ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤
صفحه ٥٩٦-٥٨٥

تغییر فعالیت ژن تولیدکننده سیستئین در گیاهان موتانت آرابیدوپسیس *old3* در واکنش به تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط کلرید کادمیوم

Change in cysteine synthase gene function in Arabidopsis *old3* mutant plants in response to oxidative stress-induced by cadmium chloride

فرناز نوروزی[۱]، رضا شیرزادیان خرم‌آباد*[۱]، محمود قاسم نژاد[۱]، عاطفه صبوری[۱]، پیمان منبری[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران، دانشیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان

Norouzi F[1], Shirzadian-Khorramabad R[*1], Ghasemnezhad M[1], Sabouri A[1], Manbari P[1]

1. MSc Student, Assistant Professors, Associate Professor, MSc Student, University of Guilan, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: R.shirzadian@gmail.com

(تاریخ دریافت:۹۳/۳/۱۷- تاریخ پذیرش:۹۳/۹/۱۸)

چکیده

گیاه آرابیدوپسیس *old3* (Onset of Leaf Death3) دارای یک جهش نقطه‌ای در ژن سنتزکننده سیستئین (*AT4G14880*) است. از جمله عملکردهای ژن *OLD3* سم‌زادیی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو است. رشد گیاهچه‌های موتانت *old3* در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد موجب القا مرگ سلولی در این گیاهان در مدت ۱۲ روز می‌شود. از آنجاکه رشد گیاهان موتانت *old3* در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به وضعیت نرمال باز می‌گردد، لذا در این تحقیق مقاومت گیاهچه‌های موتانت *old3* در غلظت‌های مختلف کادمیوم در دو دمای ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت و با گیاهان وحشی *erecta* Landsberg (*Ler-0*) که فاقد موتاسیون *old3* می‌باشد، مقایسه شد. در این بررسی میزان جوانه زنی بذور، میزان رشد طولی و وزن‌تر گیاهچه‌های ۱۱ روزه اندازه‌گیری شد. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در گیاهچه‌های موتانت و میزان بیان نسبی ژن‌های نشانگر در تنش اکسیداتیو شامل *DEFL* و *GST1* با استفاده از روش QPCR بررسی شد. نتایج به دست آمده بر اساس آزمایش اسپیلت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. تغییر دما از ۲۲ به ۲۸ درجه سانتی‌گراد موجب افزایش قابل ملاحظه‌ای در رشد طولی گیاهچه‌ها، وزن تر و سرعت جوانه‌زنی شد که این افزایش برای گیاهچه‌های *old3* چشم‌گیر بود. با این حال گیاهان مادری در هر دو دمای ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد دارای مقاومت بیشتری به آلودگی ایجاد شده توسط کادمیوم بودند. بررسی آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و بیان نسبی ژن‌های *DEFL* و *GST1* در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و بیان نسبی ژن‌های *DEFL* و *GST1* در دمای ۲۸°C در برگ‌های *old3* بیشتر از برگ‌های مادری است. بر اساس نتایج به دست آمده تغییر دما از ۲۲ به ۲۸ درجه سانتی‌گراد موجب بهبود وضعیت رشد، نمو و مقاومت گیاهچه‌های *old3* در واکنش به آلودگی ایجاد شده توسط کادمیوم شده است. البته گیاهچه‌های *old3* در دو دمای بررسی شده از حساسیت بیشتری به آلودگی ایجاد شده توسط کلرید کادمیوم در مقایسه با گیاهان مادری برخوردار بودند. لذا عملکرد ژن *OLD3* در زمینه کنترل آلودگی کادمیوم مستقل از دما می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس
تنش اکسیداتیو
جهش نقطه‌ای *old3*
کلرید کادمیوم

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]

مقدمه

آرابیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*) گیاهی کوچک، یکساله، روز بلند از خانواده خردل[1] و دارای موتانت‌های فراوان با تنوع ژنتیکی گسترده است. ژنوم آن کوچک بوده و بعنوان یک مدل، نقش مهمی را در مطالعات زیست شناسی گیاهی داشته و به طور گسترده در مطالعات فیزیولوژی گیاهی، زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Meinke et al. 1998).

تنش به عنوان عاملی شناخته می‌شود که مانع از پدید آمدن یک سیستم بیولوژیکی کارآمد می‌شود. عوامل القا کننده تنش به دو گروه تنش‌های زیستی مانند قارچ‌ها و حشرات و تنش‌های غیر زیستی از قبیل دماهای نامطلوب، شوری، خشکی و عناصر سنگین از قبیل کادمیوم و سرب تقسیم‌بندی می‌شوند (Kranner et al. 2010). آلودگی ایجاد شده توسط ترکیبات سمی مانند فلزات سنگین از جمله مشکلات زیست محیطی محسوب می‌شود. گیاه برای ادامه حیات و مقابله با چنین تنش‌هایی ناگزیر به افزایش فعالیت سیستم ایمنی خود می‌باشد (Boner et al. 2005). تنش به هر شکلی، زنده یا غیرزنده عموما منجر به افزایش میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن[2] (ROS) می‌شود (Raikhel 1992). متداول‌ترین اعضای ROS متشکل از پروکسیدهیدروژن (H_2O_2)، سوپراکسید(O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل(OH^-) و اکسیژن منفرد می‌باشد. گیاهان نیز دارای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی در اندامک‌های مختلفی از قبیل کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها بوده که دارای اجزای آنزیمی و غیر آنزیمی است و سبب زدودن[3] ROS می‌شوند (Sharma et al. 2012). همچنین در روند دفاعی گیاهان، در مقابله با تنش ایجاد شده توسط فلزات سنگین، سیستئین دارای نقش تعیین کننده‌ای می‌باشد. برای تولید سیستئین در گیاه، سولفات که طی فرایندهای مختلف شیمیایی در گیاه به سولفید تبدیل شده، توسط آنزیم OAS-TL سیتوزولی با O-acetyl serine ترکیب شده و تولید سیستئین می‌کند (Boner et al. 2005). آنزیم OAS-TL که در مرحله آخر تولید سیستئین نقش دارد، در سه ارگانل سیتوزول، واکوئل و میتوکندری سنتز می شود، که در این میان ایزوآنزیم سیتوزولی OAS-TL دارای نقش حیاتی است. تحمل گیاهان در مقابل فلزات سنگین به صورت جمع‌آوری این عناصر از درون بافت گیاه توسط فیتوکلاتین‌ها و تجمع بیشتر و غیر فعال کردن آن در واکوئل‌های گیاه به ویژه در ناحیه کرک‌ها صورت می‌گیرد. زمانی که گیاه توسط فلزات سنگین مورد تهدید قرار می‌گیرد، میزان سولفور به طرز چشم گیری در کرک‌ها افزایش می‌یابد که این افزایش منجر به تولید بیشتر سیستئین برای تولید گلوتاتیون و فیتو کلاتین‌ها و در نهایت جمع‌آوری فلزات سنگین در واکوئل می‌شود (Dominguez-Solis et al. 2001). در مواجه با تنش اکسیداتیو القا شده در گیاه، میزان بیان ژن‌های مرتبط با واکنش‌های دفاعی افزایش پیدا می‌کند، از جمله این ژن‌ها می‌توان به Senescence، Pathogen resistance genes (*PRs*)، Defensin-lik(*DEFL*)، Associated gene (*SAGs*)، Glutathione S-transferase I(*GST1*) و Onset of leaf death3(*OLD3*) اشاره کرد. وجود کادمیوم در محیط رشد گیاهان باعث تغییر بیان برخی از ژن‌های فوق می‌شود (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010). چون واکنش گیاهان به تنش ناشی از کادمیوم به نوعی موجب فعالیت سیستم دفاعی گیاه در مواجه با تنش‌های اکسیداتیو است، لذا بیان ژن *DEFL* به عنوان یکی از ژن‌های نشانگر مرتبط با تنش اکسیداتیو در گیاهان در معرض کادمیوم افزایش می‌یابد (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010).

