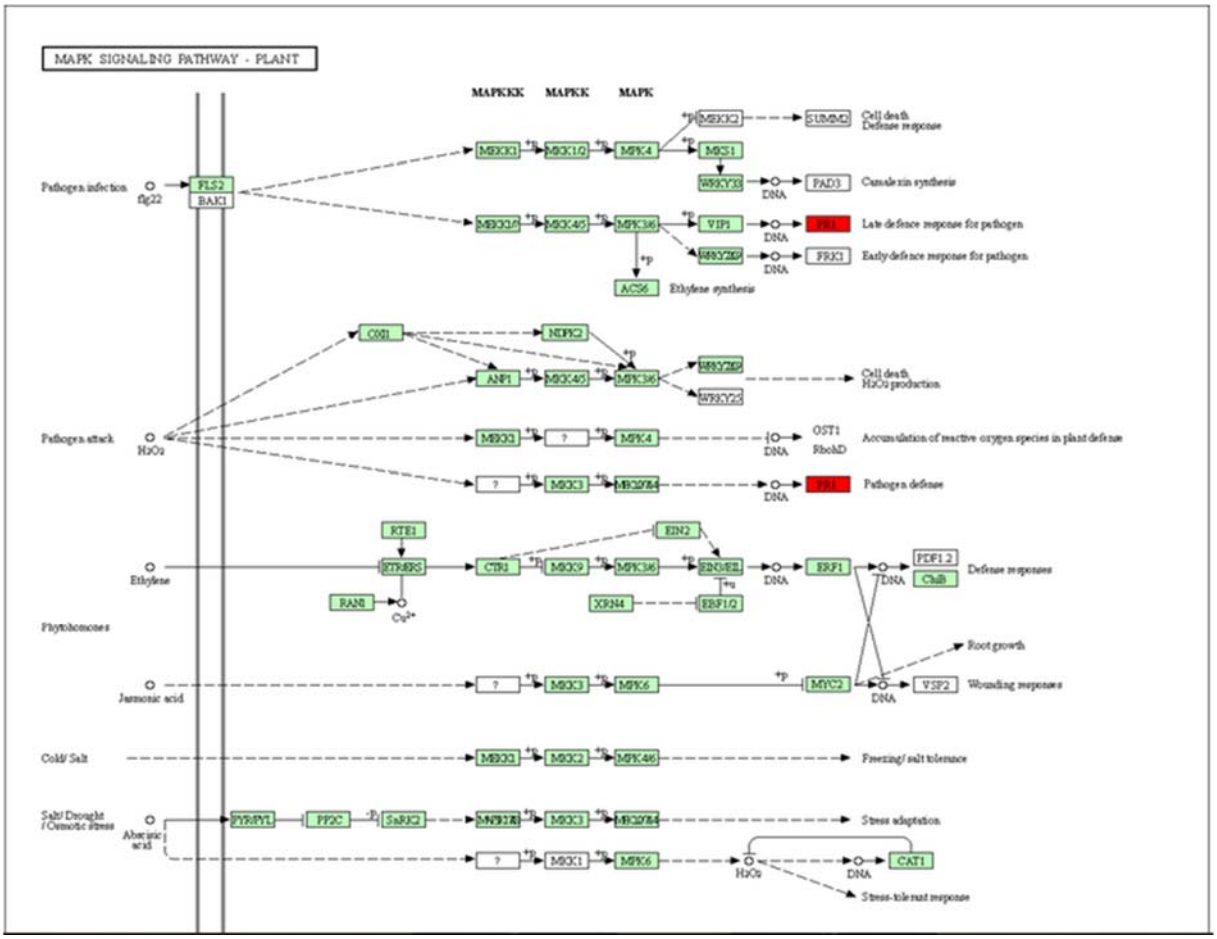
Table 6. Summary of gene statistics obtained from differential expression analysis with $q<0.05$

