

اثر کاهش فعالیت ژن *RON1/SAL1* بر واکنش به تنش اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتریازول در گیاهان موتانت آرابیدوپسیس *ron1-1*

Consequence of decrease in function of *SAL1/RON1* gene in response to Aminotriazole-induced oxidative stress in *Arabidopsis* mutant plants *ron1-1*

پیمان منبری^۱، رضا شیرزادیان خرم‌آباد^{۱*}، علی اعلمی^۱، محمد قدم‌باری^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران و دانشیار، دانشگاه گیلان

Manbari P¹, Shirzadian-Khorramabad R^{*1}, Alami A¹, Ghadamyari M¹

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

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

رشد و نمو گیاهان و واکنش آن‌ها به تنش‌های زیستی و غیرزیستی همواره با تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) همراه است. تجمع این ملکول‌ها در غلظت‌های بالا می‌تواند برای سلول زیان‌آور بوده و با ایجاد تنش اکسیداتیو موجب مرگ سلولی شوند. علاوه بر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، مواد شیمیایی مانند آمینوتریازول با مهار فعالیت آنزیم کاتالاز سبب القا تنش اکسیداتیو می‌شود. ژن *RON/SAL1* از جمله ژن‌های واکنش‌گر به تنش‌های محیطی است که آنزیم اینوزیتول پلی فسفات-۱ فسفاتاز را کد می‌کند. اغلب جهش‌های موجود در این ژن همچون جهش نقطه‌ای *ron1-1* در گیاه آرابیدوپسیس سبب تغییر واکنش گیاهان جهش یافته به تنش‌های محیطی شده است. در این تحقیق به منظور مطالعه عملکرد ژن *RON1*، خصوصیات فنوتیپی، ملکولی و بیوشیمیایی گیاهان موتانت *ron1-1* در واکنش به تنش اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتریازول بررسی و با گیاهان مادری (*Ler-0*) مقایسه شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار وزن تر شاخساره، ریشه و کل در گیاهان موتانت می‌باشد. همچنین بررسی محتوی کلروفیل نشان‌دهنده کاهش میزان آن در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری بود. علاوه بر آن، افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در واکنش به آمینوتریازول در گیاهان موتانت افزایش یافت. بررسی میزان نسبی بیان ژن‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو القا شده توسط مقادیر متفاوت آمینوتریازول، حاکی از افزایش میزان بیان ژن‌های *DEF1* و *sAPX* در گیاهان مادری نسبت به گیاهان موتانت بود. بنابراین احتمالاً فعالیت پروتئین *RON1* در اثر موتاسیون *ron1-1* در گیاهان موتانت تغییر یافته و این امر سبب افزایش حساسیت آنها به تنش اکسیداتیو شده است.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس
آمینوتریازول
تنش اکسیداتیو
جهش نقطه‌ای *ron1-1*

مقدمه

آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) به عنوان گیاه مدل، همواره در تحقیقات بیولوژی مولکولی به منظور بررسی عملکرد ژن‌های مختلف در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است. طول دوره زندگی کوتاه، تولید بذر فراوان، خودگشن بودن، ژنوم کوچک (۲۵۴۹۸ ژن)، قابلیت بالای ترانسفر ماسیون و امکان ایجاد جهش‌های متعدد باعث انتخاب این گیاه به عنوان یک سیستم ایده‌آل در مطالعات *in vitro* شده است (Francois et al. 2008). تنش‌های غیر زنده نظیر تنش شوری و خشکی، موجب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS^1) از قبیل پروکسید هیدروژن (H_2O_2)، سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH^\cdot) و اکسیژن منفرد می‌شود (Raikhel 1992) که در غلظت‌های بالا برای سلول زیان‌آور بوده و به عنوان تنش اکسیداتیو مطرح می‌باشند. لذا تنش اکسیداتیو به عنوان عامل برهم زننده تعادل میزان تولید ROS که موجب فعال شدن دفاع آنتی-اکسیدانی در سلول‌های زنده می‌شود، تعریف می‌شود (Pallavi et al. 2012). ROS در سلول‌ها تحت شرایط تنش و غیر تنش در کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی‌زوم‌ها، شبکه اندوپلاسمی صاف و دیواره‌های سلولی تولید می‌شود. همچنین ROS به وسیله نشت اجتناب‌ناپذیر الکترون‌ها از O_2 در فعالیت‌های انتقال الکترون به کلروپلاست، میتوکندری‌ها و غشای پلاسمایی یا به عنوان محصول جانبی از مسیرهای متابولیکی واقع شده در اندامک‌های درون سلولی مختلف تولید می‌شوند (Pallavi et al. 2012). افزایش سطوح ROS باعث آسیب به بیوملکول‌هایی از قبیل لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شود. این واکنش‌ها می‌تواند سبب تغییر در خاصیت سیالیت غشا و انتقال یون شده و از طریق کاهش فعالیت آنزیمی، ممانعت از سنتز پروتئین، خسارت به DNA، در نهایت مرگ سلولی را به همراه داشته باشد (Pallavi et al. 2012). علاوه بر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، عناصر سنگین (کادمیوم، سرب و قلع) و مواد شیمیایی (مانند AT^2 و متیل وایلوزن³) نیز موجب به هم خوردن تعادل متابولیکی سلول شده

و موجب تجمع ROS در گیاهان می‌شود. آمینوتریازول با مهار فعالیت آنزیم کاتالاز⁴ سبب تجمع H_2O_2 در سلول‌های برگ شده و سرانجام مرگ سلولی (PCD^5) را باعث می‌شود (Gadjev et al. 2008). بنابراین می‌توان از AT به عنوان عامل گزینشی برای شناسایی موتانت‌های متفاوت در زمینه واکنش به تنش اکسیداتیو استفاده کرد (Gadjev et al. 2006). گیاهان دارای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بوده که دارای اجزای آنزیمی و غیر آنزیمی است و سبب حذف ROS می‌شوند. در سلول‌های گیاهی، سیستم‌های تولید کننده و حذف کننده ROS در اندامک‌های مختلفی از قبیل کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها فعالیت می‌کنند. این سیستم از همکاری اجزا مختلف سلولی تشکیل می‌شود (Pallavi et al. 2012). آنزیم‌هایی آنتی‌اکسیدانی از قبیل CAT ، پراکسیداز⁶، آسکوربات پراکسیداز⁷، سوپراکسید دیسموتاز⁸ و گلووتاتیون ریداکتاز⁹ باعث حذف و غیر فعال شدن ROS می‌شوند (McDonald 1999; Bailly 2004). آنزیم SOD با تولید H_2O_2 آنیون O_2^- را حذف می‌کند. H_2O_2 تولید شده سپس توسط آنزیم‌های CAT و POD سم‌زدایی می‌شود. آنزیم APX نیز در سیکل آسکوربات-گلووتاتیون، با مصرف آسکوربات به عنوان دهنده الکترون، مقدار H_2O_2 را می‌کاهد (Ahmad et al. 2009). کلروپلاست و میتوکندری که دو محل عمده فعالیت چرخه‌های انتقال الکترون در سلول‌های گیاهی هستند نیز همواره در معرض تولید انواع ROS یا افزایش تجمع آن‌ها در این اندامک‌ها می‌باشند (Ashraf et al. 2008). با توجه به اهمیت قابل توجه کلروپلاست در سلول‌های گیاهی، مکانیسم‌های دفاعی متعددی در زمینه ممانعت از تولید انواع ROS تجمع آن‌ها در این اندامک‌ها وجود دارد. چرخه مهلر¹⁰ (Weng et al. 2008)، چرخه گزانوفیل (Adams 2003)، چرخه گلووتاتیون-آسکوربات (Edreva 2005)، تغییر تیلاکوئیدهای گرانیبی به استرومایی (Esfandiari et al. 2008) و مسیر آلترناتیو اکسیداز (Edreva 2005) از جمله