گیاه آرابیدوپسیس *old3* گیاهی جهش یافته‌ای است که در ژن تولید کننده سیستئین (OAS-TL) دارای موتاسیون می‌باشد. فنوتیپ کشنده *old3* در نتیجه یک جهش نقطه‌ای در ژن رمز کننده OAS-TL سیتوزولی تولید می‌شود و فنوتیپ حاصل در ارتباط با پاسخ‌های دفاعی و بیان ژن‌های مارکر تنش‌های اکسیداتیو بوجود می‌آید (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010). در گیاه موتانت *old3*، یک جهش نقطه‌ای سبب تبدیل آمینو اسید Gly^{162} به Glu^{162} شده‌است (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010). این جهش با تغییر در میزان بار و اندازه آمینواسید همراه بوده و با ایجاد اختلال در ساختار و فعالیت آنزیم، مانع اتصال کوفاکتور به آنزیم می‌شود. چون آنزیم

[1] Brassicacea
[2] Reactive oxygen species
[3] Scavenging

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]

OAS-TL نقش اساسی در تولید سیستئین و ایجاد مقاومت نسبت به کادمیوم دارد، آنزیم موتانت نمی‌تواند واکنش لازم را هدایت کند و در نتیجه گیاهان موتانت *old3* نسبت به کادمیوم حساسیت بیشتری پیدا می‌کند که در نهایت منجر به مرگ گیاه می‌شود. گیاهان *old3* در درجه حرارت ۲۱ درجه سانتی‌گراد بعد از ۱٤ روز دچار مرگ سلولی شده و از بین می‌روند (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010)

در این تحقیق از کلرید کادمیوم به عنوان القاء کننده تنش اکسیداتیو در شرایط *in vitro* استفاده شد. سپس به بررسی واکنش‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان موتانت *old3* آرابیدوپسیس در واکنش به تنش اکسیداتیو القا شده توسط کلرید کادمیوم پرداخته و نتایج حاصله با واکنش گیاهان مادری[1] (L*er-0*) مقایسه شد. لذا تاثیر تغییر دما از ۲۲ به ۲۸ درجه سانتی-گراد بر میزان کاهش حساسیت گیاهان *موتانت old3* به کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فوق می‌تواند به درک نحوه عملکرد ژن *OLD3* کمک کند.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۹۱ انجام گرفت. در این به بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان موتانت *old3* (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010) و مادری (L*er*-0) آرابیدوپسیس در شرایط تنش اکسیداتیو القاء شده توسط کلرید کادمیوم پرداخته شد. جهت بررسی جوانه زنی بذور جهش یافته (*old3*) و مادری (L*er*-0) در دماهای (۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد) و غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول)، ابتدا بذور گیاهان موتانت *old3* و گیاهان مادری (L*er*-0) با آب ژاول ۰/۲۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شده و سه مرحله آبشویی انجام شد. پس از آن به منظور جوانه زنی یکنواخت، بذور به مدت دو روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس در هر پتری دیش حاوی محیط MS تعداد ۳۰ عدد بذر استریل در سه تکرار کشت شد و در دماهای ۲۱ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد با شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد. جوانه‌زنی بذور *old3* و L*er*-0 کشت شده بر مبنای کد رشدی ۰/۵ و ۰/۷ ارزیابی شد. بدین منظور شمارش بذور جوانه-زده به مدت چهار روز متوالی به وسیله بینوکولار انجام شد و تعداد بذور جوانه زده بر اساس روش ارائه شده توسط Boyes et al. (2001) در هر پتری‌دیش شمارش و ثبت شد. آزمایش به صورت اسپیلت فاکتوریل با سه عامل دما، ژنوتیپ، غلظت با سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا و نتایج با استفاده از نرم-افزارهای SAS نسخه ۹/۱ و Excel 2010 تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی ($P \leq ۰/۰۵$) انجام شد. به منظور تهیه نمونه جهت بررسی صفات فنوتیپی گیاهچه-های موتانت*old3* و مادری L*er*-0، بذرها به مدت ۱۰ روز بر روی محیط کشت MS بدون تنش قرار گرفتند. سپس به محیط MS جدید حاوی کلرید کادمیوم در غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول انتقال و پس از چهار روز گیاهچه‌ها جهت بررسی صفات ارزیابی شدند.

جهت بررسی طول گیاهچه‌های موتانت *old3* و مادری L*er*-0، گیاهچه‌ها به مدت ۱۰ روز بر روی محیط کشت بدون تنش قرار گرفتند و سپس به محیط حاوی کلرید کادمیوم در غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول برای مدت چهار روز دیگر انتقال یافتند و در پایان روز ۱٤ نمونه‌گیری جهت اندازه گیری طول گیاهچه ها صورت گرفت. اندازه‌گیری طول گیاهچه‌های L*er-0* و *old3* از نوک ساقه تا انتهای ریشه برای ۹ گیاهچه انجام شد. داده-های به دست آمده با نرم‌افزار (SAS, V9.CFG) تجزیه و تحلیل شد.

جهت بررسی وزن تر شاخساره و ریشه گیاهچه‌ها بر اساس شرایط آزمایشی ذکر شده در بالا، از هر ژنوتیپ سه تکرار انتخاب شده و وزن تر ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل در ۱۰ گیاه بدون ریشه (۱٤ روزه) به وسیله ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ در گیاهان موتانت *old3* و گیاهان مادری (L*er-0*) انجام شد

به منظور سنجش میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدان شامل آسکوربات پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT)، ابتدا استخراج عصاره آنزیمی بر مبنای روش Beauchamp and Fridovich (1971) انجام گرفت.

[1] Lands berg *erecta*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]

جدول۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این آزمایش‌ها

نام آغازگر	توالی آغازگر (۳'-۵')	طول آغازگر (bp)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
GST1- Forward	CAGCCACTAGAAGAGTTCTCAT	۲۱	۵۸/۲
GST1-Reverse	GTGGGCACCAGATAAAGCGAC	۲۱	۵۹/۷
DEFL-Forward	CTTAGTCATTTCCGATGTGCC	۲۱	۵۳/۷
DEFL-Rewerse	GCATCTTCCACCTTTAGCTC	۲۰	۵۵/۳
ACTIN2-Forward	CCACTATGTTCTCAGGTATCG	۲۱	۵۲/۲
ACTIN2-Rewerse	CTTGGAGATCCACATCTGCT	۲۰	۵٤/۳

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس میزان درصد جوانه زنی در ژنوتیپ‌های جهش یافته (*old3*) و مادری (*Ler-0*) تحت تیمار دما و کادمیوم در کد رشدی ۰/۵

