

مطالعه بیان ژن *GTP* سیکلوهیدرولاز I تحت تنش‌های غیرزیستی در انگور (*Vitis vinifera*. L)

Expression Analysis of *GTP* Cyclohydrolase I Gene under Abiotic Stresses in Grape (*Vitis vinifera* L.)

نادیا اسلامی بجنوردی^۱، رحیم حداد^{۱*}، فاسمعلی گروسی^۱، سعید نواب‌پور^۲

- ۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه گرگان، گرگان، ایران

Eslami Bojnordi N¹, Haddad R^{*1}, Garousi Gh¹, Navabpour S²

- 1- Graduated MSc Student, Associate Professors, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University, Gorgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raheemhaddad@yahoo.co.uk

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶)

چکیده

GTP سیکلوهیدرولاز I از طریق مجموعه‌ای از واکنش‌ها، تبدیل *GTP* به دی‌هیدرونتوپترین تری‌فسفات و فوماریک اسید را کاتالیز می‌کند. این واکنش اولین مرحله در بیوسنتز تتراهیدروفولات (FH_4) در گیاهان و میکروارگانیسم‌ها و تتراهیدروبیوپترین (BH_4) در پستانداران می‌باشد. فولات‌ها از یک واحد پارا-آمینو بنزونیوک اسید (pABA) متصل به یک حلقه پترین، مشتق از *GTP*، و تعدادی واحد گلوتامات تشکیل شده‌اند. در این پژوهش، بیان ژن *Vvgtpch I* تحت تنش‌های غیرزیستی و اکسیداتیو با روش RT-PCR نیمه کمی در بافت برگ گیاه انگور مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که این ژن تحت تنش‌های غیرزیستی به‌طور متفاوتی القا می‌شود. سطح رونوشت ژن *Vvgtpch I* تحت تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری و گرما در مقایسه با گیاه شاهد کاهش یافت. همچنین تحت تیمارهای دی‌آمید (Diamide)، آلومینیوم و هورمون‌های آبسازیک اسید (ABA) و سالیسیلیک اسید (SA) میزان رونوشت ژن *Vvgtpch I* با کاهش مواجه شده در حالی که بیان این ژن تحت تیمار با آب اکسیژنه (H_2O_2)، سولفات مس ($CuSO_4$) و فلزات سنگین همچون کادمیوم ($CdCl_2$) و کبالت ($CoCl_2$) افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی

بررسی بیان ژن
تنش اکسیداتیو
تنش غیرزیستی
GTP سیکلوهیدرولاز I
RT-PCR نیمه کمی

مقدمه

GTP سیکلو هیدرولاز I¹ از طریق مجموعه ای از واکنش ها، تبدیل به دی هیدروئوپترین تری فسفات² و فوماریک اسید³ را کاتالیز می کند که اولین مرحله در بیوسنتز تتراهیدروفولات⁴ (FH₄) در گیاهان و میکروارگانیسم ها می باشد (Burg and Brown 1968). تتراهیدروفولات و مشتقات دیگر آن جزئی از خانواده ی گسترده پلی گلوتامات های (معمولاً پنج تا هفت واحد گلوتامیل) اسید پتروئیک محسوب می شوند. فولات ها، کوفاکتورهای ضروری برای انجام واکنش های انتقال تک کربنه در همه میکروارگانیسم ها محسوب شده و در بیوسنتز پورین ها، پیریمیدین ها، پانتوتنات، تیمیدیلات و هم چنین در متابولیسم چندین اسید آمینه از قبیل متیونین، سرین و گلیسین نقش دارند (Storozhenko et al. 2005). فولات ها از سه بخش پترین، پارا-آمینو بنزوئیک اسید⁵ (p-ABA) و گلوتامات تشکیل شده اند. پارا-آمینو بنزوئیک اسید از کوریسمات در پلاستیدها سنتز می شود (Basset et al. 2004) در صورتی که پترین در سیتوزول و توسط GTP سیکلو هیدرولاز I سنتز می شود (Basset et al. 2002). سپس پترین و پارا-آمینو بنزوئیک اسید به عنوان اجزای تشکیل دهنده فولات وارد میتوکندری می شوند (Cossins 2000). فولات یا اسید فولیک به همراه ویتامین B₁₂ و ویتامین C به هضم مواد غذایی، استفاده بدن از پروتئین و ساخت پروتئین در زمان نیاز کمک می کند. این ویتامین برای ساخت گلبول های قرمز خون لازم بوده و در بیوسنتز DNA نیز به عنوان دهنده یا گیرنده گروه های کربن شماره یک ایفای نقش می کند. کمبود اسید فولیک با بیماری های نقص رشته عصبی مانند اسپینا بیفیدا⁶ و آنسفال⁷ (Lonn et al. 2006)، انواع سرطان (Aune et al. 2011) و سندرم های مغزی در کودکان (Pérez-Dueñas et al. 2011) در ارتباط است.

