دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

بیان افتراقی ژن‌های StFtsH5، StFtsH6 و StFtsH10 در سیب‌زمینی در مواجهه با تنش‌های سرما، گرما و نور زیاد

عباس سعیدی[۱]، زهرا حاجی برات[۲]، مهرشاد زین‌العابدینی[۳] و محمدرضا غفاری[۳]

۱- گروه زیست فناوری گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، (نویسنده مسوول: abbas.saidi@gmail.com)
۲- گروه زیست فناوری گیاهی، و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران،
۳- گروه زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۸
صفحه: ۱۴۸ تا ۱۵۵

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: تنش‌های غیرزیستی فاکتورهای مهم در کاهش عملکرد محصولات زراعی هستند. سرما، گرما و نور زیاد ازجمله مهمترین تنش‌های غیرزیستی در گیاهان به‌شمار می‌روند. لذا درک مکانیسم مولکولی ژن‌های درگیر در تنش ضروری به‌نظر می‌رسد. متالوپروتئاز FtsH یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی است. مطالعات زیادی بر روی FtsH در گیاهان مختلف انجام شده است. اما تحت تنش سرما، گرما و نور زیاد بر روی سیب‌زمینی گزارشی وجود ندارد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، بیان ژن StFtsH5، StFtsH6 و StFtsH10 در سه بافت ریشه، ساقه و برگ در پاسخ به سه تنش سرما، گرما و نور زیاد بررسی شد. ژنوتیپ آگریا تحت شرایط کنترل شده در گلخانه کشت شد. بعد از تیمارهای سرما، گرما و نورزیاد، نمونه‌برداری از برگ، ساقه و ریشه تحت دو شرایط کنترل و تنش بعد از اعمال تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. بیان نسبی ژن‌های انتخاب‌شده تعیین شد.

یافته‌ها: ژن StFtsH5 بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تنش دمای پایین در برگ و ساقه افزایش بیان معنی‌داری را نسبت به شرایط کنترل نشان داد. همچنین این ژن تحت تنش گرمایی در دو زمان اعمال تنش در ریشه و برگ افزایش میانگین بیان نسبی نسبت به شرایط کنترل داشته‌است. StFtsH5 در برگ تحت تنش نور زیاد در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش افزایش بیان نسبی نسبت به شرایط نرمال نشان داد. اما ژن StFtsH6 تحت تنش دمای پایین، گرما و نور زیاد بعد از ۴۸ و۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش در برگ، ساقه و ریشه میانگین بیان نسبی بالایی برخوردار نبود. ژن StFtsH10 تحت تنش نور زیاد در ساقه و ریشه در ۴۸ ساعت بعد از تنش افزایش بیان معنی‌داری را نشان داد. در برگ و ساقه تحت تنش دمای پایین در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار میانگین بیان بالایی را به‌خود اختصاص داد. اما این ژن ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش گرمایی و نور زیاد به‌ترتیب افزایش بیان بالایی را در ساقه و ریشه نسبت به شرایط کنترل داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که تحت ۳ تیمار تنشی (سرما، گرما و نور زیاد) ژن‌های StFtsH5 و StFtsH6 در ساقه، برگ و ریشه بیشترین و کمترین میانگین بیان نسبی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: در میان سه ژن، StFtsH5 بالاترین بیان را در سه بافت تحت تنش سرما، گرما و نور زیاد نشان داد. با توجه به یافته‌های فوق، تغییرات بیشتر بیان ژن StFtsH5 احتمالا می‌تواند ناشی از نقش موثر این ژن در تنش‌های غیرزیستی مخصوصا سرما، گرما و نور زیاد باشد.

واژه‌های کلیدی: آگریا، استرس غیرزیستی، سرما، گرما، FtsH

مقدمه

گیاهان در طول رشد در معرض تنش‌های محیطی مختلفی قرار می‌گیرند که عامل اصلی از بین رفتن عملکرد محصول در سراسرجهان است. این تنش‌ها اعم از خشکی، سرما، گرما، شوری، نور زیاد و پاتوژن‌ها هستند. گیاهان به‌عنوان موجودات بی‌تحرک باید از مکانیسم‌های گسترده‌ای از واکنش‌های گیاهی برای مقابله با این استرس‌ها در طول تکامل استفاده کنند (۱۶). عوامل استرس‌زای محیطی به‌طور معمول باعث اختلال در عملکرد پروتئین و غیر طبیعی شدن آنها می‌شوند. این خسارت به پروتئین‌ها، خطرات قابل توجهی را به بقای سلول وارد می‌کنند. حفظ ساختار عملکردی پروتئین‌ها برای زنده‌ماندن سلول در شرایط استرس از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۱۶). غشاهای بیولوژیکی از انواع مختلفی از ترکیبات پروتئینی، لیپید و کربوهیدرات تشکیل شدند. سازماندهی بین این اجزا در سلول زنده که ناهمگن هستند در طول دوره زندگی موجودات مشاهده می‌شود. در سطح مولکولی، برهم‌کنش بین لیپیدها و پروتئین‌ها وجود دارد که سازماندهی اجزای داخل سلول را مدیریت می‌کند. برای توصیف مناسب این تعاملات نیاز به فهم ساختار و دینامیک کمپکس‌های لیپید–پروتئین ضروری به‌نظر می‌رسد. لیپیدهای مخصوص واسطه فعل و انفعالات بین پروتئین‌های غشا و دو لایه لیپیدی هستند که دارای عملکرد خاص در سیگنالینگ خارج سلولی می‌باشند. عملکرد بهینه سلول تحت تأثیر تجزیه و متابولیسم پروتئین‌های غشایی است. در نتیجه پروتئین‌های آسیب‌دیده و تخریب شده باید جمع‌آوری و حذف شوند تا عملکرد بهینه سلول را تحت تأثیر قرار ندهند.