منابع تغییر (SOV)	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات		
		کد رشدی ۰/۵	طول گیاهچه‌ها	وزن تر کل
دما	۱	٤۱/۲۱*	۵۰/۷۰*	۰/۰۰۳۵**
تکرار(دما)	٤	۲/٦٤ns	۸/۳۰ns	۰/۰۰۰۰۰۹ns
ژنوتیپ	۱	۱۰/٤۹ns	۱٤/۸۱ns	۰/۰۰۱**
کادمیوم	۲	۱٤/۱۵ns	۳٦۸٤/۱۷**	۰/۰۰۱۷**
ژنوتیپ × کادمیوم	۲	۰/۲۰ns	٦۲/۸۹**	۰/۰۰۰۰۱ns
ژنوتیپ × دما	۱	۰/۰۱ns	۹/٤۸ns	۰/۰۰۰۰٤ns
کادمیوم × دما	۲	۲/۸۷ns	۳۱/۱۲*	۰/۰۰۰۵**
ژنوتیپ × کادمیوم × دما	۲	۲/۲۰ns	۷۱/۰٦**	۰/۰۰۰۰۰۹
خطای آزمایش	۲۰	٦/۷۷	۹/۸۱	۰/۰۰۰۰۱
کل	۳۵			

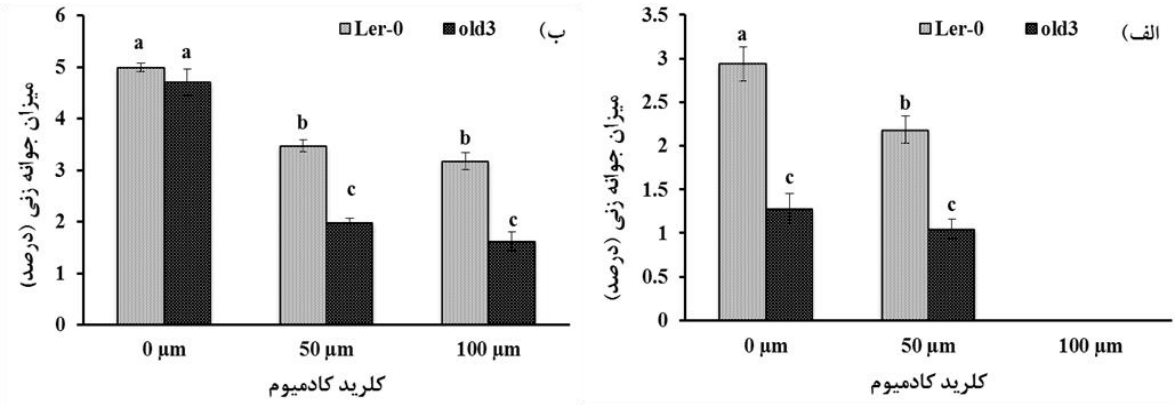
ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد.

سپس جهت سنجش میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش Nakano and Asada (1981) و به منظور اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز از روش Chance and Maehly (1955) و دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل PG Instruments ItdT80+UV/VIS) استفاده شد.

جهت مطالعه میزان بیان ژن‌های مورد نظر در غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کادمیوم، ابتدا از برگ گیاهچه‌ها نمونه‌گیری شد و سپس استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-plus™ (سیناژن) انجام شد. نسخه‌های تک رشته‌ای cDNA با استفاده از آنزیم 200U RevertAid H-minus MMuLV Transcriptase (Fermentase) و آغازگر الیگو dT ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی مطابق (جدول۱) جهت انجام Real Time PCR با استفاده از نرم‌افزار PerlPrimer v.1.1.10 طراحی و جهت ساخت توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) سفارش داده شد. هر واکنش تکثیر Real Time با حجم ۱۲/۵ میکرولیتر حاوی ٦/۲۵ میکرولیتر Master MIX (SYBG Green Fermentase)، cDNA ۰/۵ میکرولیتر، یک میکرولیتر از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *GST1* ، *ACTIN2*، *DEFL* و با Water nuclease free به حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر رسانیده شد. از ژن خانه‌دار *ACTIN2* جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. جهت تجزیه و نرمال‌سازی داده‌ها و رسم گراف‌ها از نرم‌افزار genex 2004 [پایه معادله Schmittgen and Livak (2001) یا همان $2^{-\Delta\Delta CT}$] متعلق به شرکت BIO-RAD (USA) استفاده شد. دستگاه مورد استفاده جهت انجام واکنش تکثیر BIORAD CFX96 (USA) مورد استفاده قرار گرفت. برنامه PCR در این واکنش‌ها به صورت C ۹٤° – ۵ دقیقه،٤۰× (C ۹٤°– ۱۵ ثانیه ، C ۵۸° – ۲۰ ثانیه و C ۷۲°– ۳۰ ثانیه) اعمال شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]



شکل۱- سرعت جوانه‌زنی بذور جهش‌یافته (*old3*) و مادری (L*er*-0) تحت تیمار دما وکادمیوم در کد رشدی ۰/۵ آرابیدوپسیس در روز اول جوانه‌زنی. مقایسه میانگین ($p \leq$۰/۰۵) ژنوتیپ‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد (الف) و مقایسه میانگین ($p \leq$۰/۰۵) ژنوتیپ‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (ب).

نتایج و بحث

گیاهان موتانت *old3* دارای یک جهش نقطه‌ای در ژن *AT4G1488* بوده که روی کروموزوم شماره چهار آرابیدپسیس قرار دارد. جهش نقطه‌ای فوق توسط موتاژن EMS در ژن *OLD3* در ژنوتیپ مادری (L*er*-0) آرابیدوپسیس ایجاد شده و با استفاده از روش Map Based cloning شناسایی شد (Jing et al. 2002; Shirzadian-Khorramabad et al. 2010). گیاهان موتانت *old3* بعد از مدت ۱٤ روز در درجه حرارت ۲۱ درجه دچار مرگ سلولی شده و از بین می‌روند، در حالی‌که با انتقال گیاهچه‌ها به دمای ۲۸ درجه این وضعیت از بین رفته و گیاه به رشد نرمال خود باز می‌شود. در واقع بین فعالیت OLD3 و سیستم ایمنی در گیاهان تعامل متقابل وجود دارد که برآیند این تعامل می‌تواند با توجه به دمای محیط رشد به میزان قابل توجهی تغییر کند (Tahir et al. 2013). سیستم پیام‌رسانی ایمنی در گیاهان و جانوران توسط MAKs (Mitogen-activated protein kinases) تنظیم می‌شود. از جمله این ژن‌ها می‌توان به *MEKK1* اشاره کرد که فعالیت آن برمیزان تجمیع H_2O_2 و روند فرآیند مرگ سلولی را در شرایط دمایی مختلف تغییر می‌دهد (Ichimura et al. 2006). لذا وقوع فنوتیپ مرگ سلولی در گیاهان L*er-0* که در اثر موتاسیون نقطه‌ای *old3* رخ داده خصوصیتی وابسته به دما است. از طرف دیگر، از آنجاکه یکی از عملکردهای اختصاصی ژن *OLD3* در آرابیدوپسیس افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو القا شده توسط فلز سنگین کادمیوم است (Dominguez-Solis et al. 2001)، بر این مبنا جوانه‌زنی بذور موتانت *old3* در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد دارای حساسیت قابل توجهی به آلودگی ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف کادمیوم بودند (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010). لذا میزان جوانه‌زنی بذور جهش یافته (*old3*) و مادری (L*er-0*) تحت تیمار دماهای مختلف و غلظت‌های مختلف کادمیوم در کد رشدی ۰/۵ بر اساس روش ارائه شده توسط Boyes et al. (2001) مورد بررسی قرار گرفت. بررسی میزان جوانه‌زنی بذور جهش‌یافته (old3) و مادری (Ler-0). نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های بررسی آزمایش میزان درصد جوانه‌زنی حاکی از تفاوت معنی‌دار متغیر دما ($p \leq$۰/۰۵) در کد رشدی ۰/۵ بوده و بیانگر آنست که سرعت جوانه‌زنی در دو دمای ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد در هر دو ژنوتیپ *old3* و L*er-0* متفاوت بوده‌است (جدول۲ و شکل۱-الف و ب). همانطور که در شکل ۱-الف ملاحظه می‌شود، بیشترین میزان درصد جوانه‌زنی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در ژنوتیپ مادری L*er-0* در غلظت صفر میکرومولار کادمیوم با میزان ۲/۹٤ درصد مشاهده شد که این میزان به ٤/۹۹ درصد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته‌است. لذا تغییر دما از ۲۲ به ۲۸ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش ۲/۰۵ درصدی در میزان درصد جوانه‌زنی بذور L*er-0* شده‌است. بذور موتانت *old3* در وضعیت مشابه دمایی مورد بررسی به میزان ۱/۱۹ درصد در دمای ۲۲ درجه و ٤/۷ درصد جوانه‌زنی را در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نشان دادند. لذا سبب افزایش ۳/۵۱ درصد جوانه‌زنی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد شده‌است (شکل۱- ب). نتایج حاصل از مقایسه