در پژوهش های مختلفی، قطعات cDNA رمز کننده آنزیم GTP سیکلو هیدرولاز I از موجودات زنده مانند انسان (Witter et al. 1996)، نماتودهای دیکتیوکالوس ویوپاروس⁸ و تلادورساگیا سیرکومسینکتا⁹ (Baker et al. 2011)، باکتری پلاسمودیوم فلاسپاروم (Kümpornsin et al. 2014) و گیاه گوجه فرنگی¹⁰ (Waller et al. 2010) جداسازی و همسانه سازی شده است. طی تحقیقی، ژن *gtpch I* از موش به گوجه فرنگی انتقال داده شد. هنگامی که هیبرید نسل اول این لاین تراریخته مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که میزان فولات آن در مقایسه با شاهد به مقدار زیادی افزایش یافته است. همچنین میزان بیان ژن *gtpch I* در سطح ترجمه در دو واریته گوجه فرنگی بررسی شد. نتایج نشان دادند که میزان بیان آنزیم در مرحله رسیدگی سبز در واریته پاکوتاه میکروتوم¹¹ نسبت به واریته آیلز کرایگ¹² که یک واریته استاندارد محسوب می شود، تغییری نداشت. اما در مرحله نیمه-قرمزی و رسیدگی کامل، مقدار آنزیم در واریته پاکوتاه میکروتوم افزایش یافت (Waller et al. 2010). بیان ژن *gtpch I* تحت تنش های غیرزیستی به ویژه در گیاه آراییدوپسیس مورد مطالعه قرار گرفته است. بررسی پروفایل بیانی حدود ۲۴۰۰۰ ژن از دانه گرده گیاه آراییدوپسیس تحت تنش سرمایی با استفاده از فناوری ریزآرایه DNA نشان داد که ژن *gtpch I* با کاهش بیان روبرو می شود (Changsong and Diqiu 2010). هم چنین (Navarrete et al. 2012) با بررسی بیان ژن ها در بذور گیاه آراییدوپسیس نشان دادند که تحت تنش های غیرزیستی، ژن های بیوسنتز تتراهیدروفولات بویژه ژن *gtpch I* القاء نمی شوند. (Nunes et al. 2009) با استفاده از یک ژن مصنوعی *gtpch I* ساخته شده (براساس ژن *gtpch I* مرغ)، گیاهان کاهو تراریخته ای تولید کردند که در مقایسه با گیاهان شاهد حدود ۸/۵-۲/۱ برابر فولات بیشتری تولید می کردند. آن ها نشان دادند که می توان غنی سازی فولات را با مهندسی هم زمان مسیرهای متابولیکی سنتز پترین و پارا-آمینو بنزوئیک اسید انجام داد.

⁸ *Dictyocaulus viviparus*⁹ *Teladorsagia circumcincta*¹⁰ *Lycopersicum solanum*¹¹ Microtum¹² Ellis Craig¹ GTP Cyclohydrolase I² dihydroneopterin 3' phosphate³ Fumaric acid⁴ Tetrahydro folate⁵ p- Aminobenzoic acid⁶ Spina bifida⁷ Anencephaly

اتاق رشد (شرکت گروک، ایران) اعمال شد. پس از اعمال تنش-های غیرزیستی، تعدادی برگ جوان و کاملاً رشد یافته از قلمه-های تیمار شده و شاهد جمع‌آوری و در نمونه‌های یک گرمی با استفاده از ازلت مایع تثبیت و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به‌منظور اعمال تنش‌های اکسیداتیو، برای هر تیمار سه تا چهار برگ جوان و کاملاً رشد یافته از قلمه‌های یکساله جدا شده و به قطعاتی با قطر یک سانتی‌متر بریده شدند. پس از فیلتراسیون خلا با آب مقطر، قطعات برگ‌ی درون محلول‌های القاگر (pH= ۵-۶) قرار گرفته و در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و نرخ $120 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ فوتون به مدت ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت تیمار شدند. محلول‌های القاگر برای تنش اکسیداتیو شامل ۱۰ mM آب اکسیژنه (H_2O_2)، mM یک دی‌آمید (diamide)، ۱۰۰ μM سولفات مس (CuSO_4)، ۱۰۰ μM کلرید کبالت (CoCl_2)، ۱۰۰ μM کلرید کادمیوم (CdCl_2)، ۱۰۰ μM کلرید آلومینیوم (AlCl_3)، ۱۰۰ μM آبسیزیک اسید^۲ (ABA) و ۱۰۰ μM سالیسیلیک اسید^۳ (SA) بودند.

