تحديد الجينات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج في النبات باستخدام التقنيات الحيوية الحديثة

ظافر علي محمد القرني

المستخلص

يتمحور هذا البحث حول فكرة أن تعطيل جينات الموت الخلوي المبرمج ربما تساعد الخلية النباتية على تحمل درجات أعلى من الإجهادات البيئية. وعليه فقد تم أولاً استحداث تعبير الجينات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج في نبات الدخان نتيجة المعاملة بحمض الأوكزاليك التي تم التأكد من استحثاثها للموت الخلوي المبرمج بعد ٢٤ ساعة. وتم التأكد من ذلك من خلال دراسة الخلايا المعاملة بحمض الأوكزاليك على المستوى الجزيئي والكيماوي الحيوي باستخدام الإختبارات التقليدية التي ترصد بداية حدوث عملية الموت الخلوي المبرمج منها الصبغ بالـ Evans blue والتي ترصد الخلايا التي تعرضت للموت المبرمج عن طريق التلون بالصبغة وكذلك تم عزل الـ DNA من هذه الخلايا لتأكيد حدوث الموت المبرمج من خلال أحد الأدلة الجزيئية المعروفة بالـ DNA laddering الذي أوضح حدوث تكسير للـ DNA وهذا دليل يؤكد حدوث الموت الخلوي المبرمج نتيجة المعاملة بحمض الأوكزاليك بعد ٢٤ ساعة. كذلك تم دراسة عدد ١١ من الجينات القياسية المعروفة مسبقاً بارتباطها بعملية الموت المبرمج عن طريق وقف فعلها باستخدام خطوط الـ VIGS المتوفرة في المكتبة الجينية بجامعة كورنيل الأمريكية (من أ.د. جريجوري مارتن Boyce Thompson Institute, Cornell University, Ithaca, NY 14853-1801, USA) وأثبتت النتائج أن هذه الجينات القياسية مرتبطة فعلياً بزيادة حدوث الموت المبرمج باستثناء إثنين هما *ALD2H* and *plastocyanin* اللذان أظهرا عكس ذلك. وبدراسة تعبير الجينات الإحدى عشر أثناء عملية الموت المبرمج من خلال تقنية الـ qRT-PCR تم التأكد من حدوث تنظيم لفعل ستة منها هي *MEK2*, *SGT1*, *cathepsinB*, *BAK1*, *ALD2H* and *plastocyanin* حيث حدثت زيادة تدريجية في تعبير خمسة منها مع الوقت حتى ٢٤ ساعة أي مع بداية عملية الموت المبرمج بينما حدث نقص تدريجي في تعبير جين واحد فقط وهو الـ *cathepsinB* في الفترة ذاتها. من ناحية أخرى حدث عدم تغير في تعبير الخمسة جينات الأخرى وهي *MAP3Kα, NRC1, WIPK, RAR1* and *SIPK*– على غير المتوقع –

مع الوقت حتى ٢٤ ساعة. وإجمالاً يمكن القول أننا تأكدنا بشكل قاطع من حدوث عملية الموت المبرمج بعد ٢٤ ساعة من جراء تأثير حمض الأوكزاليك على أوراق النباتات العادية أو wild type (WT) وكذلك نباتات خطوط الـ VIGS للجينات القياسية.