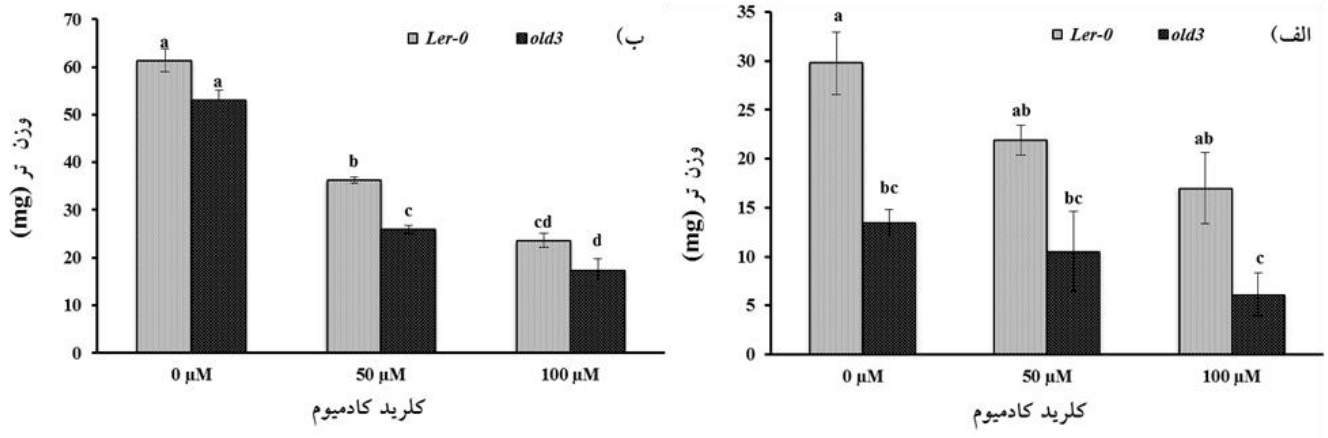
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]

میانگین ($P \leq ۰/۰۵$) بیانگر کاهش معنی‌دار جوانه زنی بذور موتانت *old3* در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول در لیتر کادمیوم نسبت به گیاهان مادری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده، اما در غلظت صفر میکرومول در لیتر کادمیوم با گیاهان مادری شاهد اختلافی مشاهده نشد. همچنین در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد میزان جوانه‌زنی در گیاهان موتانت *old3* در غلظت صفر میکرومول نسبت به گیاهان مادری کاهش معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) را نشان دادند. لذا در صورت عدم وجود کادمیوم در محیط جوانه‌زنی بذور (گیاهان شاهد)، با افزایش دما به ۲۸ درجه سانتی-گراد منجر به افزایش میزان جوانه‌زنی بذور *old3* شده به طوری‌که با میزان جوانه‌زنی گیاهان مادری *Ler-0* تفاوت معنی‌داری ندارد که با نتایج قبلی مولفین مطابقت دارد. با توجه به نتایج حاصله، روند کاهش جوانه‌زنی در دو ژنوتیپ *old3* و *Ler-0* در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول در لیتر کادمیوم به نحو مشابهی ادامه پیدا می‌کند. کاهش میزان جوانه‌زنی در بذور *old3* در هر دو دمای مورد بررسی در مقایسه با گیاهچه‌های مادری (*Ler-0*) معنی‌دار بوده و در نهایت میزان جوانه‌زنی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱۰۰ میکرومولار برای هر دو ژنوتیپ به صفر می‌رسد. اما نتایج حاصل در دمای ۲۸ درجه حاکی از جوانه‌زنی بذور *old3* و *Ler-0* بوده، و میزان جوانه‌زنی بذور موتانت *old3* به میزان متوسط ۱/۵ درصد از جوانه‌زنی بذور *Ler-0* کمتر می-باشد. بنابراین دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد می‌تواند موجب فعالیت بیشتر آنزیم و پروتئین‌های موثر بر جوانه‌زنی بذور در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی شود. ولی دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قادر به حذف تاثیر موتاسیون *old3* در گیاهچه‌های موتانت در واکنش به تنش کادمیوم نیست. احتمالا در شرایطی که کادمیوم در محیط وجود ندارد میزان تأثیر موتاسیون *old3* در دمای ۲۸ درجه تا حدود زیادی می‌تواند به فرم مادری *OLD3* نزدیک شود، اما در حضور کادمیوم، میزان تأثیر موتاسیون *old3* در واکنش بذور به تنش کادمیوم به صورت افزایش حساسیت در بذور و به نحو قابل توجهی متفاوت با ژنوتیپ مادری نمایان می‌شود. همچنین کاهش معنی‌دار میزان جوانه‌زنی در موتانت‌های *aba-1* و *abi3-1* را در مقایسه با گیاهان مادری (*Ler-0*) در غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومول در لیترکادمیوم گزارش شده‌است (Sharma and Kumar 2002). مضافا اینکه گیاهان تراریختی که توانایی تولید سیستئین بیشتری تا میزان ۹ برابر را داشتند، مقاومت قابل توجهی را نسبت به آلودگی ایجاد شده توسط کادمیوم از خود نشان دادند (Dominguez-Solis et al. 2001). با توجه به یافته‌های بدست آمده می‌توان نتیجه گیری کرد که تاثیر موتاسیون *old3* بر واکنش بذور موتانت به تنش کادمیوم مستقل از دما عمل می‌کند و افزایش دما نتوانسته تاثیر موتاسیون *old3* بر آلودگی کادمیوم را حذف نماید. بنابراین فعالیت ژن *OLD3* در زمینه واکنش به تنش کادمیوم مستقل از دما می‌باشد.