RNA کل با استفاده از روش Heidari et al. (2011) از برگ‌های جوان و کاملاً رشد یافته استخراج شد. RT-PCR نیمه‌کمی با استفاده از ۱۰۰ ng محصول واکنش نسخه‌برداری معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر محتوی ۲۰ پیکومولار از آغازگرهای اختصاصی ژن *Vvgtpch I* (با توالی‌های آغازگر رفت 5'-ATGGGCGTCTTGGACGAG-3' و آغازگر برگشت 5'-TCAAGAAGTTGGAGTGTTTGAA-3' انجام شد. واکنش RT-PCR نیمه‌کمی در ۳۰ چرخه طبق برنامه دمایی-زمانی زیر انجام شد: مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله واسرشت‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال به مدت یک دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و مرحله تکثیر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. هم‌چنین مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد.

ژن اکتین انگور (با توالی‌های آغازگر رفت 5'-GTTAGCAACTGGGATGATATGG-3' و آغازگر

با توجه به اهمیت ویتامین‌ها در سلامت انسان، مطالعه و بررسی مسیرهای متابولیکی سنتز آن‌ها به‌ویژه تولید گیاهان تراریخته با میزان فولات بیشتر و مطالعه بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز فولات تحت تیمارهای زیستی و غیرزیستی و درک تنظیم بیان آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه بیان ژن *Vvgtpch I* تحت تنش‌های غیرزیستی همچون خشکی، شوری و گرما در گیاه انگور مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور درک میزان بیان این ژن تحت شرایط تنش اکسیداتیو، تیمارهای محلول‌های شیمیایی القاگر، فلزات سنگین و هورمون‌ها جهت تولید گونه‌های فعال اکسیژن اعمال شد.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های یکساله از گیاه انگور عسکری (*Vitis vinifera* L. Askari) از مزارع انگور در مرکز تحقیقات انگور واقع در تاکستان-قزوین در سال ۱۳۹۱ تهیه شدند. قلمه‌ها در گلدان‌های ۱۰ کیلوگرمی حاوی ۹/۵ کیلوگرم خاک رس، شن و کود به نسبت (۲:۱:۱) با یک دوره نوری ۱۶ ساعته در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و با نرخ $120 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ فوتون در گل‌خانه کشت شدند.

به‌منظور بررسی و مطالعه پاسخ ژن *Vvgtpch I* به تنش‌های مختلف محیطی، قلمه‌ها در سه تکرار با تنش‌های غیرزیستی تیمار شدند. برای اعمال تنش خشکی، آبیاری گلدان‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۲ روز متوقف شده و سپس محتوای نسبی آب برگ^۱ (RWC) به روش Pruvot et al. (1996) تعیین شد. برای تنش شوری، قلمه‌ها به تدریج و در طی ۵ تا ۷ روز با غلظت‌های مختلفی از کلرید سدیم (NaCl) شامل ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار تیمار شدند. اعمال تنش‌های خشکی و شوری با نگهداری قلمه‌های تیمار شده و شاهد تحت شرایط دوره نوری ۱۶ ساعته، دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و نرخ $120 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ فوتون در گلخانه انجام شد. همچنین تنش گرمایی با نگهداری گلدان‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تحت شرایط دوره نوری ۱۶ ساعته، رطوبت ۵۰ درصد و نرخ $120 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ فوتون درون

^۱ Relative Water Content (RWC)