بعد ذلك تم إرسال عينات الـ RNA المعزول من الدخان خلال مراحل الموت المبرمج المختلفة (صفر- ساعتين – ٦ ساعات – ١٢ ساعة - ٢٤ ساعة) إلى وحدة الجينوميا بجامعة ميتشجين Genomics Unit, Michigan State University, USA للتعرف على جينات جديدة مرتبطة بالموت الخلوي المبرمج من خلال تحليلات الـ RNA-Seq والمعلوماتية الحيوية Bioinformatics. كما قمنا بتقسيم الجينات الجديدة بناءاً على النموذج التعبيري Expression pattern الخاص بها مع التركيز بدرجة أساسية على عدد ١٦ نموذج تعبيري والذي حدث فيها زيادة كبيرة في تعبير جيناتها بعد ساعتين من المعاملة. ويفترض أن تعبير هذه الجينات له تأثير كبير إما على دفع أو وقف عملية الـ PCD. وقمنا باختيار عدد ٢٣ جين لها علاقة بعملية الموت المبرمج. وبعد تعطيل هذه الجينات في نبات الدخان باستخدام خطوط الـ VIGS أمكن تأكيد ارتباط خمسة جينات منها بعملية الموت الخلوي المبرمج في نبات الدخان. ومن ثم قمنا بالإستعانة بخطوط الوقف الجيني gene knockout لنبات الأرابيدوبسيس *Arabidopsis* لهذه الجينات من معهد سولك - معمل التحليل الجينومي SALK Institute, Genomic Analysis Laboratory, USA لدراسة تأثير وقف فعل هذه الجينات على تحمل النبات للملوحة (0, 100, 150 and 200 mM NaCl). وأظهرت النتائج أن خطوط الوقف الجيني في نبات الأرابيدوبسيس لأحد هذه الجينات هو *IB-1* - والذي زاد الموت الخلوي المبرمج في خطوط الـ VIGS الخاصة به في نبات الدخان - كانت أكثر حساسية للملوحة مقارنة بالكنترول بينما أظهر واحد من خطوط الوقف الجيني لأحد الجينات هو *Mlo* - والذي تعطل حدوث الموت الخلوي المبرمج في خطوط الـ VIGS الخاصة به في الدخان - مقاومة عالية للملوحة. وهذه النتائج تدعم الفكرة الأصلية للمشروع البحثي أن الجينات التي تثبط الموت الخلوي يمكن أن تساعد النبات على تحمل الملوحة بينما نجد أن الجينات التي تحفز الموت الخلوي يمكن أن تقلل من كفاءة النبات على تحمل الملوحة.

Identification of Genes Related to PCD in Plant via Modern Biotechnology

by

Dhafer Ali M. Alqarni

Abstract

Programmed cell death (PCD) is a fundamental process that occurs in eukaryotes and prokaryotes. The idea behind this research was the use of a natural exciting phenomenon suggesting that suppression of genes inducing programmed cell death (PCD) might help the plant cells to tolerate abiotic stresses more efficiently. The main objective of the current research study is the detection of PCD-related genes in tobacco (*N. benthamiana*) to be knocked down by inducing the RNAi machinery via virus induced gene silencing (VIGS) to ensure their role during PCD. Then, gene analogues in Arabidopsis were tested under salt stress.

First, PCD-related genes in tobacco were induced due to oxalic acid (OA) treatment (20 mM) that was proven to trigger PCD after 24 h. Plant cells were, then, characterized at the biochemical and molecular levels to confirm the incidence of PCD. Plant cells undergoing PCD were detected by the staining with Evans blue, then DNAs extracted during PCD were tested for laddering as the basic DNA molecular marker for plant PCD and results were positive after 24 h. Expression of eleven standard genes known for their effects during PCD was detected via VIGS (lines were kindly provided by Professor Dr. Gregory Martin, Boyce Thompson Institute, Cornell University, Ithaca, NY 14853-1801, USA). The results indicated that the standard

genes promoted PCD except for two genes, e.g., *ALD2H* and *plastocyanin* that showed opposite results. Then, we detected expression rates of these eleven genes during PCD across time of OA exposure via qRT-PCR. The results indicated the occurrence of gene regulation in six of them, e.g., *MEK2*, *SGT1*, *cathepsinB*, *BAK1*, *ALD2H* and *plastocyanin*, where five genes were upregulated and one (e.g., *cathepsinB*) was down-regulated. On the other hand, the other five genes were found, unexpectedly, non-regulated during PCD. These genes are *MAP3Kα*, *NRC1*, *WIPK*, *RAR1* and *SIPK*. Then, RNAs were extracted from tobacco cells 0, 2, 6, 12 and 24 h after OA treatment for deep sequencing.

Then, RNA-Seq analyses were done at Genomics Unit, Michigan State University, USA with a special emphasis to clusters whose PCD-related genes were upregulated after 2 h of OA treatment. Accordingly, 23 tobacco PCD-related genes were knocked down via virus-induced gene silencing (VIGS), whereas our results indicated the influence of five of them on inducing or suppressing PCD. Knockout T-DNA insertion mutants of these five genes in Arabidopsis (provided by SALK Institute, Genomic Analysis Laboratory, USA) were tested under salt stress (0, 100, 150, and 200 mM NaCl), and the results indicated that a mutant of an antiapoptotic gene, namely Bax Inhibitor-1 (BI-1), whose VIGS induced PCD in tobacco, was salt sensitive, while a mutant of an apoptotic gene, namely mildew resistance locus O (Mlo), whose VIGS suppressed PCD, was salt tolerant as compared to the WT (Col) control. These data support our hypothesis that retarding PCD-inducing genes can result in higher levels of salt tolerance, while retarding PCD-suppressing genes can result in lower levels of salt tolerance in plants.