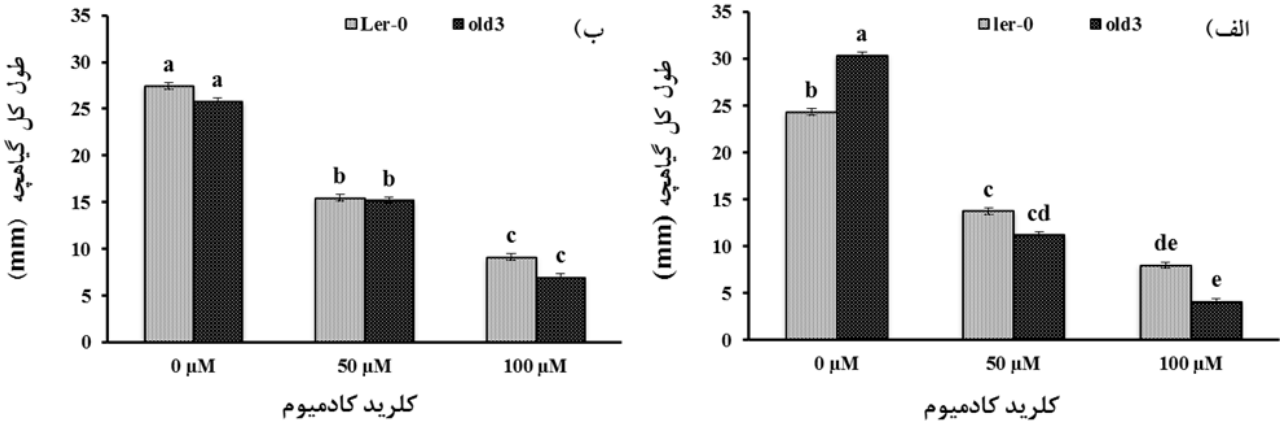
نتایج حاصله از تجزیه داده‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین دو ژنوتیپ *old3* و *Ler-0* از لحاظ وزن تر کل در دو دمای ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد، غلظت‌های مختلف کادمیوم، ژنوتیپ‌ها و همچنین اثر متقابل کادمیوم در دما ($P \leq ۰/۰۱$) می‌باشند (جدول ۲). میزان وزن تر کل در ژنوتیپ مادری و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت صفر میکرومولار کادمیوم (شاهد) به میزان ۳۲ میلی‌گرم نسبت به دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته، و همچنین در ژنوتیپ موتانت *old3* در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت صفر میکرومولار کادمیوم (شاهد) به میزان ٤٠ میلی‌گرم نسبت به دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته‌است (شکل ۲-الف و ب). علاوه بر آن، میزان وزن تر در غلظت ۵۰ میکرومولار کادمیوم در موتانت *old3* و ژنوتیپ مادری (*Ler-0*) با تغییر دما از ۲۲ به ۲۸ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به میزان ۱۵ و ۱۰ میلی‌گرم افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین ($P \leq ۰/۰۵$) نشان دهنده کاهش میزان وزن تر در غلظت‌های مختلف کادمیوم نسبت به غلظت صفر کادمیوم (شاهد) در هر دو ژنوتیپ می‌باشد. همچنین این نتایج حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۵$) دو ژنوتیپ موتانت *old3* و گیاهان مادری در غلظت صفر میکرومول کادمیوم در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد بوده، اما در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد اختلافی بین آن‌ها مشاهده نمی‌شود (شکل ۲-الف و ب). با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که با افزایش دما از ۲۲ به ۲۸ درجه سانتی‌گراد، وزن‌تر در گیاهچه‌های موتانت *old3* بهبود یافته، اما همان‌طور که ملاحظه می‌شود روند بهبود در میزان وزن‌تر در ژنوتیپ مادری (*Ler-0*) نیز صورت گرفته‌است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]



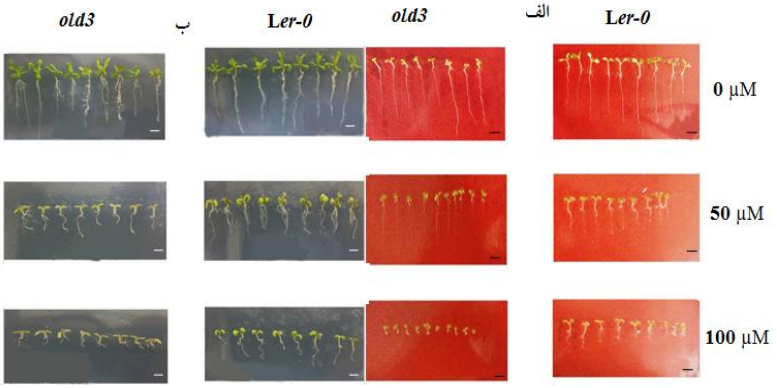
شکل۲- میانگین وزن تر ۱۰ گیاهچه جهش‌یافته (*old3*) و مادری (*Ler-0*) تحت تیمار دما وکلرید کادمیوم در روز چهاردهم. مقایسه میانگین ($P \leq ۰/۰۵$) دو ژنوتیپ مختلف در دو دمای۲۲ درجه سانتی‌گراد (الف) و مقایسه میانگین ($P \leq ۰/۰۵$) دو ژنوتیپ مختلف دمای۲۲ درجه سانتی‌گراد (ب)



شکل ۳- میانگین طول گیاهچه‌های جهش‌یافته (*old3*) و مادری (*Ler-0*) تحت تیمار دما وکلرید کادمیوم در روز چهاردهم. مقایسه ژنوتیپ‌ها در دو دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد (الف) و ۲۸ درجه سانتی‌گراد (ب).

با توجه به این نتایج می‌توان گفت که احتمالا در شرایطی که کادمیوم در محیط وجود ندارد میزان تأثیر موتاسیون *old3* در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد تا حدود زیادی می‌تواند به فرم مادری *OLD3* نزدیک کند، اما در حضور کادمیوم، میزان تاثیر موتاسیون *old3* در واکنش گیاهچه‌ها به تنش کادمیوم به صورت افزایش حساسیت بوده و به صورت کاهش میزان وزن تر کل در گیاهچه-های موتانت نسبت به گیاهان مادری نمایان می‌شود. در حقیقت کادمیوم از تقسیم سلول‌های مریستمی و رشد سلول‌های منطقه رشد جلوگیری می‌کند (Fusconi et al. 2007). از طرف دیگر کاهش وزن به علت اختلال در متابولیسم کلی سلول است. تحقیقات نشان می‌دهد که میزان پراکسیداسیون چربی‌ها به علت افزایش میزان پراکسید هیدروژن در سلول در حضور یون کادمیوم افزایش می‌یابد که این عمل باعث برهم خوردن تعادل آبی و تغذیه‌ای سلول شده که یکی از مهمترین دلایل کاهش وزن تر در گیاهان می‌باشد (Toppi and Gabbrielli 1999). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که بافت Tricho در برگ به احتمال زیاد مکان تجمع کادمیوم در گیاهان بوده و لذا اهمیت این بافت در سم زدایی آلودگی ایجاد شده توسط کادمیوم به وضوح روشن می‌شود (Dominguez-Solis et al. 2001; Ager et al. 2002) لذا کاهش وزن تر کل در گیاهان موتانت *aba-1* و *abi1-3* آرابیدوپسیس در ۲ مقایسه با گیاهان مادری (*Ler*) در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول در لیتر کادمیوم (Sharma and Kumar 2002) و همچنین کاهش ۸ و ۲۵ درصد میزان وزن تر کاهو در غلظت‌های

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]



شکل ٤- طول گیاهچه‌های جهش‌یافته (*old3*) و مادری (*Ler-0*) تحت تیمار دمای (الف) ۲۲ درجه سانتی‌گراد و کادمیوم (ب) ۲۸ درجه سانتی‌گراد و کادمیوم بعد از ١٤ روز. مقیاس ٥*mm* است.