پروتئازها یکی از مهمترین عوامل در کنترل کیفیت سلول هستند که نقش تعیین‌کننده‌ای در تنظیم پروتئین غشایی ایفا می‌کنند. FtsH [۱] (رشته حساس به دما) یکی از پروتئازها بوده که در باکتری اشرشیا کولی[۲] برای اولین بار شناسایی شد. این پروتئاز در پروتئولیز سطح پروتئین‌های سیتوپلاسمی و غشایی خاص نقش دارد و پیش‌بینی می‌شود که این پروتئین‌ها اهمیت حیاتی در واکنش به پاتوژن‌ها داشته‌باشند. همچنین FtsH یک گروه پروتئاز اصلی است که در تخریب فاکتور رونویسی شوک حرارتی σ^{32} نیز نقش دارد. در باکتری، FtsH تنها پروتئاز وابسته به ATP است که برای بقا و زنده ماندن سلول‌های باکتری ضروری است. در سلول سه نوع پروتئاز وابسته به ATP وجود دارد که شامل Clp، FtsH و Lon است که یک موتیف محافظت‌شده ATP-bindig به اشتراک می‌گذارد و دارای دمین کاتالیزوری متفاوت برای پرتئولیز است و یک پروتئاز مستقل از ATP است که Deg نامیده می‌شود (۲،۳). این پروتئازها در زمینه تخریب و حذف

1- Filamentous temperature sensitive H
2- Escherichia coli

پروتئین‌های آسیب‌دیده و نامطلوب و پروتئین‌های پیش‌ساز نقش دارند. پروتئازهای وابسته به ATP در فعالیت پپتیداز نقش دارند و چاپرون‌ها از این طریق نیز شناخته شدند که کمک به سایر پروتئین‌های سوبسترایی می‌کنند که به‌عنوان مشتری[1] نامیده می‌شوند تا این پروتئین‌ها را به‌درستی فولد[2] شوند.

اعضای خانواده FtsH در غشاهای تیلاکوئید یا در غشای پوششی داخلی تیلاکوئید قرار دارند. علاوه‌بر FtsH، Deg در تخریب پروتئین در غشاهای تیلاکوئید شرکت می‌کنند اما پروتئازهای Clp و Lon در تخریب پروتئین‌ها در استروما نقش دارد (۲۰). شواهد جمع‌آوری شده نشان داد که در میان پروتئازهای موجود در سلول Clp و FtsH نقش مهمی در هموستاز پلاستیدها دارند. در کلروپلاست، این پروتئازهای به عنوان مونومر عمل نمی‌کنند بلکه معمولا کمپلکس‌های بزرگی را تشکیل می‌دهند درست مانند پروتئازهای باکتریایی قابل توجه است که این پروتئازها متنوع هستند و برخلاف پروتئازهای تک کپی باکتریایی به صورت نسخه‌های متعدد در موجودات فتوسنتزکننده وجود دارند (۷). پلاستیدها مورفولوژی خود را به‌صورت پویا در پاسخ به شرایط محیطی و وضعیت رشدی تغییر می‌دهند. در ارتباط با دینامیک پلاستیدها، کنترل کیفیت و کمیت پروتئین‌ها ضروری است (۴). بنابراین پروتئازها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی تقریبا در تمام فرآیندها در طول تبدیلات انواع پلاستید و نگهداری هموستاز پلاستید هستند. مطالعات مختلفی نشان دادند که پروتئازها و پپتیدازهای مختلفی در پلاستیدها فعالیت دارند. نتایج این مطالعات نشان داد که اکثریت این پروتئازهای پلاستیدی با پروکاریوت‌ها همولوگ هستند. بدلیل اینکه تصور می‌شود که پلاستیدها از درون همزیستی سیناباکتری‌های اجدادی منشا می‌گیرند.

پروتئازهای FtsH به عنوان سیستم‌های کنترل کیفیت سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی تحت استرس‌های محیطی و مراحل رشدی هستند. علاوه براین برخی مطالعات گزارش کردند که عملکرد FtsH مانند چاپرون درگیر در هم‌گذاری[3] و تاخوردگی پروتئین مشابه هستند. پروتئازهای FtsH متعلق به ATPase هستند. براساس مطالعات، این پروتئاز در فرآیندهای سلولی و تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان عمل می‌کنند که اجزای مهمی از سیستم‌های کنترل کیفیت پروتئین در میتوکندری و کلروپلاست هستند. عملکرد FtsH برای تمایز کلروپلاست در طول رشد و توسعه برگ حیاتی است. پروفایل بیانی ژن‌های FtsH در برگ بالغ آرابیدوپسیس تحت تیمار نور زیاد مشابه بود (۹،۸). مطالعه قبلی نشان داد که AtFtsH4 می‌تواند در توسعه و تشکیل برگ در مرحله رشدی برگ روزت در روز کوتاه بدلیل جلوگیری از انباشت پروتئین‌های اکسیدشده در سلول موثر است (۲۴). در جهشی که بر روی FtsH4 انجام شد مشاهده شد که مورفولوژی برگ در مرحله توسعه روزت تغییر کرده است. FtsH11 همولوژی بالایی با FtsH4 دارد اما جهش‌یافته FtsH11 هیچ تفاوت معنی‌داری با گیاه تیپ وحشی آن نداشت (۳۳). در مطالعه دیگر مشاهده شد که جهش‌یافته FtsH12 منجر به نقص جنین شده است (۲۷). مبتنی بر مطالعه قبلی، فعالیت FtsH در کلروپلاست‌ها از طریق تنظیم ROS انجام می‌شود و همچنین تغییرات مورفولوژی برگ را کنترل می‌کنند. اما مطالعات کمی بر روی FtsH در میتوکندری انجام شده‌است. هدف از این مطالعه بررسی بیان سه ژن FtsH در اندام‌های مختلف سیب‌زمینی (ساقه، برگ و ریشه) تحت تنش سرما، گرما و نور زیاد است. این بررسی می‌تواند پایه تئوریکی برای پیش‌بینی عملکردی ژن‌های FtsH تحت تنش‌های فوق‌الذکر را فراهم کند.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت و اعمال تیمارها