ردیف Row	مقایسه Comparison	افزایش بیان UP Rigulate	کاهش بیان Down Rigulate	مجموع Total
1	H_0 vs H_6	1435	1497	2932
2	H_0 vs H_{12}	1412	1245	2657
3	H_6 vs H_{12}	31	21	52
4	H_0 vs M_0	281	229	510
5	H_6 vs M_6	457	655	1112
6	H_{12} vs M_{12}	269	304	573
7	M_0 vs M_6	863	1809	2672
8	M_0 vs M_{12}	901	1140	2041
9	M_6 vs M_{12}	86	39	125
	Total جمع کل	5735	6939	12674



شکل ۳. دسته‌بندی عملکرد ژن‌های دارای بیان افتراقی در مقایسه‌ها مختلف تیماری بر اساس طبقه‌بندی KEGG

Fig 3. Functional classification of genes with differential expression in different treatment comparisons based on KEGG classification



شکل ۴. ژن PR1 (به رنگ قرمز) مؤثر در مسیر پیام‌رسان MAPK: این ژن در رقم حساس پس از تنش ۱۲ ساعت سرما، دارای افزایش بیان بود.

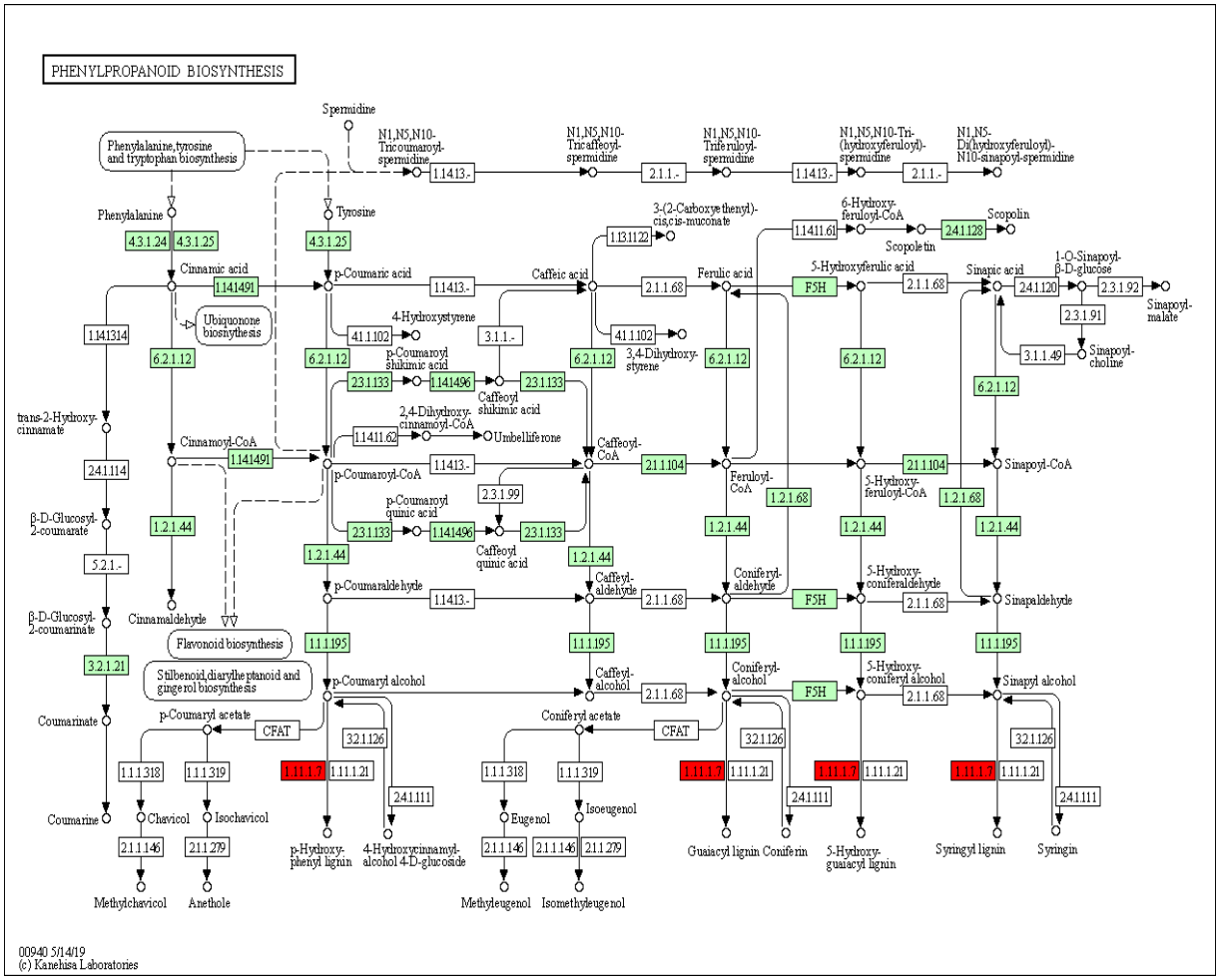
Fig. 4. PR1 gene (In red), effective in MAPK messenger pathway: This gene had increased expression in sensetive cultivar after 12 hours of cold stress.