و ٤ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم (Haghighi et al. 2009) نیز گزارش شده‌است. افزایش خارجی سیستین (به جای سیستئین) به محیط رشد گیاهچه‌های آرابیدپسیس موجب افزایش قابلیت و توانایی رشد گیاهچه‌ها (افزایش وزن تر گیاهان) در حضور تیمار ٤٠٠ میلی مول کادمیوم شد، در حالی‌که گیاهان رشد یافته در شرایط شاهد (فاقد کادمیوم) از بین رفتند (Dominguez-Solis et al. 2004). بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که تاثیر موتاسیون *old3* بر واکنش بذور موتانت به تنش کادمیوم مستقل از دما عمل می‌کند و افزایش دما نتوانسته تاثیر موتاسیون *old3* بر آلودگی کادمیوم را حذف کند. لذا فعالیت ژن *OLD3* در زمینه واکنش به تنش کادمیوم مستقل از دما می‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت طول گیاهچه‌های جهش‌یافته *old3* و مادری *Ler-0* حاکی از تفاوت معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۱$) عامل دما و غلظت‌های مختلف کادمیوم بوده، اما اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد (جدول ۲). میزان رشد طولی گیاهچه‌های جهش‌یافته *old3* و مادری (*Ler-0*) با افزایش دما از ۲۲ به ۲۸ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت (شکل۳- الف و ب). در غلظت صفر میکرومول کلرید کادمیوم طول گیاهچه‌های موتانت *old3* در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به میزان mm ۳۰/۳۳ بوده و از طول بیشتری در مقایسه با طول گیاهچه‌های ژنوتیپ مادری *Ler-0* به میزان (mm ۲٤/۳۳) برخوردار بود. طول گیاهچه‌های مادری (*Ler-0*) در غلظت ٥٠ میکرومول در دو دمای ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد دارای اختلاف معنی‌داری با طول گیاهچه‌های موتانت نبوده، در حالی‌که طول گیاهچه‌های *old3* در این غلظت‌ها و در دو دمای ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد دارای تفاوت قابل توجهی می‌باشد و با افزایش دما به ۲۸ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته و از طولی مشابه گیاهچه‌های مادری (*Ler-0*) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برخوردار می‌شود (شکل۳- الف و ب). صرف‌نظر از زمینه ژنتیکی مشابه *old3* و *Ler-0*، کاهش فوق در هر یک از دو دمای ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد ناشی از تأثیر موتاسیون نقطه‌ای ژن *old3* در گیاهچه‌های موتانت می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که در مجموع با افزایش دما از ۲۲ به ۲۸ درجه سانتی‌گراد، طول گیاهچه‌ها در ژنوتیپ موتانت *old3* و مادری *Ler-0* افزایش یافته است. به استثنا غلظت صفر میکرومول کادمیوم که در دمای ۲۲ درجه که میزان طول گیاهچه‌های مادری کوتاه‌تر از موتانت می‌باشد، طول گیاهچه‌های مادری در هر دو دما و در کلیه غلظت‌ها بیشتر از ژنوتیپ موتانت *old3* می‌باشد (شکل٤- الف و ب). از آنجا که استفاده از کادمیوم در غلظت‌های بیشتر موجب کاهش قابل توجه رشد ریشه‌ها می‌شود (Dominguez-Solis et al. 2004). لذا احتمالا فعالیت ژن *OLD3* مستقل از دما عمل می‌کند و افزایش دما نتوانسته عملکرد ژن جهش یافته *old3* را به فرم وحشی برگرداند. بنابراین به نظر می‌رسد ژنوتیپ موتانت احتمالا بدلیل موتاسشیون ایجاد شده در آن حساس‌تر شده و در مقایسه با ژنوتیپ مادری*Ler-0* طول گیاهچه کمتری دارد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی میزان آنزیم پراکسیداز (POD) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]

(P≤۰/۰۱) بین ژنوتیپ موتانت *old3* و گیاهان مادری و همچنین بین غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم می‌باشد، اما اختلاف معنی-داری بین اثر متقابل ژنوتیپ و کلرید کادمیوم مشاهده نشد (جدول۳). با توجه به نتایج به دست آمده، الگوی کلی فعالیت پراکسیداز (POD) در گیاهان موتانت *old3* با افزایش غلظت کادمیوم افزایش می‌یابد و این روند برای گیاهچه‌های L*er-0* نیز با روندی مشابه ولی با میزان کمتری صورت می‌گیرد. در این زمینه تفاوت معنی داری بین دو ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف کادمیوم وجود دارد. بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در ژنوتیپ موتانت *old3* و در غلظت ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم به میزان Unit/g FW.min ٤/٦٢ است که در ژنوتیپ مادری L*er-0* در غلظت ۱۰۰ میکرومول کادمیوم فعالیت این آنزیم به میزان Unit/g FW.min ۲/٤۰ است که به اندازه Unit/g FW.min ۲/۲۲ کمتر است (شکل۵- الف). به همین ترتیب در غلظت ۵۰ میکرومولار کادمیوم ژنوتیپ موتانت *old3* فعالیت آنزیم فوق به مقدار Unit/g FW.min ۲/۰۳ نسبت به ژنوتیپ مادری L*er-0* افزایش داشته است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کادمیوم میزان فعالیت آنزیم در ژنوتیپ موتانت *old3* بیشتر از ژنوتیپ مادری L*er-0* است، اما در غلظت صفر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو ژنوتیپ تقریبا یکسان می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین (P ≤۰/۰۱) نشان دهنده افزایش میزان فعالیت پراکسیداز (POD) با افزایش میزان غلظت کادمیوم در هر دو ژنوتیپ بوده، اما میزان فعالیت آن در گیاهان موتانت *old3* نسبت به گیاهان مادری دارای اختلاف معنی‌داری (P ≤۰/۰۱) می‌باشد. آنزیم پراکسیداز به شدت پایدار بوده و برای بررسی آنزیمی بسیار مناسب می‌باشد. پراکسیداز عمدتا در سیتوزول یافته شده و عمل کاهش تنش اکسیداتیو را از طریق سم‌زدایی H_2O_2 انجام می‌دهد. بنابراین، افزایش میزان فعالیت این آنزیم خصوصا در ژنوتیپ موتانت *old3* نشان‌دهنده افزایش میزان تجمع گروهای فعال اکسیژن خصوصا H_2O_2 نسبت به گیاهان مادری L*er-0* می‌باشد.