نمونه‌های کلون سیب‌زمینی از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در کرج تهیه شد وکشت نمونه‌ها در گلخانه صورت گرفت. گیاهان در سه هفته بعد از کشت به صورت یکسان رشد کردند برای مراحل تنش و نرمال شد. غده‌ها برای هر تیمار نرمال و تنش سرما، گرما و نور زیاد به صورت سه تکرار کشت شدند. بعد از گذشت دوهفته نمونه‌ها در انکوباتور برای تنش سرمایی و گرمایی منتقل شدند. نمونه‌های تحت تنش نور زیاد در فیتوترون قرار گرفتند. نمونه شاهد در گلخانه در شرایط نوری ۱۶/۸ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۰ درصد قرار داشتند. اعمال تنش به‌مدت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت صورت گرفت. این اعمال تنش به‌مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت. گیاهچه‌های تحت تنش سرما به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند در حالی که گیاهچه‌های تحت تنش گرما به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. برای تنش نور زیاد هم گلدان‌ها در فیتوترون به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت نور (۸۰۰ لوکس) قرار گرفتند. نمونه‌برداری از ریشه، ساقه و برگ تحت شرایط نرمال و تنش انجام شد. سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و PCR کمی در زمان واقعی (qRT-PCR)

استخراج RNA از اندام‌های ریشه، ساقه، برگ و غده تحت شرایط نرمال انجام شد که به‌منظور مقایسه الگوی بیان دو ژن انتخابی در بین اندام‌ها صورت‌گرفت و همچنین از نمونه برگ و غده تحت شرایط نرمال و خشکی استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت سیناکلون انجام شد. برای حذف DNA از نمونه‌های RNA از آنزیم DNase I استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از ژل یک درصد و نانو دراپ (Thermo Scientific) بررسی شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis انجام شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis انجام شد. ساخت cDNA در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد (جدول ۱). برای هر نمونه سه تکرار بیولوژیکی و تکنیکی استفاده شد و ژن کنترل داخلی StEF-1α بود. همه پرایمرها و مشخصات آن‌ها در جدول ۲ فهرست شده‌اند. توالی

1- Client 2- Fold 3- Assemble

نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر StFtsH5، StFtsH10 و StFtsH6و ژن StEF-1α به عنوان کنترل داخلی از بانک ژن NCBI تهیه و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI طراحی شدند. الگوی بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR با استفاده ازBIO-RAD Supermix مورد بررسی قرار گرفتند. میزان بیان ژن‌ها تحت شرایط تنش خشکی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه گردید.

$$2 - \Delta\Delta Ct = 2^{-[\Delta Ct\,(treatment) - \Delta Ct\,(Control)]}$$

$$2 - \Delta\Delta Ct = 2^{-[Ct\,(treatment) - Ct\,(StEF\alpha1)] - [Ct\,(Control) - Ct\,(StEF\alpha1)}$$

Ct (treatment) = میانگین Ct برای ژن هدف

Ct (StEFα1) = میانگین Ct برای ژن رفرنس

ΔCt (treatment) = نمونه‌های تیمار

ΔCt (Control) = نمونه‌های کنترل

جدول ۱- دوره‌های دمایی و زمانی جهت تکثیر سنتز cDNA

Table 1. Temperature and time periods for amplification of cDNA synthesis

واکنش	دماC°	زمان	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشته‌سازی	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال	۵۶	۳۰ ثانیه	
بسط آغازگر	۷۲	۳۰ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول ۲- توالی‌های پرایمر استفاده شده برای آنالیز Real-time در این مطالعه

Table 2. Primer Sequences Used for Real Time RT-PCR in this Study

شماره	نام ژن	توالی پرایمر	دمای ذوب	شماره دسترسی	طول آمپلیکو
۱	F:StFtsH5 R:StFtsH5	CTTGTTCAAAGAGAGGTCAAGG TGCACTTTCTGTCATCCAGAGCCT	۵۶	PGSC0003DMG400004149	۲۰۰
۲	F:StFTSH6 R:StFTSH6	TGCATTGAGCCAAATCCG AGCTATTATACAGCTGCTGGGG	۵۸	PGSC0003DMG400017311	۱۸۰
۳	F:StFTSH10 R:StFTSH10	AGAGCTTCATGCTCTTGCTAATG TGTGCTAAGATCCTACTGGAG	۵۸	PGSC0003DMG400019672	۱۹۰
۴	F:EF1α R:EF1α	AGATGGTCAGACCCGTGAAC CCTTGGAGTACTTCGGGGTG	۵۸	NM_001288491.1	۲۰۰

نتایج و بحث

در این پژوهش الگوی بیان ژن‌های StFtsH5، StFtsH6 و StFtsH10 بررسی شدند. براساس نتایج بدست‌آمده از جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که تفاوت در سطح بیان در سه تنش سرما، گرما و نور زیاد در سه بافت ریشه، ساقه و برگ در دو ژن StFtsH5 و StFtsH10 مشاهده شد. درحالی که ژن StFtsH6 اختلاف معنی‌داری را در سه بافت در سه تنش مختلف نداشت.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس ژن‌های مورد بررسی در بافت‌های مختلف

Table 3. Results of analysis of variance of surveyed of genes in different tissues