بحث

در روند طبیعی سرما، صفات مورفولوژیکی و شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه نیشکر، به علت تنش سرما، دستخوش تغییر می‌شوند. نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی برای تجمع پرولین در واکنش به تنش سرما گزارش شده است که مهم‌ترین آن‌ها نقش پرولین به‌عنوان یک ماده تنظیم‌کننده اسمزی و عامل حفاظت کننده آنزیم‌های سیتوپلاسمی و ساختمان غشا است (Teulate, B. et al, 1997). به‌علاوه، پرولین می‌تواند همانند عمل آنتی‌اکسیدان‌ها در مکانیسم‌های مهار، یک جارو کننده ROSنیز باشد (Rahimizadeh, M. et al, 2007). افزایش پرولین به حفظ تورم و کاهش خسارت غشاء در گیاهان منجر می‌شود. بدین ترتیب، با روش تنظیم اسمزی تحمل به تنش افزایش می‌یابد (Mantri, N.L., et al, 2007). تحت تنش دمایی پایین، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن، بیشتر از یک حد معین در نیشکر، باعث پراکسیداسیون چربی غشایی شده و درنهایت باعث تجمع MDA می‌شود (Robert and Bewlery. 1980). در پژوهش حاضر محتوای پرولین و MDA در دو رقم مقاوم و حساس با کاهش دما شیب افزایشی داشت، با این تفاوت که مقدار این شیب در رقم مقاوم بیشتر بود؛ بنابراین گیاه نیشکر نیز مانند سایر گیاهان از این پتانسیل در جهت تحمل بیشتر سرما استفاده می‌نماید.

پروتئین کینازهای فعال‌شده با میتوژن یا MAPKها، کیناز پروتئین‌هایی هستند که خاص اسیدهای آمینه سرین، ترئونین و تیروزین می‌باشند. MAPKها متعلق به گروه کینازی CMGC (CDK/MAPK/GSK3/CLK) هستند. این گروه، در پاسخ‌های سلولی به طیف متنوعی از محرک‌ها، مانند میتوژن‌ها، استرس‌اسمزی، شوک حرارتی و سایتوکینین‌های پیش التهابی، نقش دارند (Pearson et al.

2001). نتایج حاصل از آنالیز مسیر نشان داد که ژن‌های متفاوتی در مقایسه‌های مختلف تیماری، افزایش یا کاهش بیان دارند. هنگامی‌که رقم مقاوم به مدت ۶ و ۱۲ ساعت تحت تنش ۲- °C قرار گرفت بیان ژن PR1 در مسیر پیام‌رسان MAPK افزایش پیدا کرد. به‌بیان‌دیگر با افزایش مدت‌زمان تنش از ۶ به ۱۲ ساعت، واکنش گیاه به‌صورت افزایش فعالیت ژن PR1 در این مسیر پیام‌رسانی، اتفاق می‌افتد (شکل ۴). فنیل آلانین آمونولیاز، آنزیم اصلی در مسیر فنیل پروپانوئید است که در بیوسنتز مواد فنلی نقش مهمی ایفا می‌کند. فنل‌ها با عمل آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی خود، در تنظیم حالت کشسانی دیواره سلولی نقش دارند (Sofo et al. 2005). مشاهده شده است که رویارویی با دماهای پایین باعث تغییر در فعالیت PAL و غلظت فنیل پروپانوئیدها می‌شود (Parra et al., 1990). این تغییرات عاملی مهم در مقاومت گیاه به دماهای پایین در نظر گرفته‌شده‌اند (Leyva et al., 1995). هنگامی‌که هر دو رقم مقاوم و حساس، به مدت ۶ و ۱۲ ساعت تحت تنش سرمای ۲- درجه سلسیوس قرار گرفتند، در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید، در رقم مقاوم و حساس، به ترتیب تعداد ۴ و ۱ ژن افزایش بیان نشان دادند، با این تفاوت که این میزان در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود (شکل ۵).