⁴ Catalase (CAT)

⁵ Programed cell death

⁶ Peroxidase (POD)

⁷ Ascorbate peroxidase (APX)

⁸ Superoxide desmotase (SOD)

⁹ Glutathion reductase (GR)

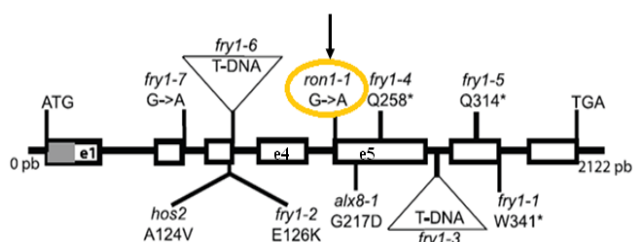
¹⁰ Mehler Reaction

¹ Reactive oxygen species

² 3-amino 1-2,4 teriazole

³ Methyl Viologen

(2002)، جهش *hal2* باعث کاهش مقاومت سویه‌های مخمر جهش یافته به کمبود گوگرد و افزایش حساسیت آنها به لیتیم و سدیم می‌شود (Quintero et al. 1996)، جهش *alx8* باعث افزایش مقاومت گیاهان جهش یافته به خشکی (Wilson et al. 2008) و جهش *fry1-7* که باعث افزایش بیان ژن‌های واکنش گر به کاهش فسفر (Judith et al. 2011) می‌شود اشاره کرد (شکل ۱).



شکل ۱- مکان و موقعیت جهش‌های موجود آمده در ژن *RONI* (Hirsch et al. 2011). موقعیت موتاسیون *ron1-1* (جایگزینی G نوکلئوتید با A) در مرز بین اینترون ۴ و اگزون ۵ در شکل مشاهده می‌شود.

هدف از این تحقیق مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف آمینوتریازول به عنوان مهار کننده آنزیم CAT و القا کننده تنش اکسیداتیو در شرایط *in vitro* بر خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان موتانت آرابیدوپسیس *ron1-1* و مقایسه آن با واکنش گیاهان مادری *Ler-0* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۹۲ انجام گرفت. در این تحقیق واکنش‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان موتانت *ron1-1* و مادری آرابیدوپسیس (*Ler-0*) در شرایط تنش اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتریازول مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

ابتدا بذور گیاهان موتانت *ron1-1* و گیاهان مادری (*Ler-0*) با آب ژاول ۰/۲۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شده و ۳ مرحله آبشویی انجام شد. پس از آن به منظور جوانه زنی بکوناخت، بذور به مدت دو روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس کشت بذور در سطح محیط کشت MS انجام گرفت و گیاهچه‌ها در مرحله ۴ برگگی (۱۲ روز پس از

مهمترین مکانیسم‌های دفاعی هستند. چرخه‌های مذکور از همکاری یک سری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (نظیر APX، SOD، CAT و GR) و آنتی‌اکسیدان‌ها (مثل آسکوربات، گلوکاتیون، توکوفرول، کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها) تشکیل شده است (Ahmad et al. 2009). ژن *RONI* از جمله ژن‌هایی محسوب می‌شود که پروتئین آن نقش مهمی در تنظیم واکنش گیاهان در برابر تنش‌های محیطی از قبیل تنش شوری، خشکی، سرما و تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند. توالی آمینو اسیدی این ژن بسیار مشابه ژن *MET22/HAL2* در مخمر (Gläser et al. 1993) و ژن *CysQ* در *E. coli* است (Neuwald et al. 1992). این ژن کد کننده یک آنزیم با دو کارکرد شامل $3(2,5)$ بیس فسفات نوکلئوتیداز اینوزیتول پلی فسفات ۱- فسفاتاز می‌باشد (Xiong et al. 2001) و از طریق هیدرولیز IP_3 در تنظیم میزان بیان ژن‌های واکنش گر به تنش و در نتیجه واکنش گیاه به تنش‌های محیطی موثر است (Xiong et al. 2002). اغلب جهش‌های موجود در این ژن باعث تغییر در میزان بیان ژن‌های واکنش گر به تنش و در نتیجه تغییر واکنش گیاهان جهش یافته به تنش‌های محیطی شده است. از جمله این جهش‌ها، جهش نقطه‌ای *ron1-1* می‌باشد که سبب جایگزینی نوکلئوتید G با نوکلئوتید A در ابتدای اگزون شماره پنج این ژن شده است (Robles et al. 2010) (شکل ۱). این جهش سبب اختلال در هموستازی اکسین در الگوی آوندی، تشکیل ریشه‌های جانبی، طولیل شدن ریشه‌های مویی، شاخه گرایی جوانه‌ها و غالبیت انتهایی گیاهان موتانت نسبت به گیاهان مادری *Ler-0* شده است (Robles et al. 2010). در ژن *RONI* جهش‌های متعددی شناسایی شده که منجر به تاثیر فنوتیپی و فیزیولوژیکی در گیاهان موتانت شده است. از جمله این جهش‌ها می‌توان به جهش *fry1-1* که باعث کاهش آستانه تحریک و افزایش بیان ژن‌های واکنش گر (*ADH*، *HPS70* و *KIN1*) به تنش اسمزی و تیمار ABA می‌شود (Xiong et al. 2001)، جهش *hos2* سبب افزایش بیش از حد بیان ژن‌های واکنش گر به سرما می‌شود (Kim and Armim 2009)، جهش *fry1-6* باعث کوتولگی و تاخیر در گلدهی گیاهان می‌شود (Xiong et al.

¹ Inositol 1,4,5-trisphosphate

² *Rotundal-1*

³ *Landsberg erecta*

سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان جهت اندازه‌گیری تاثیر جهش نقطه‌ای *ron1-1* در ژن *RONI* بر سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی گیاه، فعالیت آنزیم‌های APX و CAT اندازه‌گیری شد. در این بررسی سنجش ارتباط بین میزان ROS و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد نظر می‌باشد. به منظور سنجش میزان فعالیت آنزیم‌ها، ابتدا استخراج عصاره آنزیمی با استفاده از روش (Beauchamp and Fridovich 1971) انجام گرفت. سپس جهت سنجش میزان آنزیم APX از روش (nakano and Asada 1981) با اندکی تغییر و آنزیم CAT از روش (Chance and Maehly 1955) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل PG Instruments ItdT80+UV/VIS) انجام شد.

بررسی میزان نسبی بیان ژن‌ها

جهت مطالعه میزان بیان ژن‌های *APX*, *APX1*, *DEFL*، در غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار آمینوتریازول، ابتدا از برگ‌های گیاهچه‌ها نمونه‌گیری شد و سپس استخراج RNA از نمونه‌ها مطابق با دستورالعمل کیت *RNX-plusTM* (Cinaclon) انجام شد. جهت بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر و ژل آگارز یک درصد استفاده شد. سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت *RevertAid H-minus MMuLV* Transcriptase (Fermentas) انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) جهت انجام Real time PCR با استفاده از نرم‌افزار PerlPrimer v.1.1.10 طراحی شدند. دستگاه مورد استفاده جهت انجام واکنش تکثیر *BIORAD CFX96 (USA)* بود. برنامه PCR در این واکنش‌ها به صورت 94°C - ۳ دقیقه، 94°C - ۱۵ ثانیه، 58°C - ۲۰ ثانیه و 72°C - ۳۰ (۴۰ سیکل) ثانیه اعمال شد. از ژن *ACTIN2* برای نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان ژن *DEFL* و از ژن *UBQ5* جهت نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان ژن‌های *sAPX* و *APX1* هر کدام در سه تکرار استفاده شد. همچنین جهت تجزیه داده‌ها و رسم گراف‌ها از نرم‌افزار *genex 2004* [بر پایه معادله (Schmittgen and Livak 2001)] یا همان $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ متعلق به شرکت *BIORAD (USA)* استفاده شد.

