

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

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

پیمان منبری<sup>۱</sup>، رضا شیرزادیان خرمآباد<sup>\*</sup><sup>۱</sup>، علی اعلمی<sup>۱</sup>، محمد قدمیاری<sup>۱</sup>

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

Manbari P<sup>1</sup>, Shirzadian-Khorramabad R<sup>\*1</sup>, Alami A<sup>1</sup>, Ghadamyari M<sup>1</sup>

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 آمینوتريازول با مهار فعالیت آنزیم کاتالاز سبب القا تنش اکسیداتیو می‌شود. ژن *RON1/SAL1* از جمله ژن‌های واکنش‌گر به تنش‌های محیطی است که آنزیم آینوزیتول پلی‌فسفات-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 آمینوتريازول بررسی و با گیاهان مادری (*Ler-0*) مقایسه شد. نتایج حاصل نشان دهنده کاهش معنی‌دار وزن تر شاخصاره، ریشه و کل در گیاهان موتانت می‌باشد. همچنین بررسی محتوی کلروفیل نشان دهنده کاهش معنی‌داری در میزان آن در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری بود. علاوه بر آن، افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم آسکوربیات پراکسیداز در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در واکنش به آمینوتريازول در گیاهان موتانت افزایش یافت. بررسی میزان نسی میزان ژن‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو القا شده توسط مقداری متفاوت آمینوتريازول، حاکی از افزایش میزان نسی میزان ژن‌های *DEFL* و *APX* 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  
آمینوتريازول  
تنش اکسیداتیو  
*ron1-1*  
جهش نقطه‌ای

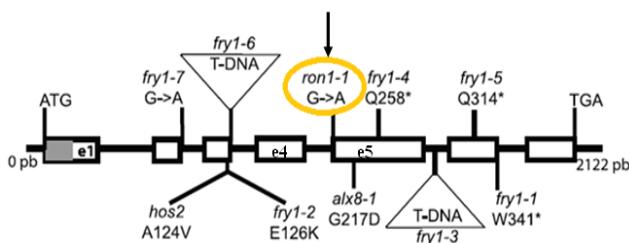
## مقدمه

و موجب تجمع ROS در گیاهان می‌شود. آمینوتربازول با مهار فعالیت آنزیم کاتالاز<sup>۴</sup> سبب تجمع  $H_2O_2$  در سلول‌های برگ شده و سرانجام مرگ سلولی (PCD)<sup>۵</sup> 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 سبب حذف ROS در اندامک‌های مختلفی از قبیل 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، پراکسیداز<sup>۶</sup>، آسکوربات‌پراکسیداز<sup>۷</sup>، سوپراکسید دیسموتاز<sup>۸</sup> و گلوتاتیون‌ریداکتاز<sup>۹</sup> باعث حذف و غیر فعال شدن ROS می‌شوند ( $H_2O_2$ ; McDonald 1999; Bailly 2004) آنزیم SOD با تولید  $H_2O_2$  آئیون  $O_2^-$  را حذف می‌کند.  $H_2O_2$  تولید شده سپس توسط آنزیم‌های CAT و POD سوزدایی می‌شود. آنزیم APX نیز در سیکل آسکوربات-گلوتاتیون، با مصرف آسکوربات به عنوان دهنده الکترون، مقدار  $H_2O_2$  را می‌کاهد (Ahmad et al. 2009). کلروپلاست و میتوکندری که دو محل عملده 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 مهلهر<sup>۱۰</sup> (Weng et al. 2008)، چرخه گرانتوفیل (Edreva 2005)، چرخه گلوتاتیون-آسکوربات (Adams 2003)، تغییر تیلاکوئیدهای گرانایی به استرومایی (Esfandiari et al. 2008) و مسیر آلترناتیو اکسیداز (Edreva 2005) از جمله

آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) به عنوان گیاه مدل، همواره در تحقیقات بیولوژی مولکولی به منظور بررسی عملکرد رژن‌های مختلف در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است. طول دوره زندگی کوتاه، تولید بذر فراوان، خودگشتن 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)<sup>۱</sup> از قبیل پروکسیدهیدروژن ( $H_2O_2$ ), سوپراکسید ( $O_2^-$ ), رادیکال هیدروکسیل (OH) و اکسیژن منفرد می‌شود (Raikhel 1992) که در غلظت‌های بالا برای سلول زیان‌آور بوده و به عنوان تنش اکسیداتیو مطرح می‌باشد. لذا تنش اکسیداتیو به عنوان عامل برهم زننده تعادل میزان تولید ROS که موجب فعال شدن دفاع آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های زنده می‌شود، تعریف می‌شود (Pallavi et al. 2012). ROS در سلول‌ها تحت شرایط تنش و غیر تنش در کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی‌زوم‌ها، شبکه اندوبلاسمی صاف و دیواره‌های سلولی تولید می‌شود. همچنین ROS به وسیله نشت اجتناب‌ناپذیر الکترون‌ها از  $O_2$  در فعالیت‌های انتقال الکترون به کلروپلاست، میتوکندری‌ها و غشاء 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 بیومولکول‌هایی از قبیل لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شود. این واکنش‌ها می‌توانند سبب تغییر در خاصیت سیالیت غشا و انتقال یون شده و از طریق کاهش فعالیت آنزیمی، ممانعت از سترز 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<sup>۲</sup> و متیل واکلوزن<sup>۳</sup>) نیز موجب به هم خوردن تعادل متابولیکی سلول شده

<sup>4</sup> Catalase (CAT)<sup>5</sup> Programed cell death<sup>6</sup> Peroxidase (POD)<sup>7</sup> Ascorbate peroxidase (APX)<sup>8</sup> Superoxide desmotase (SOD)<sup>9</sup> Glutathion reductase (GR)<sup>10</sup> Mehler Reaction<sup>1</sup> Reactive oxygen species<sup>2</sup> 3-amino 1-2,4 teriazole<sup>3</sup> Methyl Viologen

(2002)، جهش *hal2* باعث کاهش مقاومت سویه‌های مخمر گشته 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 واکنش‌گر به کاهش فسفر (Judith et al. 2011) می‌شود اشاره کرد (شکل ۱).



شکل ۱- مکان و موقعیت جهش‌های بوجود آمده در ژن *RONI* (Hirsch et al. 2011). موقعیت موتابیون *ron1-1* (جاگرینی *G* نوکلئوتید با *A*) در مزین ایترنون <sup>۴</sup> و اگزون <sup>۵</sup> در شکل مشاهده می‌شود.

هدف از این تحقیق مطالعه تاثیر غلاظت‌های مختلف آمینوتراپیازول به عنوان مهار کننده آنزیم CAT و القا کننده تنفس اکسیداتیو در شرایط *in vitro* بر خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان موتانت آراییدوپسیس *ronl-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 *ronl-1* و مادری آراییدوپسیس (*Ler-0*) در شرایط تنفس اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتراپیازول مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ابتدا بدور گیاهان موتانت *ronl-1* و گیاهان مادری (*Ler-0*) با آب ژاول  $0/25$  درصد به مدت  $10$  دقیقه ضدغوفنی شده و  $3$  مرحله آبشوبی انجام شد. پس از آن به منظور جوانه زنی یکنواخت، بذور به مدت دو روز در دمای  $4$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس کشت بذور در سطح محیط کشت MS انجام گرفت و گیاهچه‌ها در مرحله  $4$  برگی ( $12$  روز پس از

مهمنترین مکانیسم‌های دفاعی هستند. چرخه‌های مذکور از همکاری یک سری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (نظیر APX و SOD و GR) و آنتی‌اکسیدان‌ها (مثل آسکوربات، گلوتاتیون، توکوفرول، کاروتونوئیدها 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 تنفس‌های محیطی از قبیل تنفس شوری، خشکی، سرما و تنفس 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 <sup>۱</sup>-فسفات نوکلئوتیداز و <sup>۲</sup>-فسفات <sup>۳</sup>-IP<sub>3</sub> در تنظیم میزان بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنفس و در نتیجه واکنش گیاه به تنفس‌های محیطی موثر است (Xiong et al. 2001) و از طریق هیدرولیز <sup>۱</sup>-IP<sub>3</sub> در میزان بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنفس و در نتیجه تغییر واکنش گیاهان جهش یافته به تنفس‌های محیطی شده است. از جمله این جهش‌ها، جهش نقطه‌ای *ronl-1* می‌باشد که سبب جاگرینی 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، طویل شدن ریشه‌های مویی، شاخه گرایی جوانه‌ها و غالبیت انتهایی گیاهان موتانت نسبت به گیاهان *RONI* شده است (Robles et al. 2010). در ژن *Ler-0* جهش‌های متعددی شناسایی شده که منجر به تاثیر فتوتیپی 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 واکنش‌گر (*HPS70* و *ADH*) به تنفس اسمزی و تیمار ABA می‌شود (Xiong et al. 2001)، جهش *hos2* سبب افزایش بیش از حد بیان ژن‌های واکنش‌گر به سرما می‌شود (Kim and Armim 2009)، جهش *fry1-6* باعث کوتولگی و تاخیر در گلدهی گیاهان می‌شود (Xiong et al. 2001).