شکل ۵. ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید (به رنگ قرمز): این ژن‌ها در رقم مقاوم، پس از ۶ ساعت تنش سرما، افزایش بیان نشان دادند.

Fig. 5. Genes affecting the biosynthesis pathway of phenylpropanoid (In red): These genes showed increased expression in resistant cultivar after 6 hours of cold stress.

ریبوفلاوین یک ویتامین محلول در آب است کـه در چرخـه‌هـای تنفسی و تولید انرژی، به‌عنوان کوآنزیم، در واکنش‌های انتقال الکترون و تولید یا تخریب رادیکال‌های اکـسیژن در متابولیـسم، دخالـت دارد. مقاومت ناشی از کاربرد این ویتامین در دولپه‌ای‌ها، با پاسخ‌های مربـوط بـه پروتئین‌کیناز و ژنNPR[1] (که تنظیم‌کننده پاسخ‌های دفاعی گیـاه در هر دو مورد SAR[2] و ISR[3] است) در ارتباط است (Dong H., and Beer, S.V. 2000). نتایج این تحقیق نشان داد که در مسیر بیوسنتز لینولئیک اسید، با افزایش مدت‌زمان سرما از ۶ به ۱۲ ساعت، بیان تعدادی از ژن‌ها در رقم مقاوم (۴ ژن) و حساس (۱ ژن) افزایش میابد با این تفاوت که تعداد و میزان بیان این ژن‌ها در رقم مقاوم بیشتر است. درحالی‌که در مسیر متابولیسمی ریبوفلاوین، تعداد و میزان بیان ژن‌ها در رقم حساس بیشتر و در رقم مقاوم کمتر بود. تغییر رنگ برگ‌های نیشکر در مزرعه، در زمان کاهش سرما و افزایش آنتوسیانین و ریبوفلاوین در ارقام حساس به تنش سرما، نیز مؤید این موضوع است.

نتایج بررسی واکنش مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ارقام نیشکر به تنش سرما نشان داد ارقامی که در مرحله مورفولوژیکی میزان تحمل بیشتری به تنش سرما دارند، همین ارقام در مرحله بررسی بیوشیمیایی نیز ازنظر میزان پرولین و MDA در سطح بالاتری نسبت به ارقام حساس قرار می‌گیرند. در بررسی مولکولی نیز در هنگام تنش سرما، مسیرهای بیوسنتز فعال شامل بیوسنتز آرژنین، اسیدهای آمینه پرولین، فنیل پروپانوئید، ریبوفلاوین و مسیر پیام‌رسان MAPKشناسایی شدند که، بیان ژن‌های تنظیم‌کننده آن‌ها، در رقم مقاوم افزایش بیان بیشتری نسبت به رقم حساس داشتند. همچنین ژن PR1 در مسیر پیام‌رسان MAPK شناسایی گردید که با کاهش دما، در رقم مقاوم افزایش بیان بیشتری نسبت به رقم حساس از خود نشان داد. به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که تنش سرما بر واکنش‌های فیزیولوژیک و میزان بیان ژن‌ها در مسیرهای بیوسنتزی و متابولیسمی تأثیرگذار و شدت این واکنش‌ها در ارقام مقاوم و حساس متفاوت است. مقاومت به سرما صفتی کمی بوده و شدیداً تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد و گزینش برای این صفت نیاز به شناسایی مسیرهای بیوسنتزی، متابولیکی و استفاده از ابزارهای مکملی مانند نشانگرهای مولکولی دارد. با توجه به اینکه در منابع مختلف بر مؤثر بودن اثرات افزایشی و غالبیت ژن‌ها در کنترل مقاومت به سرما اشاره شده است، بنابراین شناسایی QTLهایی با اثرهای افزایشی و غالبیت مرتبط با سرما و نشانگرهای مرتبط با این QTLها در برنامه گزینش و اصلاح برای این صفت می‌تواند راهگشا باشد. انجام تحقیق اخیر در مورد سایر تنش‌های محیطی شامل خشکی و شوری و شناسایی ژن‌های مشترک در این تنش‌ها نیز توصیه می‌شود.