^۲ Absciscic acid

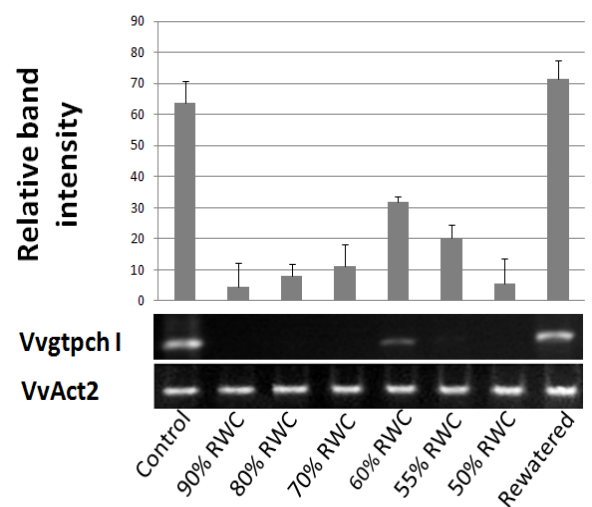
^۳ Salicylic acid

انجام شد. واکنش‌ها در سه تکرار با یک شاهد منفی فاقد DNA الگو برای هر مرحله از واکنش‌های RT-PCR انجام شد. محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد جداسازی و شدت باندها به وسیله نرم‌افزار ImageJ با استفاده از ژن اکتین و H_2O به عنوان شاهد تعیین شدند (Abramoff et al. 2004).

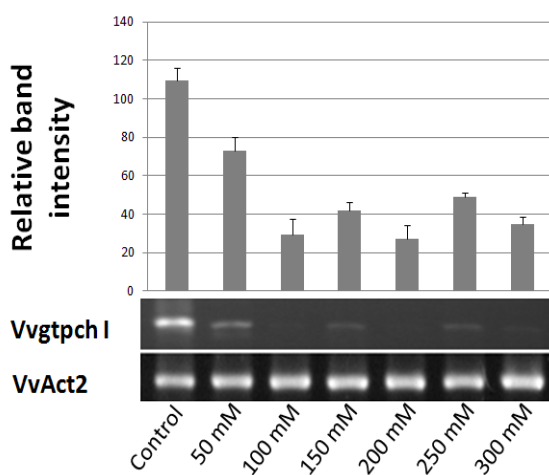
برگشت 3'-AGCACCAATCGTGATGACTTG-5' به عنوان یک ژن خانه‌دار^۱ (برای تنش‌های شوری، خشکی و گرما) و H_2O به عنوان شاهد (برای تنش‌های اکسیداتیو) استفاده شد. به منظور بررسی احتمال آلودگی DNA ژنومی در نمونه‌های RT-PCR، واکنش PCR با تمام نمونه‌های RNA استخراجی به طور جداگانه

³ Housekeeping

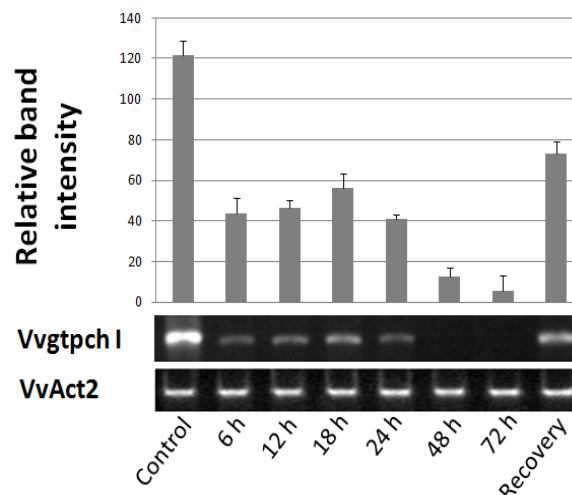
(الف)



(ب)



(ج)



شکل ۱- بررسی بیان ژن *Vvgtpch I* تحت تنش‌های غیرزیستی در بافت برگ گیاه انگور، (الف) تنش خشکی اعمال شده در دامنه‌ای از ۹۰-۵۰ درصد، (ب) تنش شوری با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم شامل ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار، (ج) تنش گرمایی اعمال شده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۶-۷۲ ساعت درون اتاق رشد. قلمه‌های انگور در سه تکرار تیمار شده و بررسی بیان به روش RT-PCR نیمه‌کمی انجام شد. یک ژل از بین سه ژل انتخاب و نشان داده شده‌است. شدت نسبی باندها با استفاده از ژن اکتین نرمال‌سازی شد و هر ستون نشان‌دهنده متوسط $\pm$ SD بدست آمده از سه واکنش RT-PCR مستقل می‌باشد.