کشت) در محیط MS تازه حاوی غلظت‌های مختلف آمینوتریازول (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار) واکنش^۱ شدند. پس از گذشت ۴ روز، ویژگی‌های مورفولوژیکی از قبیل وزن تر ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل در ۱۰ عدد گیاه بدون ریشه (۱۴ روزه) به وسیله ترازو دقیق در گیاهان مونتانت *ron1-1* و گیاهان مادری (*Ler-0*) اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل با دو عامل ژنوتیپ در دو سطح و آمینوتریازول در ۵ سطح بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS نسخه ۹/۱ تجزیه شدند.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل

جهت استخراج کلروفیل و کاروتنوئیدها از روش (Arnon 1994) با اندکی تغییر استفاده شد. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۶۵/۲ نانومتر برای محتوای کلروفیل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل PG Instruments ItdT80+UV/VIS) قرائت شد.

آزمایش DAB

برای انجام آزمایش *DAB²*، ابتدا پودر *DAB* (Sigma) با غلظت یک گرم بر لیتر در بافر استات تریس 50 mM (pH=5) حل شد. جهت نمایان شدن رنگ آمیزی *DAB* باید کلروفیل برگ‌ها حذف شود. جهت انجام این کار از محلول باز دارنده کلروفیل استفاده شد که در آن از اسید لاکتیک، گلیسرول، اتانول ۹۵ درصد به نسبت ۳:۱:۱ استفاده شد. پس از تهیه بافر *DAB*، گیاهان ۱۴ روزه فاقد ریشه و تیمار شده با غلظت‌های مختلف آمینوتریازول، در محلول ذکر شده به مدت ۱۶ ساعت (Over night) در شیکر (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور/دقیقه) در شرایط تاریکی قرار داده شدند. سپس، محلول بازدارنده کلروفیل به نمونه‌ها اضافه شده و به منظور حذف کامل کلروفیل گیاهچه‌ها به مدت ۱۰ - ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند که در این مرحله تنش اکسیداتیو در برگ‌ها به صورت لکه‌های قهوه‌ای رنگ نمایان می‌شود (Thordal-Christensen et al. 1997).

¹ Subculture

² 3,3'- Diaminobenzidine

جدول ۱- توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیا ژن‌ها

نام آغازگر	توالی آغازگر (۳' → ۵')	دمای اتصال (°C)
sAPX- Forward	TGCTAATGCTGGTCTTGTGAA	۵۹/۲
sAPX- Revers	CCACTACGTTCTGGCCTAGAT	۶۰/۱
APX1- Forward	GTCCATTCGGAACAATGAGGT	۵۸/۲
APX1- Revers	GTGGGCACCAGATAAAGCGAC	۵۹/۷
DEFL-Forward	CTTAGTCATTTCCGATGTGCC	۵۳/۷
DEFL-Revers	GCATCTTCCACCTTTAGCTC	۵۵/۳
Actin2- Forward	CCACTATGTTCTCAGGTATCG	۵۲/۲
Actin2-Revers	CTTGAGATCCACATCTGCT	۵۴/۳
UBQ5-Forward	GTGGTGCTAAGAAGAGGAAG	۵۵
UBQ5-Revers	GATCAAGCTTCAACTCCTTCT	۵۵

نتایج و بحث

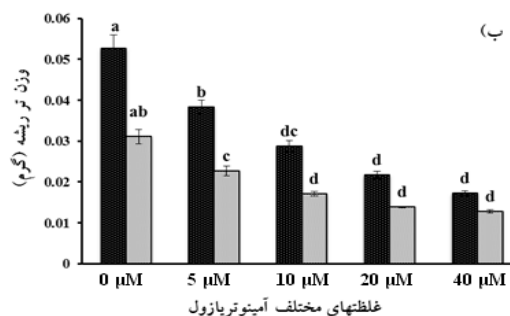
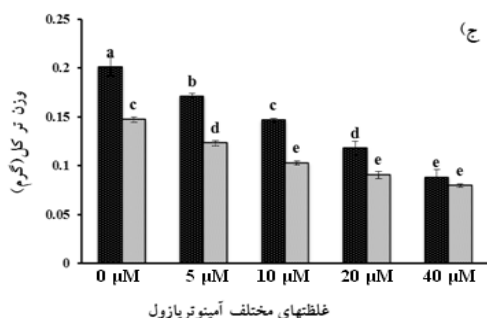
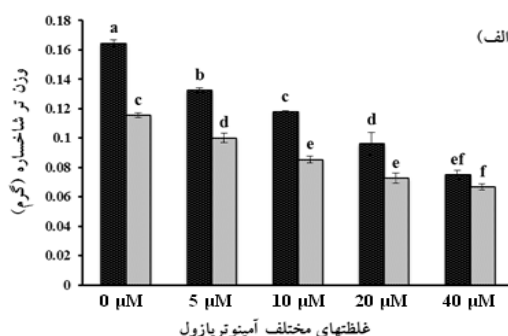
آمینوتریازول به عنوان یکی از القا کننده‌های تنش اکسیداتیو باعث کاهش شدید رشد گیاه می‌شود. لذا واکنش گیاهان موتانت به غلظت‌های مختلف آمینوتریازول اندازه‌گیری وزن تر شاخساره، وزن تر ریشه، وزن تر کل و مقایسه با گیاهچه‌های مادری بررسی شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی وزن تر شاخساره حاکی از اختلاف معنی‌دار اثر متقابل ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ($P \geq 0/01$) می‌باشد (جدول ۲). همانطور که در شکل (۲-الف) مشاهده می‌شود بیشترین میزان وزن تر شاخساره به گیاهچه‌های مادری در غلظت شاهد اختصاص داشته، و کمترین میزان وزن تر شاخساره در غلظت ۴۰ میکرومولار در هر دو گیاهچه شاهد و موتانت *ron1-1* مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار ($P \geq 0/01$) در غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار آمینوتریازول بین گیاهان موتانت *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (*Ler-0*) بوده، اما اختلاف معنی‌دار در غلظت ۴۰ میکرومولار آمینوتریازول بین آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۲-الف). گیاهان موتانت *ron1-1* در غلظت صفر میکرومولار آمینوتریازول (شاهد) دارای اختلاف معنی‌دار ($P \geq 0/01$) با گیاهان مادری (*Ler-0*) هستند که دلیل اصلی این تفاوت وجود موتاسیون *ron1-1* در ژن *RONI* (Robles et al. 2010) می‌باشد، به طوری که میزان وزن تر شاخساره در گیاهان موتانت در غلظت شاهد از آمینوتریازول با وزن تر شاخساره در گیاهان مادری در غلظت ۱۰