منابع

Bates, L.S., Waldern, R.P., Tear, L.D. 1973. Rapid determination of free Proline for water stress studies. Plant and Soil. 39, 205-207.

Baker, S.S., Wilhelm, K.S., Thomashow, M.F., 1994. The 5'-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. Plant Molecular Biology. 24, 701–713. PMID: 8193295.

Dong, H., Beer, S.V., 2000. Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. Phytopathology. 90, 801-811.

Heinz, D.J., 1987. Sugarcane Improvement through Breeding, Amsterdam; New York: Elsevier

Kim, J.C., Lee, SH., Cheong, Y.H., Yoo, C.M., Lee, SI., Chun, H.J., Yun, D.J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Lim, C.O., et al. 2001. A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. Plant Journal. 25(3), 247–259.

Leyva, A., Jarillo, A., Salinas, J.M., Zapater. J. M., 1995. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase mRNAs of Arabidopsis

[1]. Non pathogenesis related protein
[2]. resistance acquired S
[3]. resistance systemic I

thaliana in a light-dependent manner. Plant Physiology. 108, 39-46.

Li, B., Duan, H., Li, J., Deng, X.W., Yin, W., Xia, X., 2013. Global identification of miRNAs and targets in Populus euphratica under salt stress. Plant Molecular Biology. 81, 525–539. https://doi.org/10.1007/s11103-013-0010-y PMID: 23430564

Mantri, N.L., Ford, R., Coram, T.E., Pang, E.C.K., 2007. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. BMC Genomics. 8, 303 (2007). https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-303

McCormick, A.J., Cramer, M.D., Watt, D.A., 2006. Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. New Phytologist. 171, 759–770.

McCormick, A.J., Watt, D.A., Cramer, M.D., 2009. Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. Journal of Experimental Botany. 60, 357–364.

Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, BE., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocrine Reviews. 22, 153–83. https://doi.org/10.1210/er.22.2.153. PMID 11294822

Porra, R.J., 2002. The cheque red history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Photosynthesis Research, 73, 149-156.

Rahimizadeh, M., Habibi, D., Madani, H., Mohammadi, H., Mehraban A., Sabet, A.M., 2007. The effect of micronutrients on antioxidant enzymes metabolism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. Journal of Helia. 47, 167-174.

Shinozaki. K., Yamaguchi.Shinozaki. K., Seki. M., 2003. Regulatory network of gene expression inn the drought and cold stress responses. Current Opinion in Plant Biology. 6, 410–417. PMID: 12972040.

Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., Masia, A., 2004. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during re-watering in olive tree. Plant Science. 166, 293-30.

Taherkhani. K. et al., 2010. Final Report of Sugarcane Frosting Project, Khuzestan Sugarcane Development Research and Training Institute. [In Persian].

Teulate, B., Rekika, D., Nachit, M., Monnerux, P., 1997. Comparative osmotic adjustments in barley and tetraploid wheats. Plant Breeding, 116, 519-523.

Valentovic, P., Luxova, M., Kolarovi, L., Gasparikora, O., 2006. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, memberane stability and water relation in two maizes. Plant, Soil and Environment. 52, 186-191.

Yamaguchi.Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annual Review of Plant Biology. 57, 781–803. PMID: 16669782.

Yang, Y., Yu, Q., Yang, Y., Su, Y., Ahmad, W., Guo, J., Gao, S., Xu, L., Que, Y., 2018. Identification of cold-related miRNAs in sugarcane by small RNA sequencing and functional analysis of a cold inducible ScmiR393 to cold stress. Environmental and Experimental Botany. 155, 464-476. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.07.030.