نتایج و بحث

به منظور مطالعه پاسخ ژن *Vvgtpch I* به تنش های غیرزیستی، قلمه های انگور تحت شرایط تنش های خشکی، شوری و گرما در سه تکرار تیمار شده و بررسی بیان ژن به روش RT-PCR نیمه-کمی انجام شد (شکل ۱). گیاهان در پاسخ به تنش های غیرزیستی، روش های مختلفی که ترکیبی از تغییرات متابولیکی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی هستند را به کار می برند. این تغییرات در جهت سازگاری گیاه با شرایط محیطی بوده و به میزان زیادی متکی به تغییرات بیان ژن ها می باشد (Kamal et al. 2010). بررسی ها نشان داده اند که تنش اسمزی ایجاد شده توسط خشکی یا غلظت بالای نمک از طریق دو مسیر اصلی موجب بیان ژن ها می شود که این دو مسیر شامل مسیر وابسته به آسبیزیک اسید و مسیر مستقل از آسبیزیک اسید می باشد. مسیر وابسته به آسبیزیک اسید خود نیز شامل دو رهیافت می باشد که عبارتند از رهیافتی که مستلزم سنتز پروتئین های جدید بوده و دیگری که از پتانسیل پروتئین های موجود در گیاه استفاده می کند (Zhang et al. 2006). تحت تنش خشکی، بیان ژن *Vvgtpch I* در مقایسه با شاهد به طور چشم گیری کاهش یافت به طوری که در مقادیر RWC ۷۰-۹۰ درصد، بیان ژن به میزان زیاد کاهش یافته اما در RWC ۶۰ درصد یک افزایش محسوس در مقدار رونوشت ژن *Vvgtpch I* مشاهده شد که مجدداً تحت شرایط تنش شدید آبی (RWC ۵۰ درصد) با کاهش شدیدی مواجه شد (شکل ۱الف). هنگامی که قلمه های تحت تنش شدید آبی (RWC ۵۰ درصد) به مدت یک هفته مجدداً آبیاری شدند و مقدار RWC آنها به ۹۵ درصد رسید، مشاهده شد که میزان بیان ژن *Vvgtpch I* تا سطح بیان در گیاه شاهد افزایش یافت. غلظت بالای کلرید سدیم در آب خاک نیز می تواند سبب ایجاد شرایط کمبود آب و نهایتاً خشکی فیزیولوژیکی در گیاه شود. به عبارت دیگر تنش شوری با القا شرایط کمبود آب در گیاه موجب افزایش غلظت درونی هورمون آسبیزیک اسید و تحریک بیان ژن-ها از طریق مسیر وابسته به آسبیزیک اسید می شود، بنابراین پاسخ گیاهان به تنش شوری به دلیل القاء خشکی فیزیولوژیکی است و نه اثرات مستقیم کلرید سدیم (Zhang et al. 2006). مطالعات پروتئومیکس نشان می دهند که آنزیم های تخریب کننده گونه های

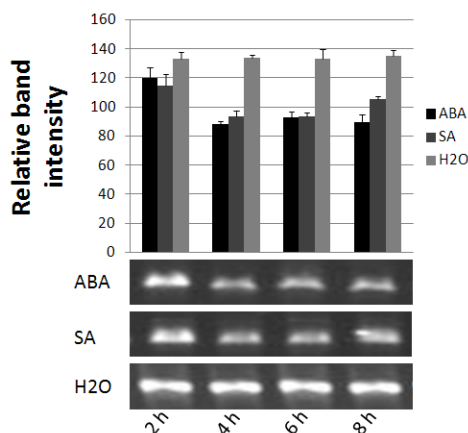
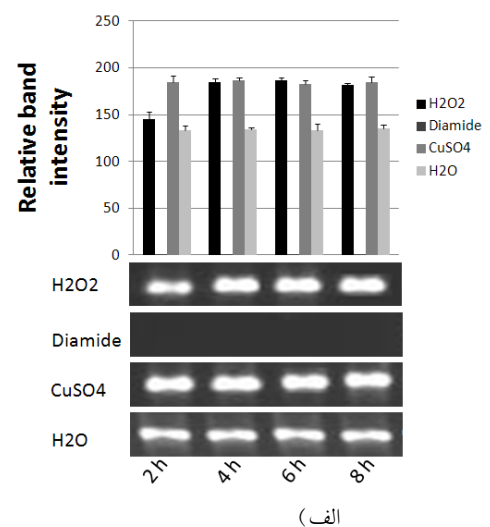
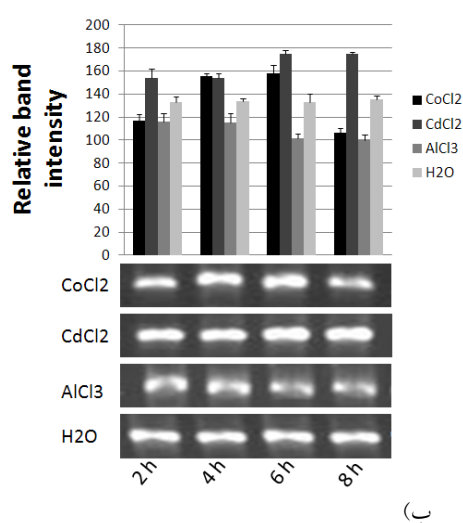
اکسیژن فعال^۱ (ROS) مانند سوپر اکسید دیسموتاز^۲، آسکوربات پراکسیداز^۳، دهیدروآسکوربات ردوکتاز^۴ و غیره توسط تنش شوری القاء می شوند که نشان دهنده تولید گونه های اکسیژن فعال توسط تنش شوری است (Chattopadhyay et al. 2011). ژن *Vvgtpch I* تحت تنش شوری در مقایسه با گیاه شاهد با کاهش بیان مواجه شد (شکل ۱ب). همان طور که در شکل مشاهده می شود همراه با افزایش غلظت کلرید سدیم، میزان بیان ژن *Vvgtpch I* در سطح نسخه برداری تقریباً و به تدریج کاهش یافت.