منابع تغییرات	ژن	درجه آزادی	میانگین مربعات
بافت	StFtsH5	۲	۵۴۵۹/۲۶۱**
	StFtsH10	۲	۶۷۴/۶**
	StFtsH6	۲	۱۳۴۵/۰۷^{ns}
تیمار	StFtsH5	۲	۵۳۲۵/۶۵**
	StFtsH10	۲	۲۹۶۵/۳۶**
	StFtsH6	۲	۱۲۵۶/۰۷^{ns}
تیمار * بافت	StFtsH5	۴	۲۳۳۸/۸۸**
	StFtsH10	۴	۱۳۸۵/۰۹**
	StFtsH6	۴	۳۰۰۹/۵۵^{ns}

**: در سطح ۱ درصد معنی‌دار است. ns: یعنی سطح معنی‌داری در ۱ درصد معنی‌دار نیست

تنش سرما

نتایج بررسی الگوی بیان ژن‌ها نشان داد که تنش سرما بر روی بیان ژن StFtsH5 در ساقه در ۴۸ ساعت و برگ در ۲۴ ساعت بعد از تنش و StFtsH6 درساقه و ریشه در ۴۸ ساعت بعد از تنش اثر می‌گذارد. این نتایج حاکی از آن است که این ژن احتمالا نقش تنظیمی مثبت در پاسخ به تنش سرمایی دارد. بیان این ژن منجر به کاهش محتوای پرولین، H_2O_2 و O^{-2} را کاهش می‌دهد. همچنین این احتمال وجود دارد که سطح بیان سایر ژن‌های مرتبط دفاعی نیز همراه با StFtsH5 افزایش خواهد داشت (۲۸).

ژن StFtsH10 در برگ در ۴۸ ساعت بعد از تنش بیشترین بیان را داشت (شکل ۱). براساس مطالعات دیگر FtsH5 و FtsH8 تحت تنش سرما، گرما و نور زیاد افزایش بیان داشتند (۱۰). مطالعه دیگر نشان داد که FtsH2 و FtsH6 تحت تنش‌های سرما، گرما و نور زیاد افزایش بیان داشتند در حالی‌که این پروتئازها نقش حیاتی در تخریب پروتئین تحت تنش‌های غیر زیستی دارند (۲۱). علاوه‌براین نتایج این مطالعه نشان داد که FtsH2 بیان بالاتری نسبت به FtsH6 تحت تنش داشته است. ژن LeFtsH6 در سطح بالایی در برگ، ریشه و گل در گوجه‌فرنگی تراریخته بیان

شدند. مطالعات دیگر بر روی گندم، کلزا و سورگوم نشان داد که FtsH6 تحت تنش خشکی و گرما افزایش بیان داشتند (۶،۳۱،۲۹). ژن CaFtsH6 افزایش بیان معنی‌داری به تنش خشکی، شوری و گرما دارد و خاموشی این ژن باعث حساسیت به تنش‌های ذکر شده در گیاه می شود (۲۸). Xiao و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که ژن CaFtsH6 ممکن است نقش مهمی در تحمل به تنش شوری، گرما و خشکی داشته و از طریق انباشت H_2O_2 و القای سطح رونویسی ژن‌های مرتبط با دفاع دخالت داشته باشند. پژوهشی دیگر نشان داد که FtsH10 با FtsH3 همولوگ است که عملکرد مشابه را در تنش‌های مختلف پیش‌بینی می‌کند. نتایج مطالعه دیگر نشان داد که حذف ژن AtFtsH3 باعث تأخیر در رشد بذر و جوانه‌زنی آن در آرابیدوپسیس در مقایسه با نوع وحشی می‌شود. جهش‌یافته FtsH3 فنوتیپ متحمل به تنش‌های غیرزیستی را نشان داد (۳۲).

تنش گرما

نتایج بدست‌آمده از بیان ژن نشان داد که تنش گرما باعث افزایش بیان ژن‌های StFtsH5 و StFtsH10 می‌شود. ژن StFtsH5 هم در برگ و ریشه در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تنش افزایش بیان داشت. همچنین ژن StFtsH10 نیز در ساقه در ۲۴ ساعت بعد از تنش افزایش بیان نشان داد (شکل ۱).