<sup>1</sup> Inositol 1,4,5-trisphosphate

<sup>2</sup> *Rotunda1-1*

<sup>3</sup> *Landsberg erecta*

سنجر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان جهت اندازه‌گیری تاثیر جهش نقطه‌ای *ron1-1* در زن *RONI* بر سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی گیاه، فعالیت آنزیم‌های APX و CAT اندازه‌گیری شد. در این بررسی سنجر میزان ارتباط بین میزان ROS و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد نظر می‌باشد. به منظور سنجر میزان فعالیت آنزیم‌ها، ابتدا استخراج عصاره Beauchamp and Fridovich (1971) از روش آنزیمی با استفاده از روش (Beauchamp and Fridovich 1971) از روش انعام گرفت. سپس جهت سنجر 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 اسپکتروفوتومتری (مدل PG Instruments ItdT80+UV/VIS) انجام شد.

بررسی میزان نسبی بیان زن‌ها

جهت مطالعه میزان بیان زن‌های *sAPX*, *APXI*, *DEFL* در غلطه‌های صفر، ۵ و ۲۰ میکرومولار آمینوترویازول، ابتدا از برگ‌های گیاهچه‌ها نمونه‌گیری شد و سپس استخراج RNA از نمونه‌ها مطابق با دستورالعمل کیت *RNase-plus™* (Cinaclon) با استخراج شده از RNA انجام شد. جهت بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و ژل آگارز یک درصد استفاده شد. سنتز RevertAid H-minus MMuLV cDNA طبق دستورالعمل کیت (Fermentas) Transcriptase 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 تکییر (USA) BIORAD CFX96 بود. برنامه PCR در این واکنش‌ها به صورت  $94^{\circ}\text{C}$  -  $30\text{-}3\text{ دقیقه}$ ،  $58^{\circ}\text{C}$  -  $20\text{ ثانیه}$  و  $72^{\circ}\text{C}$  -  $40\text{ (سیکل)}$  ثانیه اعمال شد. از زن *ACTIN2* برای نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان زن *DEFL* و از زن *UBQ5* جهت نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان زن *APXI* و *sAPX* هر کدام در سه تکرار انجام گرفت. همچنین جهت تجزیه داده‌ها و رسم گراف‌ها از نرم‌افزار genex 2004 [بر پایه معادله Schmittgen and Livak (2001)] متعلق به شرکت BIORAD (USA) استفاده شد. اما همان  $\Delta\Delta\text{CT}^{2}$  متعلق به شرکت BIORAD (USA) استفاده شد.

کشت) در محیط MS تازه حاوی غلطه‌های مختلف آمینوترویازول (صفرا، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار) واکشت<sup>۱</sup> شدند. پس از گذشت ۴ روز، ویژگی‌های مورفو‌لوژیکی از قبیل وزن تر ریشه، وزن تر شاخصاره و وزن تر کل در ۱۰ عدد گیاه بدون ریشه (۱۴ روزه) به وسیله ترازو دقیق در گیاهان موتانت *ron1-1* و گیاهان مادری (*Ler-0*) اندازه گیری شد. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل با دو عامل ژنتوتیپ در دو سطح و آمینوترویازول 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 اسپکتروفوتومتر (مدل PG Instruments ItdT80+UV/VIS) قرائت شد.

#### آزمایش DAB

برای انجام آزمایش <sup>۲</sup>DAB، ابتدا پودر DAB (Sigma) با غلطه یک گرم بر لیتر در بافر استاتس تریس (pH=5) ۵۰ mM 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 ۱:۳ استفاده شد. پس از تهیه بافر DAB، گیاهان ۱۴ روزه فاقد ریشه و تیمار شده با غلطه‌های مختلف آمینوترویازول، در محلول ذکر شده به مدت ۱۶ ساعت (Over night) در شیکر (دماهی 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 تنفس اکسیداتیو در برگ‌ها به صورت لکه‌های قهوه‌ای رنگ نمایان می‌شود (Thordal-Christensen et al. 1997).