تنش گرمایی از یک طرف موجب واسرشته سازی پروتئین ها و آنزیم های سلولی شده و از طرف دیگر بیان پروتئین هایی با فعالیت چپرونی را افزایش می دهد (Kosova et al. 2011). بررسی ها نشان داده اند که مقدار آب اکسیژنه تحت دماهای بالا به سرعت افزایش یافته و ممکن است به عنوان یک مولکول مهم در مسیر ترانسسانی پیام عمل نماید (Laloi et al. 2004). تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط گرما موجب افزایش بیان آنزیم های درگیر در فرآیند اکسیداسیون و احیاء سلولی از قبیل کاتالاز، پراکسیداز، سوپرآکسیداز و غیره می شود (Lee et al. 2007). مشابه با تنش های خشکی و شوری، بیان ژن *Vvgtpch I* نیز تحت تنش گرما با کاهش بیان مواجه شد (شکل ۱ج). بیان ژن *Vvgtpch I* تا ۱۸ ساعت پس از اعمال تنش به تدریج افزایش یافت و پس از آن تا ۷۲ ساعت اعمال تنش گرمایی با کاهش شدید مواجه شد. همچنین میزان رونوشت ژن *Vvgtpch I* در گلدهانی که به مدت یک هفته پس از اعمال تنش گرمایی در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد نگهداری شدند، مجدداً افزایش یافت. مشابه با نتایج ما، مطالعه بیان ژن ها با استفاده از فناوری ریزآرایه DNA در بذور آرابیدوپسیس نشان داده است که هیچ یک از ژن های مسیر بیوستنز تتراهیدروفولات از جمله ژن *gtpch I* توسط تنش های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و گرما القا نشدند (Navarrete et al. 2012). کاهش بیان ژن *gtpch I* با بررسی بیان ژن ها در دانه های کرده بالغ تحت تیمار تنش سرمایی در گیاه آرابیدوپسیس نیز

¹ Reactive Oxygen Species (ROS)² Superoxide dismutase³ Ascorbate peroxidase⁴ Dehydroascorbate reductase

در تمام زمان های اعمال تیمار (۲-۸ ساعت) متوقف شده و عملاً باند های مربوط به رونوشت روی ژل قابل مشاهده نیستند (شکل ۲ الف). بررسی بیان ژن *Vvgtpch I* تحت تیمار با فلزات سنگین نشان داد که سطح رونوشت آن تحت تیمار با کادمیوم به تدریج افزایش یافت، در حالی که در تیمار با آلومینیوم با کاهش تدریجی مواجه شد. همچنین تحت تیمار با کبالت، سطح رونوشت ژن *Vvgtpch I* تا شش ساعت اعمال تیمار با افزایش و پس از آن با کاهش روبرو شد (شکل ۲ ب).