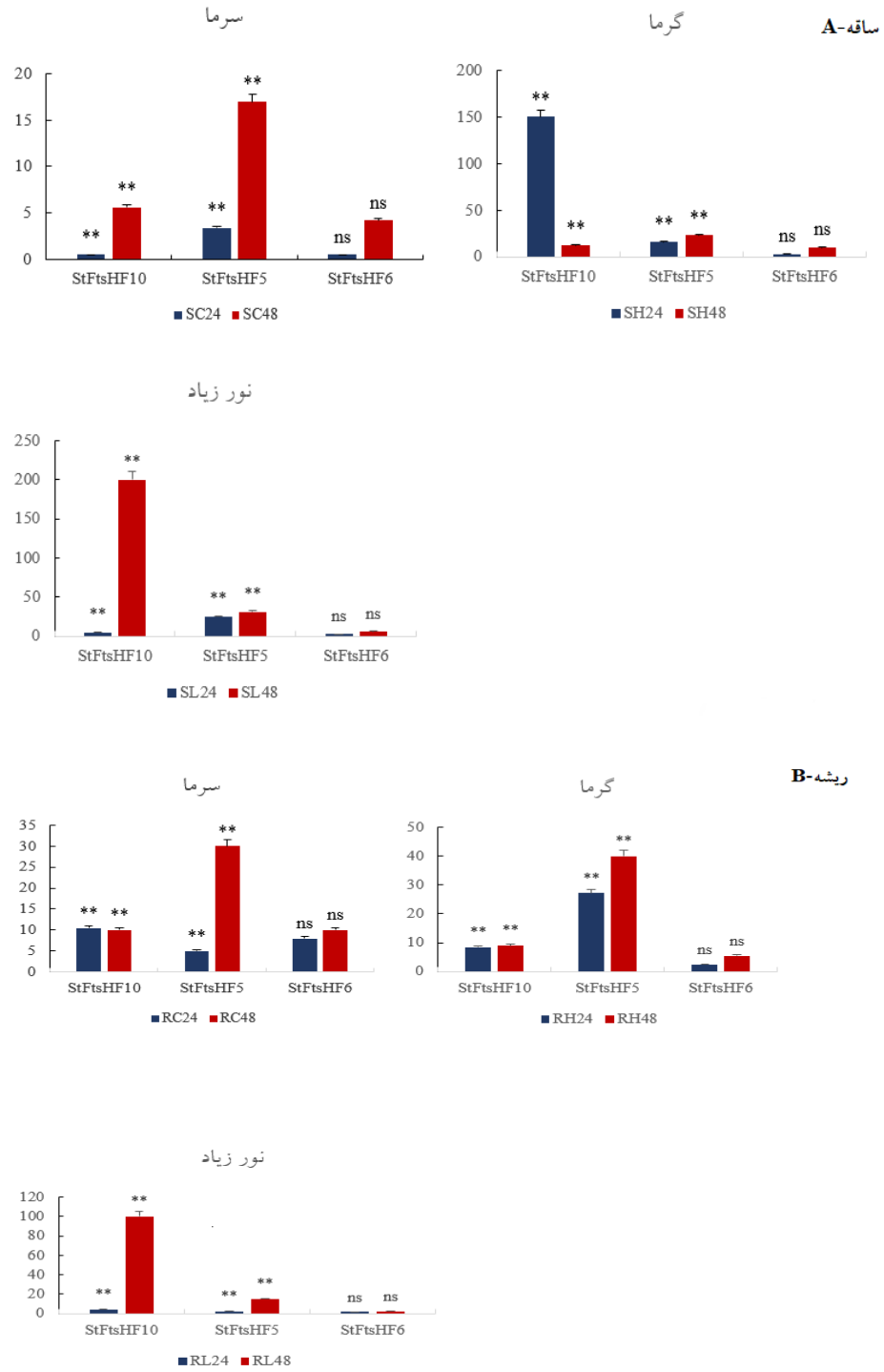
براساس پژوهشی که بر روی آرابیدوپسیس انجام شد مشخص گردید که AtFtsH5 در شوری و تنش‌های اسمزی و گرما القا شد، درحالی که گیاه جهش‌یافته سطح بیان پایینی از AtFtsH5 تحت این تنش‌ها از خود نشان داد (۱۴). در گوجه‌فرنگی بیان ژن FtsH نه تنها در گرما بلکه در مراحل رشدی خاصی القا می‌شود (۲۶). در آرابیدوپسپس، ژن FtsH6 در سطوح رونویسی بسیار پایین در شرایط نرمال بیان می‌شود. متالوپروتئاز FtsH6 (AT5G15250) که در پلاستیدها قرار دارد به‌سرعت تحت تنش گرمایی انباشته می‌شود (۲۲). در میان ۳۹ پروتئاز پلاستیدی پروتئاز FtsH6 بیشترین بیان را تحت تنش گرمایی به خود اختصاص می‌دهد. بعد از تنش گرمایی، ژن LeftsH6 گوجه‌فرنگی سطوح بالایی از رنگ‌آمیزی GUS در برگ، ریشه و گل در گوجه‌فرنگی تراریخته تحت تنش گرمایی را نشان می‌دهد (۲۶). علاوه‌براین مطالعه دیگری که بر روی کلزا، گندم و سورگوم انجام شد مشاهده شد که ژن FtsH6 تحت تنش گرمایی افزایش بیان داشته‌است. اما القای FtsH6 تحت تنش گرمایی حاکی از آن است که حفاظت‌شدگی تکاملی هسته‌ای در پاسخ به تنش‌های محیطی دارد. نتایج محققان نشان داد که با خاموشی ژن CaFtsH06 افزایش آسیب به غشای سلولی در فلفل منجر شد. علاوه‌براین خاموشی این ژن محتوای کلروفیل در مقایسه با نمونه شاهد کاهش می‌یابد که به نوبه خود ممکن است کارایی فتوسنتز نیز کاهش دهد. تحت شرایط تنش مختلف، تجمع بیش از حد ROS مانند H_2O_2 و O_2^- احتمالا منجر به آسیب غشا و نیز ماکرومولکول‌های دیگر مثل پروتئین‌ها، لیپیدها و دستگاه فتوسنتزی شود (۱،۲۵). بنابراین، محتویات H_2O_2 و O_2^- نیز نشانگر سطح آسیب به سلول‌های گیاهی تحت شرایط تنشی می‌باشند (۱۲).