<sup>1</sup> Subculture

<sup>2</sup> 3,3'-Diaminobenzidine

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

نام آغازگر	توالی آغازگر (۳' → ۵')	دماه اتصال (°C)
sAPX- Forward	TGCTAATGCTGGTCTTGTGAA	۵۹/۲
sAPX- Revers	CCACTACGTTCTGGCCTAGAT	۶۰/۱
APXI- Forward	GTCCATTGGAACAATGAGGT	۵۸/۲
APXI- Revers	GTGGGCACCAGATAAAGCGAC	۵۹/۷
DEFL-Forward	CTTAGTCATTCCGATGTGCC	۵۳/۷
DEFL-Revers	GCATCTTCCACCTTAGCTC	۵۵/۳
Actin2- Forward	CCACTATGTTCTCAGGTATCG	۵۷/۲
Actin2-Revers	CTTGGAGATCCACATCTGCT	۵۴/۳
UBQ5-Forward	GTGGTGCTAAGAAGAGGAAG	۵۵
UBQ5-Revers	GATCAAGCTTCAACTCCTTCT	۵۵

میکرومولار آمینوتربیازول برابر می‌باشد. لذا احتمالاً وقوع موتاسیون *ron1-1* در ژن *RONI* موجب کاهش معنی‌دار در روند رشد و نمو و کاهش وزن شاخصاره در گیاهچه‌های موتانت شده است (Robles et al. 2010). با افزایش غلظت آمینوتربیازول میزان وزن تر شاخصاره 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 آمینوتربیازول است. در حالی که واکنش گیاهچه‌های موتانت به غلظت‌های مختلف آمینوتربیازول اندرک و محدود بوده، تا جایی که تفاوت وزن شاخصاره در ۲۰ و ۴۰ میکرومولار آمینوتربیازول در گیاهچه‌های موتانت معنی‌دار نیست. همچنین عدم اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها در غلظت ۴۰ میکرومولار می‌تواند به دلیل سمتی بالای آمینوتربیازول در این غلظت باشد که سبب مرگ سلولی در گیاهان مادری و موتانت شده است (Mehtrov et al. 2012; Gadjev et al. 2008) و نمو در گیاهچه‌های ترانسنتنیک موتانت *frf1-6* آراییدوپسیس 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 آمینوتربیازول 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