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی میزان آنزیم کاتالاز (CAT) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف کادمیوم (P ≤۰/۰۱) و عدم اختلاف معنی-داری بین ژنوتیپ‌ها و همچنین اثر متقابل ژنوتیپ و کادمیوم در فعالیت آنزیم کاتالاز می‌باشد (جدول۳). در ژنوتیپ موتانت *old3* بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم به میزان Unit/g FW.min ۰/۳ می‌باشد، در حالی‌که میزان آن در ژنوتیپ مادری L*er-0* Unit/g FW.min ۰/۲۵ می‌باشد. با افزایش غلظت کادمیوم به ۵۰ میکرومولار میزان فعالیت آنزیم در موتانت *old3* و L*er-0* به ترتیب به میزان Unit/g FW.min ۰/۱۷ و Unit/g FW.min ۰/۱٤ می‌رسد، که همچنان اختلافی بین ژنوتیپ‌ها در فعالیت آنزیم دیده نمی‌شود (شکل۵- ب). همان-طور که در این نمودار ملاحظه می‌شود با افزایش غلظت کادمیوم میزان فعالیت آنزیم در هر دو ژنوتیپ به میزان نسبتا برابری افزایش می‌یابد. در غلظت‌های بالاتر کادمیوم، القای گروه‌های فعال اکسیژن در گیاهان افزایش یافته و نیاز به سیستم کنترلی قوی‌تری در گیاه مطرح می‌شود، لذا میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به منظور مقابله با اثرات تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد. از آنجا که در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد میزان حساسیت ژنوتیپ موتانت *old3* به غلظت‌های مختلف کادمیوم از ژنوتیپ مادری L*er-0* بیشتر است، لذا انتظار می‌رود فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نیز در آن‌ها بیشتر باشد. اما همان‌طور که ملاحظه می‌شود در فعالیت آنزیم CAT در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بین دو ژنوتیپ مادری L*er-0* و موتانت *old3* اختلافی مشاهده نمی‌شود و فعالیت آنتی-اکسیدانی در دو ژنوتیپ تقریبا برابر است. آنزیم کاتالاز از آنتی‌اکسیدان‌هایی است که باعث حذف H_2O_2 می‌شود. از آنجا که آنزیم کاتالاز یکی از آنزیم‌های مهم در سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاهان می‌باشد و سبب تجزیه H_2O_2 در پراکسی‌زوم‌ها طی اکسیداسیون تنفس نوری و β- اکسیداسیون اسیدهای چرب، به آب و اکسیژن می‌شود (Del Rio et al. 2006)، بنابراین افزایش میزان فعالیت این آنزیم سبب تجزیه گروه‌های فعال اکسیژن خصوصا H_2O_2 شده و گیاهان را از خطرات سمی گروه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کند.

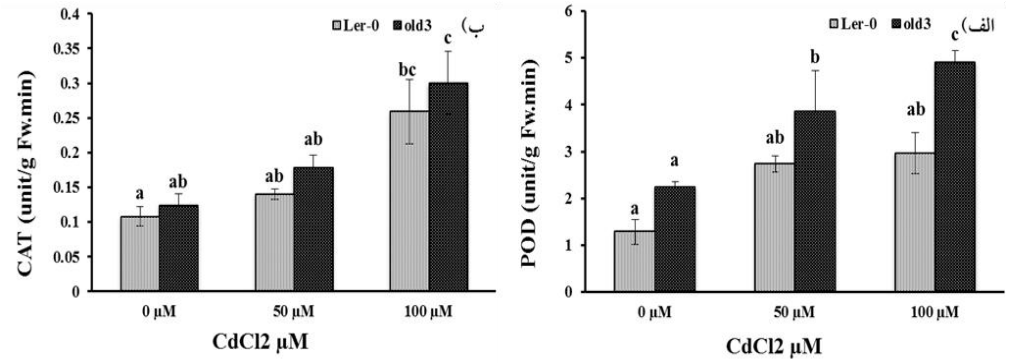
تغییر میزان سنتز سیستئین در گیاهچه‌های تراریخته‌ای که بیان ژن *OLD3* در آنها به نحو چشمگیری افزایش یافته موجب تغییر واکنش این گیاهان به تنش اکسیداتیو شد (Youssefian et al. 2001).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس بررسی فعالیت آنزیم‌های CAT و POD در ژنوتیپ‌های جهش‌یافته (*old3*) و مادری (*Ler-0*) تحت تیمار کادمیوم

منابع تغییر (SOV)	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات	
		آنزیم POD	آنزیم CAT
ژنوتیپ	۱	۱۳/۵۲**	۰/۰۰٤ns
کادمیوم	۲	۵/۷۷**	۰/۰٤**
ژنوتیپ × کادمیوم	۲	۰ /٦٨ns	۰/۰۰۰۲ns
خطای آزمایش	۱۲	۰/۵۸	۰/۰۰۲
کل	۱۷		

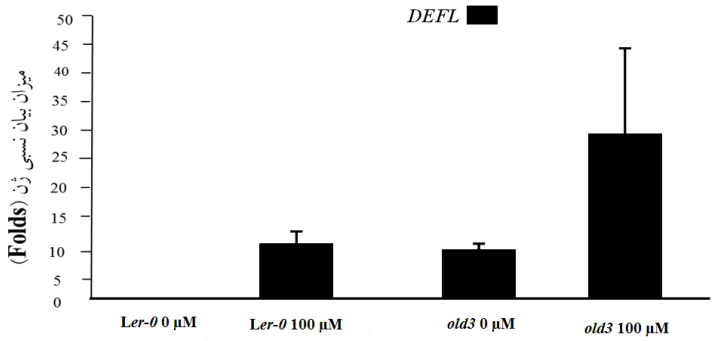
ns ، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد می‌باشد.



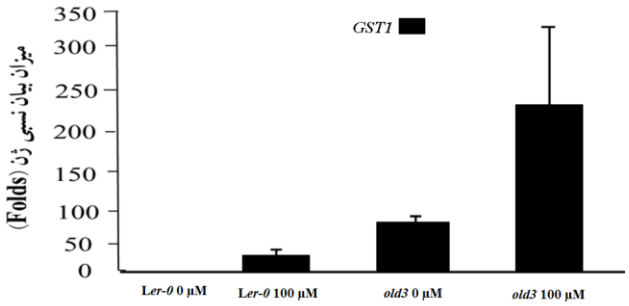
شکل۵- میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ژنوتیپ‌های جهش‌یافته (*old3*) و مادری (*Ler-0*) تحت تیمار کادمیوم در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد. الف) آنزیم پراکسیداز (POD) و ب) آنزیم کاتالاز (CAT).

ژن *DEFL (AT2G43510)* از جمله ژن‌های واکنش‌گر به تنش اکسیداتیو می‌باشد (Gadjev et al. 2006) ، زمانی که گیاه در معرض تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد، بیان این ژن در راستای پاسخ دفاعی به تنش خصوصا تنش اکسیداتیو در گیاه افزایش می‌یابد (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010). لذا میانگین میزان بیان این ژن در گیاهان موتانت *old3* و *Ler-0* در دمای ۲۸ درجه مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به شکل ٦، در ژنوتیپ مادری *Ler-0* بیان ژن *DEFL* در غلظت صفر کادمیوم بسیار کم می‌باشد که با افزایش غلظت کلرید کادمیوم به ۱۰۰ میکرومول میانگین میزان بیان این ژن تا حدود ۱۱ برابر افزایش می‌یابد. این در حالی است که در ژنوتیپ موتانت *old3* میانگین میزان بیان این ژن در غلظت صفر کادمیوم در حدود ۱۰ برابر بیشتر از میانگین بیان آن در ژنوتیپ مادری است. این امر به روشنی بیانگر تأثیر موتاسیون *old3* بر میانگین میزان بیان ژن *DEFL* می‌باشد. همچنین در موتانت *old3* در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، میانگین میزان بیان ژن *DEFL* تا حدود ۲/٦ برابر نسبت به ژنوتیپ مادری افزایش یافت (شکل٦). همان‌طور که ملاحظه می‌شود بیان ژن *DEFL* در صورتی‌که گیاه تحت تاثیر تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد افزایش می‌یابد. از آنجا که بیان این ژن در موتانت *old3* افزایش یافته، لذا احتمالا موتاسیون *old3* موجب حساس شدن گیاهچه‌های موتانت در واکنش به تنش کادمیوم به دلیل افزایش تنش اکسیداتیو در این گیاهان شده‌است. لذا حساس شدن گیاهچه‌های موتانت *old3* با افزایش قابل توجهی در میزان بیان ژن نشانگر اکسیداتیو *DEFL* همراه است. همچنین در مطالعه قبلی میانگین بیان نسبی این ژن در گیاهچه‌های *old3* در دمای ۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به گیاهان مادری تا حدود ۱٦۰ برابر افزایش یافت که این امر حاکی از تاثیر موتاسیون *old3* در ژن سنتز کننده سیستئین بر افزایش چشم‌گیر تنش اکسیداتیو در این گیاهان است. نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن *GST1* (*AT1G02930*) در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میکرومول کلرید کادمیوم در دو ژنوتیپ به روشنی بیانگر تأثیر موتاسیون ژن *old3* بر میزان بیان نسبی ژن *GST1* می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]