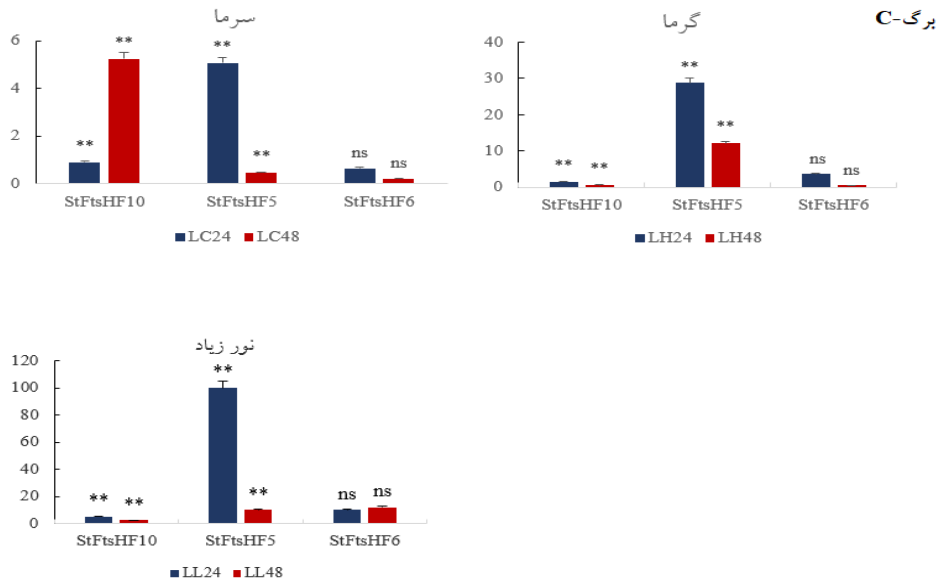
تنش نور زیاد در این پژوهش مشاهده شد که ژن‌های StFtsH5 و StFtsH6 در برگ در ۲۴ ساعت بعد از تنش افزایش بیان داشتند. در حالی‌که StFtsH10 در ریشه و ساقه در ۴۸ ساعت بعد از تنش افزایش بیان داشت (شکل ۱). براساس مطالعات قبلی AtFtsH6 و AtFtsH5 در نور زیاد افزایش بیان داشته است. موتاسیون ftsh6 قادر به تجزیه Lhcb3 و Lhcb1/3 در طول تنش تنش نوری زیاد نمی‌باشد (۳۲). جهشی در ژن AtFtsH5 به تنهایی منجر به تنوع کمی در مورفولوژی می‌شود (۱۸) درحالی‌که غیرفعال‌سازی AtFtsH1 و AtFtsH8 در جهش‌یافته‌ای دارای T-DNA منجر به تنوع برگی یا حساسیت به نور زیاد نمی‌شود (۱۹). فقدان ژن AtFtsH5 یا AtFtsH2 در جهش‌یافته‌های var2یا var1 به ترتیب AtFtsH1 و AtFtsH8 را تکمیل می‌کنند. الگوی بیان موقتی ژن‌های AtFtsH1، AtFtsH2، AtFtsH5 و AtFtsH8 مشابه است که بوسیله مطالعات همجوشی پروموتر بتاگلوکرونیداز (GUS) نشان داده‌شده‌است (۳۰). چهار ژن FtsH (AtFtsH1، AtFtsH5، AtFtsH2 و AtFtsH8) در غشاهای تیلاکوئیدی به عنوان هتروکمپلکس عملکردی متشکل از زیرواحدهای نوع A و نوع B وجود دارد. بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهد که پروتئاز FtsH درگیر در حذف پروتئولیتیکی از پروتئین غشایی آسیب‌دیده و تخریب‌شده توسط اکسیداتیو هستند. مدت‌هاست که ثابت شده‌است که تخریب پروتئین D1 در چرخه ترمیم PSII ناشی از مهار نوری است. حذف نسخه‌های آسیب‌دیده پروتئین D1 یک پیش‌نیاز برای مونتاژ مجدد کمپلکس PSII با نسخه‌های جدید سنتزشده از D1 است. گزارشات اخیر نشان می‌دهد که پروتئاز Deg1 که در لومن جای دارد با کمپکس پروتئازی FtsH1-2-5-8 در استرما و Deg2 در تجزیه پروتئین Deg1 در طول ترمیم از مهار نوری با جداکردن مناطقی از پروتئین لومن همکاری می‌کند (۷). علاوه‌براین پروتئازهای FtsH نقش کلیدی در تعمیر PSII تحت آسیب تابش اشعه UV-B و شرایط استرس گرمایی ایفا می‌کند (۱۱). همولوگ‌های FtsH گیاهی واکنش‌های مختلفی به شرایط تنشی نشان می‌دهند. ژن DS9 در تنباکو (یک ژن شبه ftsh) به طور اساسی به عنوان یک ژن خانه‌داری که در برگ سالم بیان می‌شوند (۲۳). در مقابل بیان ژن‌های AtFtsH1، AtFtsH5 و AtFtsH2 وابسته به نور است (۱۳). جالب توجه‌است که در یونجه، ژن ftsh به طور مستقل بوسیله دمای یا نور پایین تنظیم می‌شود (۵). اگرچه تحقیقات زیادی در مورد پاسخ ژن‌های ftsh به تنش در گیاهان انجام‌نشده‌است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که در میان سه ژن StFtsH5، StFtsH6 و StFtsH10، ژن StFtsH5 بیشترین افزایش بیان را در سه بافت ریشه، ساقه و برگ تحت تنش سرما، گرما و نور زیاد داشت. این تغییرات بیان در دو زمان ۲۴ و ۴۸

ساعت بعد از اعمال تنش یکی از دلایل احتمالی تحمل به سه تنش فوق الذکر می‌باشد. نتایج ما نشان می‌دهد که StFtsH5 نقش مهمی در تحمل به تنش‌های فوق‌الذکر دارد از طریق ممانعت القا H_2O_2 و همچنین سطح رونویسی ژن‌های مرتبط دفاعی را القا می‌کند. تجمع H_2O_2 و O_2^- احتمالا در طی تنش‌های غیرزیستی در سلول گیاهی ایجاد می‌شود. منجر به آسیب غشا و نیز ماکرومولکول‌های دیگر مثل پروتئین‌ها، لیپیدها و دستگاه فتوسنتزی می‌شود. از طرفی بین تحمل به تنش سرما، گرما و نور زیاد و میزان بیان این ژن‌های مورد مطالعه، می‌توان ارتباط وابسته به زمان را نیز تشخیص داد. به‌طوری که این سه ژن بیشتر در ۴۸ ساعت بعد از تنش افزایش بیان داشتند. اما StFtsH5 در هر دو زمان افزایش بیان معنی‌داری را در تحمل به تنش نشان می‌دهند. این انتظار می‌رود که این ژن نقش محوری در سازگاری گیاه به تنش‌های محیطی دارد. این نتایج نشان داد که ژن StFtsH5 در تنش‌های غیرزیستی ارتباط بیشتر با مکانیسم مولکولی گیاه تحت تنش غیرزیستی داشته که این ژن می‌تواند به عنوان ژن نامزد در تحمل به تنش‌های سرما، گرما و نور زیاد به اصلاح‌گران و مهندسان ژنتیک در سیب‌زمینی معرفی گردد.