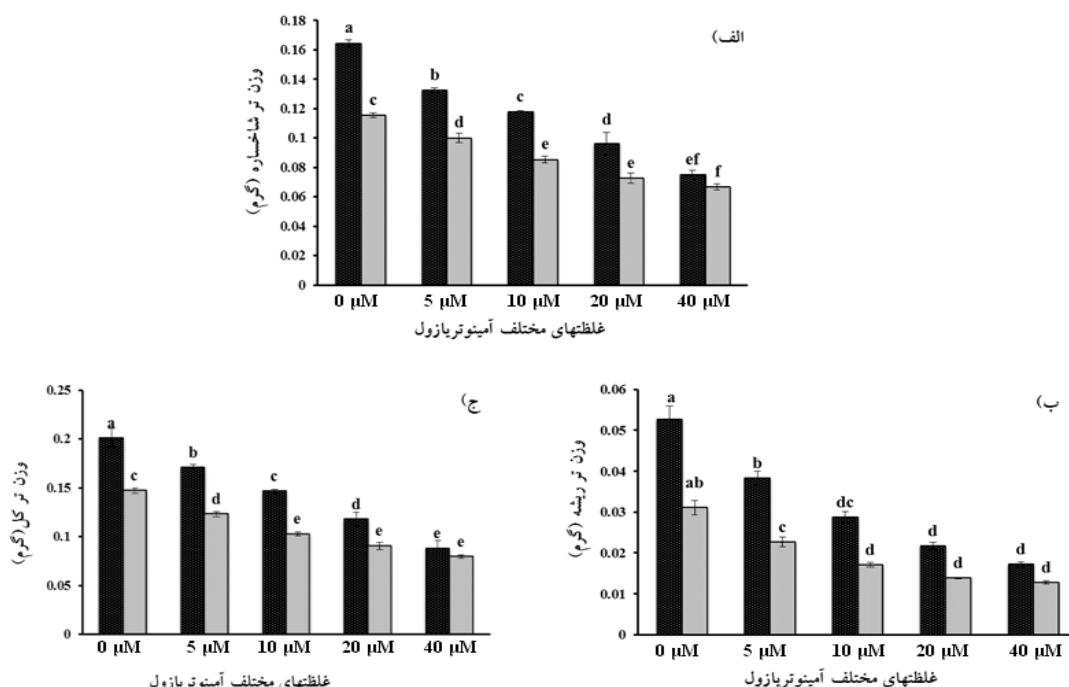
### نتایج و بحث

آمینوتربیازول به عنوان یکی از القا کننده‌های تنش اکسیداتیو باعث کاهش شدید رشد گیاه می‌شود. لذا واکنش گیاهان موتانت به غلظت‌های مختلف آمینوتربیازول اندازه‌گیری وزن تر شاخصاره، وزن تر ریشه، وزن تر کل و مقایسه با گیاهچه‌های مادری بررسی شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی وزن تر شاخصاره حاکی از اختلاف معنی‌دار اثر متقابل ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف آمینوتربیازول ( $P \geq 0.01$ ) می‌باشد (جدول ۲). همانطور که در شکل (۲-الف) مشاهده می‌شود بیشترین میزان وزن تر شاخصاره به گیاهچه‌های مادری در غلظت شاهد اختصاص داشته، و کمترین میزان وزن تر شاخصاره 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 آمینوتربیازول بین گیاهان موتانت *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (*Ler-0*) بوده، اما اختلاف معنی‌دار در غلظت ۴۰ میکرومولار آمینوتربیازول بین آنها مشاهده نشد (شکل ۲-الف). گیاهان موتانت *ron1-1* در غلظت صفر میکرومولار آمینوتربیازول (شاهد) داری 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 شاخصاره در گیاهان موتانت در غلظت شاهد از آمینوتربیازول با وزن تر شاخصاره در گیاهان مادری در غلظت ۱۰

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

آمینوتراپازول	میانگین مرباعات (MS)							درجه آزادی (df)	منابع تغییرات (SOV)
	CAT آنژیم	APX آنژیم	آنژیم کلروفیل کل	محتوی کلروفیل کل	وزن تر ریشه	وزن تر شاخصاره	وزن تر		
زنوتیپ	۰/۰۳۲**	۰/۰۱۴*	۲۴/۷۶**	۰/۰۱۲**	۰/۰۰۱۲**	۰/۰۰۶۲**	۱		
آمینوتراپازول	۰/۲۴**	۰/۰۳۱**	۳۷/۹۱**	۰/۰۰۹**	۰/۰۰۰۷**	۰/۰۰۴۴**	۴		
زنوتیپ × آمینوتراپازول	۰/۰۰۱۶ ns	۰/۰۰۶۱*	۰/۱۶ ns	۰/۰۰۰۹**	۰/۰۰۰۶*	۰/۰۰۰۴**	۴		
اشتباه آزمایشی	۰/۰۰۲۴	۰/۰۰۱۹	۰/۴۳	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۳۳	۲۰		
کل							۲۹		

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 شاخصاره (گرم); (ب) وزن تر ریشه (گرم) و (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 آلدگی ایجاد شده توسط آمینوتراپازول در مقایسه با گیاهان موتانت *ron1-1* باشد. میزان تفاوت وزن تر ریشه در گیاهان موتانت با گیاهچه‌های مادری در غلظت شاهد از آمینوتراپازول بیش از ۱۰ میلی‌گرم بود. گیاهان موتانت *ron1-1* در این غلظت