مشاهده شد (Changsong and Diqui 2010). به منظور بررسی پاسخ ژن *Vvgtpch I* به تنش اکسیداتیو، از تیمار های مختلفی مانند محلول های شیمیایی القاگر، فلزات سنگین و هورمون ها جهت تولید گونه های اکسیژن فعال استفاده شد (شکل ۲). ژن *Vvgtpch I* تحت تیمار با آب اکسیژنه و یون مس (Cu^{2+})، افزایش شدیدی در مقدار رونوشت نشان داده و سطح رونوشت آن طی هشت ساعت اعمال تیمار ثابت باقی ماند. در تیمار با دی-آمید، به نظر می رسد که بیان ژن *Vvgtpch I* در سطح نسخه برداری



شکل ۲- بررسی بیان ژن *Vvgtpch I* تحت تنش اکسیداتیو در بافت برگ گیاه انگور در بازه زمانی ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت. الف) تیمار محلول های شیمیایی القاگر شامل ۱۰ mM آب اکسیژنه، ۱ mM دی آمید، ۱۰۰ μM سولفات مس، ب) تیمار فلزات سنگین شامل ۱۰۰ μM کلرید کبالت، ۱۰۰ μM کلرید کادمیوم، ۱۰۰ μM کلرید آلومینیوم، ج) تیمار های هورمونی شامل ۱۰۰ μM آبسازیک اسید و ۱۰۰ μM سالیسیلیک اسید. قطعات برگی به قطر یک سانتی متر درون محلول های فوق تیمار شده و بررسی بیان ژن به روش RT-PCR نیمه کمی انجام شد. آزمایشات در سه تکرار مستقل انجام شدند و یک ژل از بین سه ژل انتخاب و نشان داده شده است. شدت نسبی باندها با استفاده از شدت باند ژن اکتین نرمال سازی شد. هر ستون نمودار نشان دهنده متوسط $\pm$ SD بدست آمده از سه واکنش RT-PCR مستقل می باشد.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر اولین پژوهش در زمینه بررسی بیان ژن *gtpch I* تحت تنش‌های فلزات سنگین و هورمونی در گیاهان می‌باشد که در گیاه انگور انجام شده‌است. بررسی بیان ژن *Vvgtpch I* تحت تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری، گرما و هورمون‌ها حاکی از کاهش در میزان سطح رونوشت این ژن بود در حالی که تحت تیمارهای آب‌اکسیژنه، سولفات مس و فلزات سنگین با افزایش بیان روبرو شد. به نظر می‌رسد که این ژن در اثر تولید گونه‌های اکسیژن فعال با افزایش بیان روبرو شده و احتمالاً نقشی را در مسیر اکسیداسیون و احیاء سلولی در گیاهان ایفا می‌کند. با این حال آزمایش‌های بیش‌تری باید در این زمینه انجام شود.

منابع

- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42.
- Aune D, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Boffetta P, Acosta G, Mendilaharsu M, De Stefani E (2011) Dietary folate intake and the risk of 11 types of cancer: a case-control study in uruguay. *Annals of Oncology* 22: 444-451.
- Baker RH, Buschbaum S, Matthews JB, McKendrick IJ, Schnieder T, Strube C, Nisbet AJ (2011) GTP-cyclohydrolase and development in *Teladorsagia circumcincta* and *Dictyocaulus viviparus* (Nematoda: Strongylida). *Experimental Parasitology* 128: 309-317.
- Basset G, Quinlivan EP, Ravanel S, Rebeille F, Nichols BP, Shinozaki K, Sek M, Adams-Phillips LC, Giovannoni JJ, Gregory JF, Hanson AD (2004) Folate synthesis in plants: the p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101: 1496-1501.
- Basset G, Quinlivan EP, Ziemak MJ, Diaz De La Garza R, Fischer M, Schiffmann S, Bacher A, Gregory JF, Hanson AD (2002) Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 12489-12494.
- Burg AW, Brown GM (1968) The biosynthesis of folic acid VIII. Purification and properties of the enzyme that catalyzes the production of formate from carbon atom 8 of guanosine triphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 243: 2349-2358.
- Changsong Z, Diqui Y (2010) Analysis of the cold-responsive transcriptome in the mature pollen of *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology* 53: 400-416.
- Chattopadhyay A, Subba P, Pandey A, Bhushan D, Kumar R, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty N (2011)