**: در سطح ۱ درصد معنی‌دار است. ns: یعنی سطح معنی‌داری در ۱ درصد معنی‌دار نیست.

شکل ۱- بررسی بیان سه ژن StFtsH5، StFtsH6 و StFtsH10 در سه بافت ریشه، ساقه و برگ تحت تنش سرما، گرما و نور زیاد. A) که SC24 و SC48 (ساقه تحت تنش سرما بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت)، SH24 و SH48 (ساقه تحت تنش گرما بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت) و SL24، SL48 (ساقه تحت تنش نور زیاد بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت). B) RC24، RC48 (ریشه تحت تنش سرما بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت)، RH24، RH48 (ریشه تحت تنش گرما بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت) و RL24، RL48 (ریشه تحت تنش نور زیاد بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت). C) ، LC24، LC48 (برگ تحت تنش سرما بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت)، LH24، LH48 (برگ تحت تنش گرما بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت) و LL24، LL48 (برگ تحت تنش نور زیاد بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت).

Figure 1. A. Three FtsH genes (StFtsH10, StFtsH6, and StFtsH5) and their expression in three potato tissues (stem, root, leaves) under cold, heat, and high-light stresses. SH24, SH48, (Stem under 24h and 48h heat stress), SC24, SC48, (Stem under 24h and 48h cold stress), SL24, SL48, (Stem under 24h and 48h high light stress), B. RH24, RH48, (Root under 24h and 48h heat stress), RC24, RC48, (Root under 24h and 48h cold stress), RL24, RL48, (Root under 24h and 48h high light stress), C. LH24, LH48 (Leaf under 24h and 48h heat stress), LC1, LC2 (Leaf under 24h and 48h cold stress), LL1, LL2 (Leaf under 24h and 48h high light stress).

منابع

1. Gill, S.S. and N. Tuteja 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.
2. Gottesman, S. 1996. Proteases and their targets in Escherichia coli. Annual Review of Genetics, 30: 465-506.
3. Gottesman, S., S. Wickner and M.R. Maurizi 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. Genes & Development. 11: 815-823.
4. Hajibarat, Z., A. Saidi and Z. Hajibarat. 2018. Bioinformatics analysis of MADS-box in Brachypodium distachyon. Crop Biotechnology, 8: 1-15 (In Persian).
5. Ivashuta, S., R. Imai, K. Uchiyama, M. Gau and Y. Shimamoto. 2002. Changes in chloroplast FtsH-like gene during cold acclimation in alfalfa (Medicago sativa). Journal of plant physiology, 159(10): 85-90.
6. Johnson, S. M., F.L. Lim, A. Finkler, H. Fromm, A.R. Slabas and M.R. Knight. 2014. Transcriptomic analysis of Sorghum bicolor responding to combined heat and drought stress. BMC genomics, 15(1): 1-19.
7. Kapri-Pardes, E., L. Naveh and Z. Adam. 2007.The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in Arabidopsis. The Plant Cell, 19(3): 1039-1047.
8. Kato, Y. and W. Sakamoto. 2010. New insights into the types and function of proteases in plastids. International review of cell and molecular biology, 280: 185-218.
9. Kato, Y. and W. Sakamoto. 2018. FtsH protease in the thylakoid membrane: physiological functions and the regulation of protease activity. Frontiers in Plant Science, 9: 855.