میکرومولار آمینوتریازول برابر می‌باشد. لذا احتمالاً وقوع موتاسیون *ron1-1* در ژن *RONI* موجب کاهش معنی‌دار در روند رشد و نمو و کاهش وزن شاخساره در گیاهچه‌های موتانت شده است (Robles et al. 2010). با افزایش غلظت آمینوتریازول میزان وزن تر شاخساره در گیاهان موتانت و مادری به طور مداوم کاهش می‌یابد، اما این کاهش در گیاهان مادری بیشتر مشهود است که حاکی از واکنش قابل توجه گیاهان مادری به غلظت‌های مختلف آمینوتریازول است. در حالی‌که واکنش گیاهچه‌های موتانت به غلظت‌های مختلف آمینوتریازول اندک و محدود بوده، تا جایی‌که تفاوت وزن شاخساره در ۲۰ و ۴۰ میکرومولار آمینوتریازول در گیاهچه‌های موتانت معنی‌دار نیست. همچنین عدم اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها در غلظت ۴۰ میکرومولار می‌تواند به دلیل سمیت بالای آمینوتریازول در این غلظت باشد که سبب مرگ سلولی در گیاهان مادری و موتانت شده است (Mehrov et al. 2012; Gadjev et al. 2008). روند کاهش رشد و نمو در گیاهچه‌های ترانسژنیک موتانت *fry1-6* آرابیدوپسیس که حاوی یک T-DNA در ژن *RONI* هستند نیز گزارش شده است (Kim and Arnim 2009). نتایج به دست آمده برای صفت وزن تر ریشه از حاکی وجود اختلاف معنی‌داری برای ژنوتیپ، غلظت‌های آمینوتریازول و اثر متقابل آنها می‌باشد (جدول ۲). همانطور که در شکل (۲-ب) مشاهده می‌شود بیشترین میزان وزن تر ریشه به گیاهچه‌های مادری در غلظت شاهد اختصاص داشته و کمترین میزان وزن تر ریشه در غلظت ۴۰ میکرومولار در

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان جهش‌یافته و مادری آرابیدوپسیس در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول

میانگین مربعات (MS)						درجه آزادی	منابع تغییرات
CAT آنزیم	APX آنزیم	محتوای کلروفیل کل	وزن تر کل	وزن تر ریشه	وزن تر شاخساره	(df)	(SOV)
۰/۰۳۲**	۰/۰۱۴*	۲۴/۷۶**	۰/۰۱۲**	۰/۰۰۱۲**	۰/۰۰۶۲**	۱	ژنوتیپ
۰/۲۴**	۰/۰۳۱**	۳۷/۹۱**	۰/۰۰۹**	۰/۰۰۰۷**	۰/۰۰۴۴**	۴	آمینوتریازول
۰/۰۰۱۶ ^{ns}	۰/۰۰۶۱*	۰/۱۶ ^{ns}	۰/۰۰۰۹**	۰/۰۰۰۰۶*	۰/۰۰۰۴**	۴	ژنوتیپ × آمینوتریازول
۰/۰۰۲۴	۰/۰۰۱۹	۰/۴۳	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۳۳	۲۰	اشتباه آزمایشی
						۲۹	کل

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



شکل ۲- مقایسه میانگین خصوصیات رشدی گیاهان مادری و موتانت *ron1-1* (الف) وزن تر شاخساره (گرم)؛ (ب) وزن تر ریشه (گرم)؛ (ج) وزن تر کل (گرم). مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن انجام شد و میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی‌داری ندارند. ستون‌های سیاه و خاکستری به ترتیب *ron1-1* و *Ler-0* می‌باشد.

غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار در گیاهان مادری (*Ler-0*) دیده شد، اما در گیاهان موتانت اختلافی مشاهده نشد که احتمالاً این نتیجه می‌تواند بیانگر واکنش بیشتر گیاهان مادری (*Ler-0*) به آلودگی ایجاد شده توسط آمینوتریازول در مقایسه با گیاهان موتانت *ron1-1* باشد. میزان تفاوت وزن تر ریشه در گیاهان موتانت با گیاهچه‌های مادری در غلظت شاهد از آمینوتریازول بیش از ۱۰ میلی‌گرم بود. گیاهان موتانت *ron1-1* در این غلظت

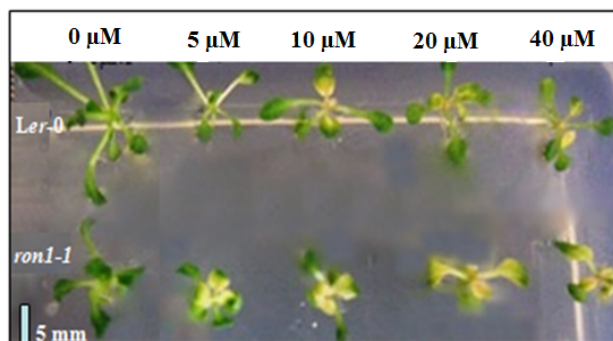
هر دو گیاهچه مادری و موتانت *ron1-1* مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین ($P \geq 0.05$)، نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های صفر، ۵ و ۱۰ میکرومولار آمینوتریازول در هر دو ژنوتیپ به لحاظ وزن تر ریشه است، ولی در غلظت بالای آمینوتریازول احتمالاً به دلیل افزایش سمیت بیش از حد برای هر دو ژنوتیپ، اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد (شکل ۲-ب). همچنین اختلاف معنی‌دار ($P \geq 0.05$) بین

تر در گیاهان موتانت در صورت عدم استفاده از آمینوتریازول (غلظت شاهد) برابر وزن تر گیاهان مادری در غلظت ۱۰ میکرومولار آمینوتریازول می‌باشد که این کاهش به طور اختصاصی به وجود موتاسیون در گیاهچه‌های *ron1-1* مربوط می‌باشد. تنش القا شده توسط غلظت‌های مختلف آمینوتریازول حساسیت بیشتر گیاهان موتانت *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری را به دنبال داشته است. بنابراین علاوه بر کاهش رشد شاخساره، موتاسیون *ron1-1* موجب کاهش وزن تر ریشه و وزن تر کل شد که این کاهش با افزایش غلظت آمینوتریازول روندی افزایشی دارد. استفاده از آمینوتریازول به میزان ۷ میکرومولار باعث کاهش وزن تر گیاهچه‌های یک هفته‌ای موتانت حساس به تنش اکسیداتیو *loh2* در مقایسه با گیاهچه‌های مقاوم به تنش اکسیداتیو در موتانت *atr7* آراییدوپسیس شده است (Mehtrov et al. 2012). همچنین کاهش وزن تر در گیاهچه‌های یک هفته‌ای موتانت *loh2* حساس در مقایسه با گیاهچه‌های موتانت *atr4*، *atr5* مقاوم به تنش اکسیداتیو در غلظت‌های (۵، ۷، ۹ میکرومولار) آمینوتریازول گزارش کردند (Qureshi et al. 2011) که در واقع تایید کننده نتایج ارایه شده در این تحقیق می‌باشد. از آنجا که میزان سبزیگی برگ‌های گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* و گیاهان مادری با افزایش غلظت آمینوتریازول (۴ روز پس از واکنش) با کاهش قابل توجهی همراه بود (شکل ۳)، لذا میزان محتوای کلروفیل در این گیاهان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس این صفت، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها و غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ($P \geq 0/01$) و عدم وجود اختلاف معنی‌دار اثر متقابل ژنوتیپ و آمینوتریازول می‌باشد (جدول ۲). با توجه به شکل (۴-الف) با افزایش غلظت آمینوتریازول میزان محتوای کلروفیل کل کاهش می‌یابد ($P \geq 0/01$). همچنین در مقایسه دو ژنوتیپ، کاهش محتوای کلروفیل کل در گیاهان موتانت *ron1-1* به طور معنی‌داری ($P \geq 0/01$) در مقایسه با گیاهان مادری بیشتر بوده (شکل ۴-ب) که احتمالاً به دلیل مرگ سلولی بیشتر در آنها بوده است. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت گیاهان موتانت به تنش اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتریازول می‌باشد.