تحت تیمارهای هورمونی آبسزیک اسید و سالیسیلیک اسید، میزان رونوشت ژن *Vvgtpch I* از دو ساعت تا هشت ساعت اعمال تیمار مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که سطح رونوشت آن تقریباً و به تدریج کاهش یافت (شکل ۲ج). آب اکسیژنه فعالیت *gtpch I* را به روش وابسته به میزان غلظت تنظیم می‌کند، بطوری که تا غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار بر لیتر، آنزیم *gtpch I* را فعال نموده اما در غلظت‌های بالاتر مانع فعالیت آن می‌شود (Schallreuter and Elwary 2007). (Chavan et al. 2009) نیز نشان دادند که فعالیت *gtpch I* توسط آب‌اکسیژنه و به روش وابسته به میزان غلظت تنظیم می‌شود. آن‌ها همچنین بیان کردند که فعالیت *gtpch I* حتی پس از کاهش غلظت آب‌اکسیژنه کاهش نمی‌یابد.

Analysis of the grass pea proteome and identification of stress-responsive proteins upon exposure to high salinity, low temperature, and abscisic acid treatment. *Phytochemistry* 72: 1293-1307.

Chavan B, Beazley W, Wood JM, Rokos H, Ichinose H, Schallreuter KU (2009) H₂O₂ increases de novo synthesis of (6R)-L-erythro- 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin via GTP cyclohydrolase I and its feedback regulatory protein in vitiligo. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 32: 86-94.

Cossins EA (2000) The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *American Society of Nutrition Journals* 78: 691-708.

Heidari Japelaghi R, Haddad R, Garoosi GA (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular Biotechnology* 49: 129-137.

Imbard A, Benoist JF, Blom HJ (2013) Neural tube defects, folic acid and methylation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10: 4352-4389.

Kamal AHM, Kim KH, Shin KH, Choi JS, Baik BK, Tsujimoto H, Heo HY, Park CS, Woo SH (2010) Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. *Australian Journal of Crop Science* 4: 196-208.

Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT, Renaut J (2011) Plant proteome changes under abiotic stress contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* 74: 1301-1322.

Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signaling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 323-328.

Kümpornsin K, Kotanan N, Chobson P, Kochakarn T, Jirawatcharadech P, Jaru-ampornpan P, Yuthavong Y, Thanat Chookajorn (2014) Biochemical and functional

characterization of *Plasmodium falciparum* GTP cyclohydrolase I. *malaria journal* 13: 150.

Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Kang KY, Bahk JD, Lee IJ, Lee BH (2007) A proteomic approach in analyzing heat responsive proteins in rice leaves. *Proteomics* 7: 3369–3383.

Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr (2006) Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *The New England Journal of Medicine* 354: 1567-1577.

Navarrete O, Van Daele J, Stove C, Lambert W, Van Der Straeten D, Storozhenko S (2012) A folate independent role for cytosolic HPPK/DHPS upon stress in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 73: 23-33.

Nunes ACS, Kalkmann DC, Aragao FJL (2009) Folate biofortification of lettuce by expression of a codonoptimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. *Transgenic Research* 18: 661-667.

Pérez-Dueñas B, Ormazábal A, Toma C, Torrico B, Cormand B, Serrano M, Sierra C, Grandis ED, Marfa MP, García-Cazorla A, Campistol J, Pascual JM, Artuch R (2011) Cerebral folate deficiency syndromes in childhood clinical, analytical, and etiologic aspects. *Archives Neurology* 68: 615-621.

Pruvot G, Massimino J, Peltier G, Rey P (1996) Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum* 97: 123-131.

Schallreuter KU, Elwary S (2007) Hydrogen peroxide regulates the cholinergic signal in a concentration dependent manner. *Life Sciences* 80: 2221-2226.

Storozhenko S, Ravanel S, Zhang GF, Rebeille F, Lambert W, Van Der Straeten D (2005) Folate enhancement in staple crops by metabolic engineering. *Trends in Food Science and Technology* 16: 271-281.

Waller JC, Akhtara TA, Nunezb Gregory JF, McQuinn RP, Giovannonic JJ, Hansona AD (2010) Developmental and feed forward control of the expression of folate biosynthesis genes in tomato fruit. *Molecular Plant* 3: 66-77.

Witter K, Werner T, Blusch JH, Schneider EM, Riess O, Ziegler I, Rodi W, Bacher A, Gultich M (1996) Cloning, sequencing and functional studies of the gene encoding human GTP cyclohydrolase I. *Gene* 179: 285-290.

Zhang J, Jia W, Yang J, Abdelbagi MI (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* 97: 111-119.