10. Komayama, K., M. Khatoon, D. Takenaka, J. Horie, A. Yamashita, M. Yoshioka, Y. Nakayama, M. Yoshida, S. Ohira, N. Morita and M. Velitchkova. 2007. Quality control of photosystem II: cleavage and aggregation of heat-damaged D1 protein in spinach thylakoids. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1767(6): 838-846.
11. Li, M., L. Ji, Z. Jia, X. Yang, Q. Meng and S. Guo. 2018. Constitutive expression of CaHSP22. 5 enhance chilling tolerance in transgenic tobacco by promoting the activity of antioxidative enzymes. Functional Plant Biology, 45(5): 575-585.
12. Lindahl, M., C. Spetea, T. Hundal, A.B. Oppenheim, Z. Adam and B. Andersson. 2000. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. The Plant Cell, 12(3): 419-431.
13. Lopes, K.L., R.A. Rodrigues, M.C. Silva, W.G. Braga and M.C. Silva-Filho. 2018. The Zinc-finger thylakoid-membrane protein FIP is involved with abiotic stress response in Arabidopsis thaliana. Frontiers in plant science, 9: 504.
14. Mishra, L.S. and C. Funk. 2021. The FtsHi Enzymes of Arabidopsis thaliana: Pseudo-Proteases with an Important Function. International Journal of Molecular Sciences, 22(11): 5917.
15. Navabpour, S., K. Morris, R. Allen, E. Harrison, S.A.H. Mackerness and V. Buchanan-Wollaston. 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. Journal of Experimental Botnay, 54(391): 2285-2292.
16. Saidi, A., Z. Hajibarat and Z. Hajibarat. 2021. Phylogeny, gene structure and GATA genes expression in different tissues of solanaceae species. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 35: 102015.
17. Sakamoto, W. 2003. Leaf-variegated mutations and their responsible genes in Arabidopsis thaliana. Genes & genetic systems, 78(1): 1-9.
18. Sakamoto, W. 2006. Protein degradation machineries in plastids. Annual review of plant biology, 57: 599-622.
19. Sakamoto, W., A. Zaltsman, Z. Adam and Y. Takahashi. 2003. Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in Arabidopsis thylakoid membranes. The Plant Cell, 15(12): 2843-2855.
20. Sakuraba, Y., S.H. Lee, Y.S. Kim, O.K. Park, S. Hörtensteiner and N.C. Paek. 2014. Delayed degradation of chlorophylls and photosynthetic proteins in Arabidopsis autophagy mutants during stress-induced leaf yellowing. Journal of experimental botany, 65(14): 3915-3925.
21. Sedaghatmehr, M., B. Mueller-Roeber and S. Balazadeh. 2016. The plastid metalloprotease FtsH6 and small heat shock protein HSP21 jointly regulate thermomemory in Arabidopsis. Nature communications, 7(1): 1-14.
22. Seo, S., M. Okamoto, T. Iwai, M. Iwano, K. Fukui, A.Isogai, N. Nakajima and Y. Ohashi. 2000. Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus–infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction. The Plant Cell, 12(6): 917-932.
23. Sinvany-Villalobo, G., O. Davydov, G. Ben-Ari, A. Zaltsman, A. Raskind and Z. Adam. 2004. Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondrial proteases. Plant Physiology, 135(3): 1336-1345.
24. Srivastava, V.K., S. Raikwar, R. Tuteja and N. Tuteja. 2016. Ectopic expression of phloem motor protein pea forisome PsSEO-F1 enhances salinity stress tolerance in tobacco. Plant cell reports, 35(5): 1021-1041.
25. Sun, A.Q., S.Y. Yi, J.Y. Yang, C.M. Zhao and J. Liu. 2006. Identification and characterization of a heat-inducible ftsH gene from tomato (Lycopersicon esculentum Mill.). Plant Science, 170(3): 551-562.
26. Wagner, R., H. Aigner and C. Funk. 2012. FtsH proteases located in the plant chloroplast. Physiologia Plantarum, 145(1): 203-214.
27. Xiao, J.J., R.X. Zhang, A. Khan, W.X. Gai and Z.H. Gong. 2021. CaFtsH06, A Novel Filamentous Thermosensitive Protease Gene, Is Involved in Heat, Salt, and Drought Stress Tolerance of Pepper (*Capsicum annuum* L.). International journal of molecular sciences, 22: 6953.
28. Xue, G.P., J. Drenth and C.L. McIntyre. 2015. TaHsfA6f is a transcriptional activator that regulates a suite of heat stress protection genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) including previously unknown Hsf targets. Journal of Experimental Botany, 66(3): 1025-1039.
29. Yu, F., S. Park and S.R. Rodermel 2005. Functional redundancy of AtFtsH metalloproteases in thylakoid membrane complexes. Plant Physiology, 138(4): 1957-1966.
30. Yu, F., S. Park and S.R. Rodermel. 2004. The Arabidopsis FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. The Plant Journal, 37(6): 864-876.
31. Żelisko, A., M. García-Lorenzo, G. Jackowski, S. Jansson and C. Funk. 2005. AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(38): 13699-13704.
32. Zhang, S., J. Wu, D. Yuan, D. Zhang, Z. Huang, L. Xiao and C. Yang. 2014. Perturbation of auxin homeostasis caused by mitochondrial FtSH4 gene-mediated peroxidase accumulation regulates Arabidopsis architecture. Molecular Plant, 7(5): 856-873.

Differential Expression of StFtsH5, StFtsH6, and StFtsH10 Genes in Potatoinduced by Cold, Heat, and High Light Stress

Abbas Saidi[1], Zahra Hajibarat[2], Mehrshad Zienalabedini[3] and Mohammad Reza Ghaffari[3]

1- Department of Plant Biotechnology and Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, (Corresponding author: abbas.saidi@gmail.com)
2- Department of Plant Biotechnology and Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
3- Department of Systems Biology, Iran Agricultural Biotechnology Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj
Received: 9 March, 2022 Accepted: 29 June, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: Abiotic stresses are among major factors limiting crop yields. Cold, heat, and high-light are the most important abiotic stress among plants. Thus, it is considered the understanding of molecular mechanisms response to stress. FtsH metallopeptidase is one of the key regulators of plant response to abiotic stresses. Many surveys were performed on the FtsH in different plants. However, there is not report on potato under cold, heat, and high-light stress.

Material and Methods: In this study, the gene expression of StFtsH5, StFtsH6, and StFtsH10 was evaluated in root, stem, and leaves under cold, heat, and high light stresses. Agria genotypes were planted under controlled greenhouse conditions. After cold, heat, and high light treatment duration, leaves, stem, and root sampling were performed under two conditions stress and normal after 24h and 48h treatment. The relative expression of selected genes was estimated.

Results: StFtsH5 gene was strongly up regulated in leaves and stem at the 24h and 48h under cold stress as compared to non-stress condition, respectively. Further, this gene had the higher mean relative expression than normal condition in root and leaves at the 24h and 48h under heat stress. At 24h after high light stress, the more mean relative increase StFtsH5 gene than control condition was observed. However, StFtsH6 gene is not increased gene expression under low temperature, and high light after utilization of stress treatment in leaves, stem, and root. StFtsH10 gene showed the significantly increased expression of in stem and root under high-light stress at the 48h. It showed an increase in gene expression in stem and leaves under cold stress at the 48h after stress treatment. However, this gene had the high gene expression in stem and root as compared to control at the 24h and 48h after stress treatment. The results of this study showed that StFtsH5 and StFtsH6 had the maximum and minimum gene expression in stem, leaves, and root under three stress treatments.

Conclusions: Among three genes, StFtsH5 showed the high expression in three tissues under cold, heat, and high-light stress. According to the above results, changes in gene expression of StFtsH5 could refer to the key roles of this gene in abiotic stresses, particularly cold, heat, and high light stresses.

Keywords: Abiotic stress, Agria, Cold, FtsH, Heat