از آمینوتریازول (شاهد) دارای اختلاف معنی‌داری ($P \geq 0/05$) با گیاهان مادری (*Ler-0*) می‌باشند. دلیل اصلی این تفاوت وجود موتاسیون *ron1-1* در ژن *RONI* می‌باشد (Robles et al. 2010). روند کاهش توسعه ریشه در گیاهچه‌های ترانسژنیک موتانت *fryl-6* آراییدوپسیس که حاوی یک T-DNA در ژن *RONI* هستند نیز گزارش شده است (Chen et al. 2012). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از بررسی وزن تر کل گیاه نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها، غلظت‌های آمینوتریازول و اثر متقابل آنها ($P \geq 0/01$) می‌باشد (جدول ۲). همانطور که در شکل (۲-ج) مشاهده می‌شود بیشترین میزان وزن تر کل به گیاهچه‌های مادری در غلظت شاهد اختصاص داشته و کمترین میزان وزن تر کل در غلظت ۴۰ میکرومولار در هر دو گیاهچه شاهد و موتانت *ron1-1* مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری ($P \geq 0/01$) بین غلظت‌های (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) آمینوتریازول بین گیاهان موتانت *ron1-1* و مادری (*Ler-0*) می‌باشد، اما این اختلاف معنی‌دار در غلظت ۴۰ میکرومولار آمینوتریازول مشاهده نشد (شکل ۲-ج). البته میزان کاهش وزن تر کل در گیاهان موتانت از غلظت شاهد به غلظت ۱۰ میکرومولار دچار کاهش معنی‌داری شده ولی اختلاف معنی‌داری در وزن تر کل بین سطوح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار آمینوتریازول در ژنوتیپ موتانت مشاهده نشد که این می‌تواند به دلیل کاهش واکنش گیاهان موتانت به تنش آمینوتریازول ایجاد شده باشد که در غلظت‌های بالا سبب ایجاد مرگ سلولی زود هنگام می‌شود. اما در گیاهان مادری (*Ler-0*) بین غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار اختلاف معنی‌دار ($P \geq 0/01$) مشاهده شد که می‌تواند بیان‌گر واکنش قابل توجه گیاهان مادری (*Ler-0*) به تنش اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتریازول باشد. به طور کلی گیاهان موتانت *ron1-1* در غلظت صفر میکرومولار آمینوتریازول (شاهد) دارای اختلاف معنی‌داری ($P \geq 0/01$) با گیاهان مادری می‌باشند که این تفاوت به دلیل موتاسیون *ron1-1* ایجاد شده در ژن *RONI* بوده که سبب کاهش وزن تر (شاخساره، ریشه و کل) در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری شده است. همان گونه که در شکل (۲-الف، ب و ج) مشاهده می‌شود میزان وزن

چرخه گلوتاتیون-آسکوربات (Edreva 2005) و یکی از عوامل اصلی سم‌زدایی ROS در کلروپلاست می‌باشد (Wang et al. 1999) و همچنین به عنوان یکی از قویترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های گیاهی، افزایش فعالیت این آنزیم در گیاهان موتانت نسبت به گیاهان مادری (*Ler-0*) می‌تواند به عنوان یکی از عوامل مهم کاهش‌دهنده ROS در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* محسوب شود (شکل ۶). از جمله ایزوفرم‌های آن می‌توان به APX1 و APX2 در گیاهان اشاره کرد که از مهمترین عوامل تخریب H_2O_2 بوده که تاثیر آن در شرایط نامساعد محیطی از آنزیم CAT بیشتر می‌باشد (Wang et al. 1999). همچنین افزایش فعالیت این آنزیم (APX) در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول در گیاهان موتانت *ron1-1* سبب افزایش تجزیه ROS خصوصا H_2O_2 شده است. در بسیاری از گزارش‌ها افزایش فعالیت آنزیم APX موجب کاهش میزان ROS خصوصا H_2O_2 شد. استفاده از آمینوتریازول باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم APX به میزان ۱/۵ الی دو برابر در توتون شد (Gechev et al. 2002).

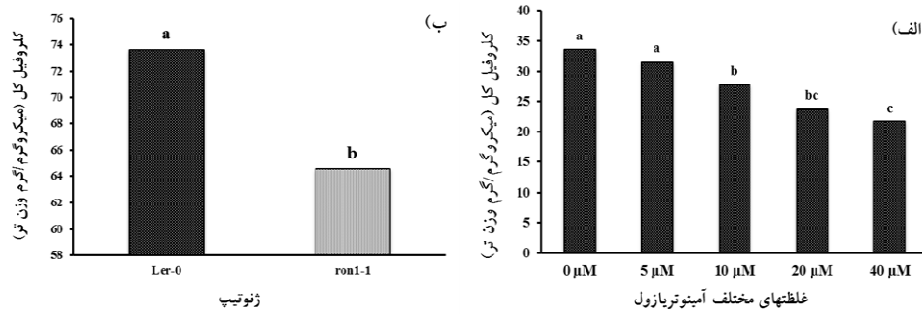
آمینوتریازول مهارکننده فعالیت آنزیم CAT می‌باشد که با تجمع H_2O_2 سبب مهار فعالیت آن شده و تنش اکسیداتیو را القا می‌کند و در نهایت مرگ سلولی را باعث می‌شود (Gadjev et al. 2008). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی میزان فعالیت آنزیم CAT نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ و سطوح غلظت آمینوتریازول ($P \geq 0/01$) بوده اما برای اثر متقابل آن‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین ($P \geq 0/01$) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف آمینوتریازول با گیاهان شاهد (صفر میکرومولار آمینوتریازول) بوده به نحوی که با افزایش غلظت آمینوتریازول فعالیت این آنزیم کاهش یافته‌است (شکل ۵-ب)، همچنین اختلاف معنی‌داری ($P \geq 0/01$) بین دو ژنوتیپ مادری و موتانت برای فعالیت آنزیم CAT مشاهده شد (شکل ۵-ج)، بدین صورت که میزان فعالیت این آنزیم در گیاهان موتانت با اختلاف بسیار معنی‌داری بیشتر از گیاهان مادری می‌باشد. لذا با توجه به کاهش شدید فعالیت آن در گیاهان مادری در اثر آمینوتریازول، میزان تجمع ROS خصوصا H_2O_2 در گیاهان



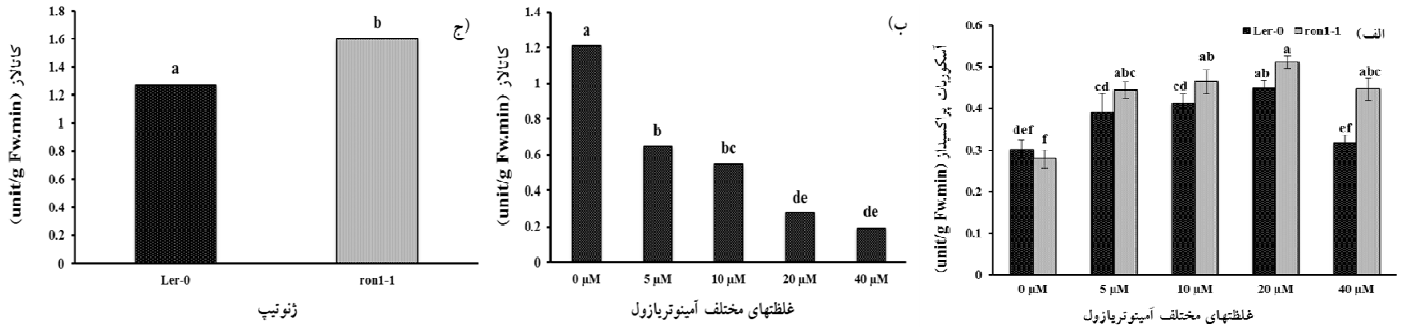
شکل ۳- تیمار گیاهان (مرحله ۴ برگی) مادری (*Ler-0*) و موتانت *ron1-1* آراییدوپسیس در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول برای مدت ۴ روز. مقیاس ۵ میلی‌متر می‌باشد.