شکل ٦- بیان نسبی ژن *DEFL* در گیاهچه‌های جهش‌یافته (*old3*) و مادری (*Ler-0*) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت‌های مختلف کادمیوم.



شکل۷- بیان نسبی ژن *GST1* در گیاهچه‌های جهش‌یافته (*old3*) و مادری (*Ler-0*) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت‌های مختلف کادمیوم.

به نحوی که در غلظت صفر و ۱۰۰میکرومولار کادمیوم میانگین میزان بیان ژن *GST1* در ژنوتیپ موتانت *old3* به ترتیب حدود ۸۰ و ۹/۲ برابر میانگین میزان بیان آن در ژنوتیپ مادری *Ler-0* است (شکل ۷). با توجه به این نکته که ژن *GST1* از جمله ژن-های نشانگر تنش اکسیداتیو است (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010). لذا به نظر می‌رسد در اثر موتاسیون *ژن old3* میزان تنش اکسیداتیو در شرایط حضور کادمیوم در گیاهان موتانت *old3* نسبت به ژنوتیپ مادری *Ler-0* افزایش یافته است.

ژن *GST1* نیز مانند ژن *DEFL* از جمله ژن‌های نشانگر در تنش اکسیداتیو است. به نحوی که اگر گیاه در شرایط تنش اکسیداتیو قرار گیرد بیان ژن *GST1* در آن افزایش یافته و از این ژن به عنوان ژن نشانگر در زمینه تنش اکسیداتیو استفاده می‌شود (Love et al. 2005). همچنین ژن *GST1* رمز کننده آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز است. زمانی که گیاه در معرض تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد، افزایش مقدار ROS باعث فعال شدن این ژن می‌شود. با بررسی میزان فعالیت ژن *GST1* می‌توان میزان حساسیت ژنوتیپ-ها به تنش اکسیداتیو را بررسی کرد (Grant et al. 2000). با توجه به افزایش حدود ۹/۲ برابری بیان این ژن در گیاهچه‌های موتانت *old3* نسبت به گیاهان مادری (*Ler-0*) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم، می‌توان گفت که میزان گروه‌های فعال اکسیژن (ROS) افزایش یافته و سبب ایجاد حساسیت گیاهان موتانت *old3* به تنش اکسیداتیو القا شده توسط کلرید کادمیوم شده‌است.

منابع

Boner ER, Rebecca E, Cahoon S, Knapke M, Joseph MJ (2005) Molecular Basis of Cysteine Biosynthesis in Plants structural and functional analysis of O-asetylserine sulfhydrylase from *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry 280: 38803-38813.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis a model for high

Ager FJ, Ynsa MD, Dominguez-Solis JR, Gotor C, Respaldiza MA, Romero LC (2002) Cadmium localization and quantification in the plant Arabidopsis thaliana using miceo-PIXE. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research 189: 494-498.

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. Annual Review of Biochemistry 44: 276-287.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]

throughput functional genomics in plants. Plant Cell 13:1499-1510.
Chance B, Maehly A (1955) Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology 2:764-775.
Del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. Plant Physiology 14: 330-335.
Dominguez-Solis JR, Lopez-Martin MC, Ager FJ, Ynsa MD, Romero LC, Gotor C (2004) Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in Arabidopsis thaliana. Plant Biotechnology Journal 2: 469-476.
François O, Blum MGB, Jakobsson M, Rosenberg NA (2008) Demographic history of European populations of Arabidopsis thaliana. PLoS genetics 4:e1000075.
Fusconi A, Gallo C, Camusso W (2007) Effect of cadmium on root apical meristems of Pisum sativum L.: cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable makers for assessment of stress pollution. Mutation Research 632:9-19.
Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inzé D, Mittler R, Van Breusegem F (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signalling in *Arabidopsis*. Plant Physiology 141: 436-445.
Grant A, Thiagarajah M, Sathian K (2000) Tactile perception in blind braille readers: A psychophysical study of acuity and hyperacuity using gratings and dot patterns. Perception and Psychophysics 62:00301-31.
Haghighi M, Kafi M, Sadat Taghavi S, Kashi A, Savaghebi Q (2009) Influence of Homic acid on absorption of nitrogen, phosphor and stress indexes in lettuce in response to cadmium. Journal of Water and Soil 1: 87-98 (In Farsi).
Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K (2006) MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry 281: 36969-36979.
Jing HC, Sturre MJ, Hille J, Dijkwel PP (2002) *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. Plant Journal 32: 51-63.
Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP, Seal CE (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. New Phytologist 188: 655-73.
Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-408.
Love AJ, Yun BW, Laval V, Loake GJ, Milner JJ (2005) Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. Plant Physiology 139:935-948.
Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. Science 282: 662-682.
Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22: 867-880.
Raikhel N (1992) Nuclear targeting in plants. Plant Physiology 100: 1627-1623.
Romero LC, Gotor C (2001) The cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. Journal of Biological Chemistry 276: 9297-9302.
Toppi LSD, Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants- review. Experimental Botany 41:105-130.
Sharma S., Kumar V. (2002) Responses of wild type and abscisic acid mutants of *Arabidopsis thaliana* to cadmium. Journal of Plant Physiology 159: 1323-1327.
Sharma P, Ambuj BJ, Dubey RS, Pessarakl M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidaitve Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. Journal of Botany Article ID 217037.
Shirzadian-Khorramabad R, Jing HC, Everts GE, Schippers JHM, Hille J, Dijkwel PP (2010) A mutation in the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase induces a genome-dependent early leaf death phenotype in Arabidopsis. BMC Plant Biology 10:80.
Tahir M, Watanabe M, Jing HC, Hunter DA, Tohge T, Nunes-Nesi A, Brotman Y, Fernie AR, Hoefgen R and Dijkwel PP (2013) Activation of R-mediated innate immunity and disease susceptibility is affected by mutations in a cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase in Arabidopsis. Plant Journal 73: 118-130.
Youssefian S, Nakamura M, Orudgev E, Kondo N (2001) Increased cysteine biosynthesis capacity of transgenic tobacco overexpressing an O-acetylserine (thiol) lyase modifies plant responses to oxidative stress. Plant Physiology 126: 1001-1011.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6]