استفاده از آمینوتریازول به میزان ۷ میکرومولار باعث کاهش میزان کلروفیل کل در گیاهچه‌های یک هفته‌ای *atr7* در مقایسه با گیاهچه‌های *loh2* در آراییدوپسیس شده است (Mehrov et al. 2008). کاهش میزان محتوای کلروفیل نیز در گیاهچه‌های موتانت *old3-1* که حاوی یک موتاسیون نقطه‌ای در ژن سنتز کننده سیستئین در آراییدوپسیس هستند در واکنش به آلودگی اکسیداتیو ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف کادمیوم مشاهده شد (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010).

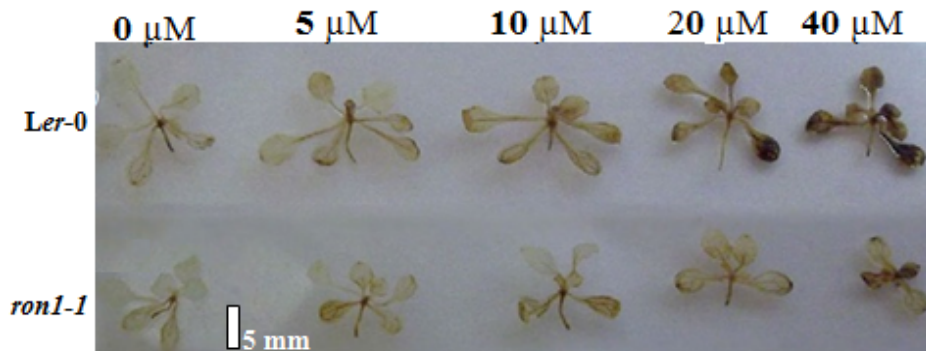
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی میزان آنزیم APX نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار برای ژنوتیپ‌ها، غلظت‌های مختلف آمینوتریازول و اثر متقابل آنها می‌باشد (جدول ۲). باتوجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها ($P \geq 0/05$)، اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول برای فعالیت این آنزیم مشاهده شد (شکل ۵-الف). جالب توجه این است که افزایش غلظت آمینوتریازول در ژنوتیپ‌های موتانت و مادری موجب افزایش فعالیت آنزیم APX شد که این افزایش دارای تفاوت معنی‌داری در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول بین گیاهان موتانت *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (*Ler-0*) می‌باشد. البته وقوع موتاسیون *ron1-1* در ژن *RONI* موجب افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم APX در گیاهچه‌های موتانت در واکنش به افزایش غلظت از ۱۰ میکرومولار آمینوتریازول به بالا شده است. در حالی که در غلظت شاهد میزان فعالیت آنزیم APX در گیاهچه‌های موتانت و مادری مشابه است. باتوجه به اینکه این آنزیم یکی از مهم‌ترین اجزای



شکل ۴- مقایسه میزان کلروفیل کل. الف) در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول و ب) در ژنوتیپ‌های مادری (*Ler-0*) و گیاهان مونتات *ron1-1*. مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن انجام شد. میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی داری ندارند.



شکل ۵- مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز. الف) میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)؛ ب) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بین غلظت‌های مختلف آمینوتریازول؛ ج) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بین ژنوتیپ *Ler-0* و مونتات *ron1-1*. مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن انجام شد و میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی داری با هم ندارند.



شکل ۶- میزان تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان مادری (*Ler-0*) و مونتات (*ron1-1*) آراییدوپسیس تحت تنش اکسیداتیو القا شده با آمینوتریازول با استفاده از ماده رنگ‌آمیزی DAB قسمت هوایی گیاهچه‌های هوایی ۱۴ روزه (۴ برگه) در این آزمایش استفاده شدند. مقیاس ۵ میلی‌متر می‌باشد.

مادری (*Ler-0*) نسبت به مونتات *ron1-1* افزایش یافته‌است که با نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی DAB مطابقت دارد (شکل ۶). با توجه به شکل (۵- ب و ج) این نتایج به همراه نتایج بدست آمده در خصوص میزان آنزیم APX (شکل ۵- الف) در گیاهان مونتات می‌تواند به عنوان عوامل مهم افزایش تخریب H_2O_2 در گیاهان مونتات در مقایسه با گیاهان مادری در شرایط تنش اعمال شده محسوب شود. از سوی دیگر احتمالاً میزان اولیه تجمع

H_2O_2 در گیاهچه‌های مونتات به مراتب از گیاهان مادری کمتر است که با افزایش میزان این آنزیم در گیاهچه‌های مونتات در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول، همانطور که در آزمون DAB (شکل ۶) مشاهده می‌شود، میزان تجمع H_2O_2 در گیاهچه‌های مونتات در غلظت شاهد و دیگر غلظت‌های آمینوتریازول از گیاهچه‌های مادری کمتر است. بنابراین وقوع موتاسیون *ron1-1* همانطور که در غلظت‌های شاهد مشاهده می‌شود، تاثیری بر میزان

فعالیت آنزیم CAT ندارد. ولی وقوع موتاسیون *ron1-1* باعث کاهش چشمگیر تجمع مولکولهای H_2O_2 در گیاهچه‌های موتانت شده است (شکل ۶). استفاده از آمینوتریازول به میزان ۱۰ میلی‌مولار به صورت اسپری روی برگ گیاهان توتون باعث کاهش سه برابری میزان فعالیت آنزیم CAT شده است (Gechev et al. 2002). همچنین استفاده از آمینوتریازول به میزان دو میلی‌مولار در آرابیدوپسیس سبب کاهش دو برابری میزان فعالیت این آنزیم شده است (May and Leaver 1993). آنزیم CAT 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; Corpas et al. 2009)، اما با توجه به اینکه آمینوتریازول مهارکننده فعالیت آنزیم CAT می‌باشد فعالیت این آنزیم در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول به طور چشمگیری کاهش یافته است و سبب القا تنش اکسیداتیو شده است.

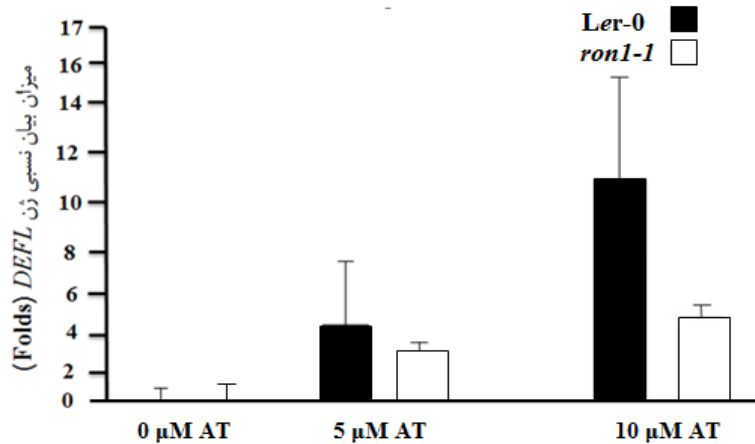
در بررسی میزان تجمع ROS با استفاده از محلول DAB، بخش‌های هوایی گیاهچه‌های ۱۴ روزه‌ای که ۴ روز در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف آمینوتریازول نگهداری شده بودند در محلول DAB رنگ‌آمیزی شدند. در اثر واکنش این ماده با H_2O_2 رنگ قهوه‌ای در برگ نمونه‌های تیمار شده تولید می‌شود. میزان قهوه‌ای شدن برگ‌ها متناسب با میزان حضور H_2O_2 و احتمالاً حضور سایر ROS در برگ‌ها است، به‌صورتی که هر اندازه میزان آنها بیشتر باشد شدت رنگ قهوه‌ای بیشتر می‌شود. با توجه به نتایج این آزمایش، میزان حضور ROSها خصوصاً H_2O_2 با افزایش غلظت آمینوتریازول در گیاهان موتانت و مادری (*Ler-0*) افزایش می‌باشد. اما میزان افزایش حضور آنها در گیاهان مادری به مراتب بیشتر از گیاهان موتانت می‌باشد (شکل ۶). علی‌رغم کاهش میزان تجمع ROSها در سطوح مختلف آمینوتریازول در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری، همان‌طور که در آزمایش‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ملاحظه شد میزان حساسیت گیاهچه‌های موتانت به تنش اکسیداتیو القا شده بیشتر بوده است. همچنین میزان مرگ سلولی و کاهش سبزیگی در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول در گیاهان موتانت بیشتر مشاهده شد (شکل ۳). میزان فعالیت آنزیم APX در غلظت‌های مختلف

آمینوتریازول و همچنین میزان فعالیت آنزیم CAT در برخی غلظت‌ها در گیاهان موتانت بیشتر از گیاهان مادری (*Ler-0*) می‌باشد. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها سبب تخریب ROS خصوصاً H_2O_2 می‌شوند (Wang et al. 1999). لذا با توجه به نقش بسیار مهم آنزیم APX در تجزیه H_2O_2 و همچنین به عنوان یکی از مهم‌ترین اجزای چرخه گلوکاتایون-آسکوربات (Edreva 2005)، افزایش فعالیت آن در گیاهان موتانت می‌تواند باعث کاهش تجمع ROS شود (شکل ۵-الف). کاهش مشابهی در میزان تجمع ROS در گیاهچه‌های موتانت *alx8* که یکی از موتانت‌های اختصاصی ژن *SALI/RONI* محسوب می‌شود در واکنش به خشکی نیز مشاهده شد (Estavillo et al. 2012). از آن‌جا که آمینوتریازول به عنوان ممانعت‌کننده فعالیت آنزیم CAT محسوب می‌شود، اثر ممانعت‌کنندگی آن در غلظت‌های مختلف در گیاهچه‌های مادری بیشتر بوده است، لذا می‌توان گفت فعالیت آنزیم CAT در گیاهچه‌های مادری به شدت کاهش یافته است و میزان تجمع H_2O_2 در گیاهان مادری بیشتر مشاهده می‌شود. با توجه به این‌که نتایج آزمایش سنجش میزان ROS در گیاهچه‌ها حاکی از کاهش میزان آنها در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* بود، جهت بررسی مولکولی این موضوع میزان نسبی بیان ژن‌های مارکر تنش اکسیداتیو به روش Real time PCR اندازه‌گیری شد.

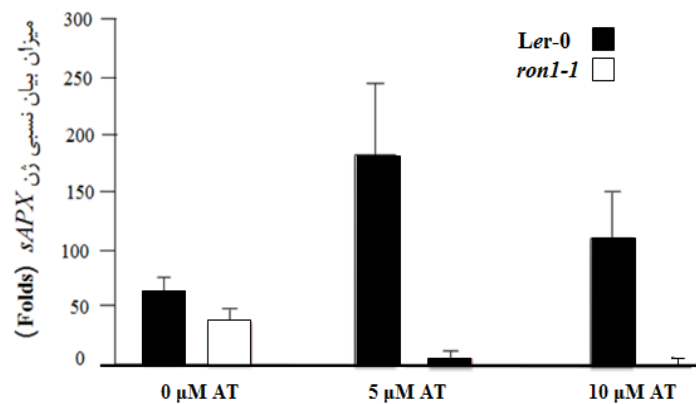
ژن *DEFL*^۱ یکی از ژن‌های مارکر تنش اکسیداتیو است که بیان آن در واکنش به افزایش ROS در گیاه افزایش می‌یابد (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010). الگوی بیانی ژن *DEFL* در گیاهچه‌های مادری با افزایش غلظت آمینوتریازول افزایش می‌یابد (شکل ۷) و میزان بیان آن در گیاهچه‌های مادری در کلیه غلظت‌های آمینوتریازول بیشتر از گیاهان موتانت است. به نحوی که در غلظت ۱۰ میکرومولار آمینوتریازول بیان آن در گیاهان مادری نسبت به گیاهان موتانت *ron1-1* حدود ۲/۵ برابر افزایش داشته است (شکل ۷). این افزایش بیان نشان‌دهنده افزایش حضور ROS خصوصاً H_2O_2 بوده که با نتایج به دست آمده در آزمایش DAB (شکل ۶) مطابقت دارد. از آن جایی‌که، این ژن یکی از ژن‌های مارکر تنش اکسیداتیو بوده و بیان آن در واکنش به تجمع ROS در گیاهان افزایش می‌یابد

^۱ Defensin-like

ژنتیک نوین / دوره دهم / شماره ۲ / تابستان ۱۳۹۴



شکل ۷- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *DEFL* در گیاهان مادری (*Ler-0*) و گیاهان موتانت *ron1-1* آرابیدوپسیس در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول.



شکل ۸- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *sAPX* در گیاهان مادری (*Ler-0*) و گیاهان موتانت *ron1-1* در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول.

های محیطی به شدت پاسخ می‌دهند. با وجود این که سیتوسول منبع اصلی تولید ROS نمی‌باشد (Yoshimura et al. 2000; Ishikawa et al. 2008)، اما *APX*‌های سیتوسولی (*APX1*, *APX2*) با افزایش ROS در گیاهان تحت تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد. ژن *APX1* کد کننده آنزیم سیتوسولی *APX1* می‌باشد که در پاسخ به انواع تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد. کاهش قابل توجه میزان بیان ژن *APX1* در آرابیدوپسیس موجب افزایش حساسیت به انواع تنش‌های محیطی از قبیل سرما، نور زیاد، خشکی، گرما و تیمار با عوامل القا کننده ROS (مانند متیل واپلوژن) شد (Pnueli et al. 2003; Koussevitzky et al. 2008). میزان بیان ژن *APX1* با افزایش غلظت آمینوتریازول (۵ میکرومولار) و القا تنش اکسیداتیو تقریباً حدود ۲۵ برابر بیان اولیه افزایش یافت. ولی این

(Shirzadian-Khorramabad et al. 2010)، افزایش بیان ۲/۵ برابری آن در گیاهان مادری (*Ler-0*) در مقایسه با گیاهان موتانت *ron1-1* حاکی از افزایش میزان تجمع ROS در گیاهان مادری می‌باشد. جهت ایجاد مقاومت به تنش‌های مختلف محیطی وجود میزان معینی از ROS در گیاه ضروری است، این در حالی است که کاهش آن از حد معینی، همان‌طور که در گیاهان موتانت *ron1-1* مشاهده می‌شود، موجب حساسیت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود. اپزوفرم‌های آنزیم *APX* از جمله تنظیم کننده‌های مهم در حالت اکسیداتیو- احیا در سلول‌ها می‌باشند که در کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی‌زوم‌ها و سیتوسول یافت شده‌اند (Foyer et al. 2001; Mittler et al. 2004; Foyer et al. 2005) *APX*‌های سیتوسولی (*APX1*, *APX2*) در پاسخ به انواع تنش

گیاهان مادری از سایر روش‌های القا تنش از قبیل تنش‌های زنده و غیرزنده و همچنین عناصر سنگین دیگر مانند کادمیوم استفاده شود. علاوه بر آن می‌توان جهت بررسی دقیق میزان حساسیت گیاهان موتانت، بیان نسبی ژن‌های شاخص در تنش اکسیداتیو از قبیل *APX2*² و *ELIP2*² و همچنین میزان متابولیت‌های ثانویه مانند گلوکوتایون و آسکوربات با روش HPLC را اندازه‌گیری کرد.

منابع

- Adams B (2003) Linking the xanthophyll cycle with thermal energy dissipation. *Photosynthesis Research* 76: 73-80.
- Ahmed P, Jaleel C, Azooz M, Gowher N (2009) Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. *Botany Research International* 2: 11-20.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Arnon DI (1949) Copper enzyme in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- Ashraf M, Ali Q (2008) Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and Experimental Botany* 63: 266-273.
- Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14: 93-107.
- Beauchamp C, Fridovich S (1971) Superoxide dismutase Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Chen H, Xiong L (2011) Genetic interaction of two abscisic acid signaling regulators, *HY5* and *FIERY1*, in mediating lateral root formation. *Plant Signaling and Behavior* 6: 123-125.
- Chen H, Zhuofu L, Xiong L (2012) A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress, *HY5* and *FIERY1*, in mediating lateral root formation. *FEBS Letters* 586: 1742-1747.
- Corpas FJ, Hayashi M, Mano Sh, Nishimura M, Barroso JB (2009) Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of arabidopsis plants. *Plant Physiology* 151: 2083-2094.
- 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.

افزایش بیان در گیاهان مادری (*Ler-0*) و موتانت *ron1-1* تقریباً برابر بود و اختلافی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده‌است). با توجه به شکل ۸، الگوی کلی بیان ژن *sAPX* در گیاهان مادری با افزایش غلظت آمینوتریازول به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. به طوری‌که بیان آن در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار آمینوتریازول در گیاهان مادری به بیشترین میزان رسیده و میزان بیان نسبی آن در این گیاهان حدود ۱۵ برابر گیاهان موتانت می‌باشد. از آنجاکه ژن *sAPX* کدکننده آنزیم آسکوربات پراکسیداز استرومایی می‌باشد و در فرآیندهای اکسایش-احیا و پاسخ به تنش اکسیداتیو در استرومای کلروپلاست، در طی توسعه گیاهچه و در بافت‌های آوندی بیان می‌شود و همچنین آنزیم *sAPX* به عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدانی تخریب‌کننده H_2O_2 در سلول‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌است (Wang et al. 1999). بنابراین، افزایش بیان این ژن نشان‌دهنده افزایش حضور ROS خصوصاً H_2O_2 بوده که با نتایج حاصل از آزمایش DAB (شکل ۶) مطابقت دارد. *sAPX* نقش مهمی را زمانی‌که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد در فتوسنتز بازی می‌کند و یون سوپر اکسید تولید شده (O_2^-) در فتوسیستم I به وسیله واکنش مهلر طی دو مرحله کاهش به وسیله آنزیم‌های *APX* و *SOD* به آب تبدیل می‌کند (Mano and Asada 1999). لذا افزایش بیان این ژن در گیاهان مادری (*Ler-0*) نشان دهنده مقاومت آن‌ها در مقایسه با گیاهان موتانت *ron1-1* در تنش اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتریازول می‌باشد.

بنابراین، با توجه به مجموعه نتایج به دست آمده در بخش‌های فنوتیپی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی می‌توان وقوع موتاسیون نقطه‌ای *ron1-1* در ژن *SALI/ RON1* که منجر به عدم بیان ژن فوق و عدم تولید آنزیم *RON1* (Robles et al. 2010) می‌شود را به عنوان یکی از عوامل مهم در کاهش میزان تجمع ROS دانست. لذا با القا تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط آمینوتریازول، اثرات واکنش را می‌توان بصورت حساسیت گیاهان موتانت *ron1-1* نسبت به گیاهان مادری ملاحظه کرد. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، پیشنهاد می‌شود جهت بررسی و مطالعه اثر تنش اکسیداتیو در گیاهان موتانت *ron1-1* در مقایسه با

² Early light-inducible protein2

¹ Stomal ascorbate peroxidase

- Edreva A (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. *Plant Physiology* 12: 63-71.
- Esfandiari EO, Shakiba MR, Mahboob SA, Alyari H, Toorchi M (2007) Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5: 48-53.
- Estavillo GM, Crisp PA, Pornsiriwong W, Wirtz M, Collinge D, Carrie C, Giraud E, Whelan J, David P, François O, Blum MGB, Jakobsson M, Rosenberg NA (2008) Demographic history of European populations of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 4:e1000075.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Foyer CH, Shigeoka S (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology* 155: 93-100.
- Gadjev I, Stone JM, Gechev T (2008) Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *Interational Review of Cell and Molecular Biology* 270: 87-144.
- 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 signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141: 436-445.
- Gechev T, Ferwerda M, Mehterov N, Laloi C, Qureshi MK, Hille J (2008) *Arabidopsis* AAL-toxin-resistant mutant atr1 shows enhanced tolerance to programmed cell death induced by reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 375: 639-644.
- Gläser H, Thomas D, Gaxiola R, Montrichard F, Surdin-Kerjan Y, Serrano R (1993) Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO Journal* 12: 3105.
- Hirsch J, Misson J, Crisp PA, David P, Bayle V (2011) A Novel *fry1* Allele Reveals the Existence of a Mutant Phenotype Unrelated to Exoribonuclease (XRN) Activities in *Arabidopsis thaliana* Roots. *PLoS ONE* 6: e16724.
- Ishikawa T, Shigeoka S (2008) Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72: 1143-1154.
- Kim BH, Arnim AG (2009) *FIERY1* regulates light-mediated repression of cell elongation and flowering time via its 3 (2), 5-bisphosphate nucleotidase activity. *Plant Journal* 58: 208-219.
- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, Mittler R (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *Journal of Biological Chemistry* 283:34197-34203.
- May MJ, Leaver ChJ (1993) Oxidative Stimulation of Clutathione Synthesis in *A rabidopsis thaliana* Suspension Cultures. *Plant Physiology* 103:621-627.
- McDonald MB (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology* 27: 177-237.
- Mehterov N, Balazadeh S, Hille J, Toneva V, Mueller-Roeber B, Gechev T (2012) Oxidative stress provokes distinct transcriptional responses in the stress-tolerant atr7 and stress sensitive loh2 *Arabidopsis thaliana* mutants as revealed by multiparallel quantitative real-time PCR analysis of ROS marker and antioxidant genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 59: 20e29.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Neuwald A, Krishnan B, Brikun I, Kulakauskas S, Suziedelis K, Tomcsanyi T, Leyh T, Berg D (1992) *cysQ*, a gene needed for cysteine synthesis in *Escherichia coli* K-12 only during aerobic growth. *Journal of Bacteriology* 174: 415-425.
- Pallavi S, Ambuj BJ, Rama Shanker D, Mohammad P (2012) Reactive OxygenSpecies, Oxidaitve Damage and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* doi: 10.1155/2012/217037.
- Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R (2003) Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant Journal* 187-203.
- Quintero FJ, Garciadeblas B, Rodríguez-Navarro A (1996) The SAL1 gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *Plant Cell* 8: 529-537.
- Qureshi MK, Radeva V, Genkov T, Minkov I, Hille J, Gechev TS (2011) Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants with enhanced tolerance to oxidative stress. *Acta Physiologia Plantarum* 33: 375-382.
- Raikhel N (1992) Nuclear targeting in plants. *Plant physiology* 100:1627.
- Robles P, Fleury D, Candela H, Cnops GM, Alonso-Peral M, Anami S, Falcone A, Caldana C, Willmitzer L, Ponce MR, Van Lijsebettens M, Micol JL (2010) The *RON1/FRY1/SAL1* gene is required for leaf morphogenesis and venation patterning in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152:1357-72.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Shirzadian-Khorramabad R, Jing HC, Everts GE, Schippers JHM, Hille J, DijkwelPP (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.

Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* 1187-1194.

Weng XY, H XU, Yang Y, Peng H (2008) Water-water cycle involved in dissipation of excess photon energy in phosphorus deficient rice leaves. *Biologia Plantarum* 52: 307-313.

Wang J, Zhang H, Allen RD (1999) Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant and Cell Physiology* 40: 725-732.

Xiong L, Lee BH, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu JK (2001) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. *Genes and Development* 15:1971-1984.

Xiong L, Karen, Schumaker and S, Zhu JK (2002) Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *Plant Cell* 14: 165-S183.

Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123: 223-234.