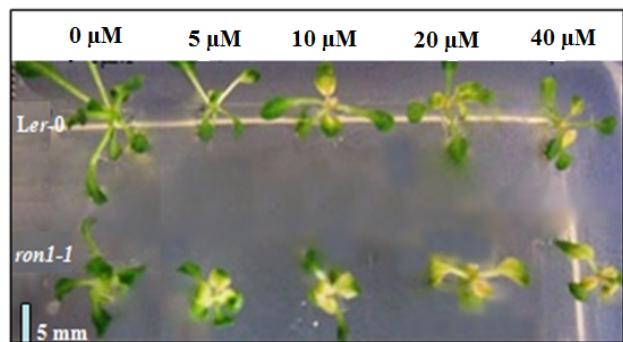
هر دو گیاهچه مادری و موتانت *ron1-1* مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین ( $P \geq 0.05$ )، نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های صفر، ۵ و ۱۰ میکرومولار آمینوتراپازول در هر دو زنوتیپ به لحاظ وزن تر ریشه است، ولی در غلظت بالای آمینوتراپازول احتمالاً به دلیل افزایش سمیت بیش از حد برای هر دو زنوتیپ، 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 آمینوتريازول غلظت شاهد) برابر وزن تر گیاهان مادری در غلظت ۱۰ میکرومولا ر آمینوتريازول می باشد که این کاهش به طور اختصاصی به وجود موتاسیون در گیاهچه های *ron1-1* مربوط می باشد. تنش القا شده توسط غلظت های مختلف آمینوتريازول حساسیت بیشتر گیاهان موتانت *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری را به دنبال داشته است. بنابراین علاوه بر کاهش رشد شاخصاره، موتاسیون *ron1-1* موجب کاهش وزن تر ریشه و وزن تر کل شد که این کاهش با افزایش غلظت آمینوتريازول روندی افزایشی دارد. استفاده از آمینوتريازول به میزان ۷ میکرومولا ر باعث کاهش وزن تر گیاهچه های یک هفتاهی موتانت حساس به تنش اکسیدتیو *loh2* در مقایسه با گیاهچه های مقاوم به تنش اکسیدتیو در موتانت *atr7* آراییدوپسیس شده است (Mehtrov et al. 2012). همچنین کاهش وزن تر در گیاهچه های یک هفتاهی موتانت *atr4*, *atr2* حساس در مقایسه با گیاهچه های موتانت *atr5* مقاوم به تنش اکسیدتیو در غلظت های ۹, ۷, ۵ (Qureshi et al. 2011) میکرومولا ر آمینوتريازول گزارش کردند (کاهش وزن تر کل در این تحقیق می باشد). از آنجا که میزان سبزینگی برگ های گیاهچه های موتانت *ron1-1* و گیاهان مادری با افزایش غلظت آمینوتريازول (۴ روز پس از واکشت) 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 معنی دار بین ژنتیک ها و غلظت های مختلف آمینوتريازول ( $P \geq 0.01$ ) و عدم وجود اختلاف معنی دار اثر مقابل ژنتیک و آمینوتريازول می باشد (جدول ۲). با توجه به شکل ۴-الف) با افزایش غلظت آمینوتريازول میزان محتوای کلروفیل کل کاهش می باید ( $P \geq 0.01$ ). همچنین در مقایسه دو ژنتیک، کاهش محتوای کلروفیل کل در گیاهان موتانت *ron1-1* به طور معنی داری ( $P \geq 0.01$ ) در مقایسه با گیاهان مادری بیشتر بوده (شکل ۴-ب) که احتمالا به دلیل مرگ سلولی بیشتر در آنها بوده است. این موضوع می تواند نشان دهنده حساسیت گیاهان موتانت به تنش اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتريازول می باشد.

از آمینوتريازول (شاهد) دارای اختلاف معنی داری ( $P \geq 0.05$ ) با گیاهان مادری (*Ler-0*) می باشد. دلیل اصلی این تفاوت وجود موتاسیون *ron1-1* در ژن *ron1-1* می باشد (Robles et al. 2010). روند کاهش توسعه ریشه در گیاهچه های ترانسژنیک موتانت *RONI*-*fry1-6* آراییدوپسیس که حاوی یک T-DNA در ژن *fry1-6* است (Chen et al. 2012). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های به دست آمده از بررسی وزن تر کل گیاه نشان دهنده اختلاف معنی داری بین ژنتیک ها، غلظت های آمینوتريازول و اثر متقابل آنها ( $P \geq 0.01$ ) می باشد (جدول ۲). همانطور که در شکل ۲-ج) مشاهده می شود بیشترین میزان وزن تر کل به گیاهچه های مادری در غلظت شاهد اختصاص داشته و کمترین میزان وزن تر کل در غلظت ۴۰ میکرومولا ر در هر دو گیاهچه شاهد و موتانت *ron1-1* مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها، نشان دهنده اختلاف معنی داری ( $P \geq 0.01$ ) بین غلظت های (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولا ر) آمینوتريازول بین گیاهان موتانت *ron1-1* و مادری (*Ler-0*) می باشد، اما این اختلاف معنی دار در غلظت ۴۰ میکرومولا ر آمینوتريازول مشاهده نشد (شکل ۲-ج). البته میزان کاهش وزن تر کل در گیاهان موتانت از غلظت شاهد به غلظت ۱۰ میکرومولا ر دچار کاهش معنی داری شده ولی اختلاف معنی داری در وزن تر کل بین سطوح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولا ر آمینوتريازول در ژنتیک موتانت مشاهده نشد که این می تواند به دلیل کاهش واکنش گیاهان موتانت به تنش آمینوتريازول ایجاد شده باشد که در غلظت های بالا سبب ایجاد مرگ سلولی زود هنگام می شود. اما در گیاهان مادری (*Ler-0*) بین غلظت های ۱۰ و ۲۰ میکرومولا ر اختلاف معنی دار ( $P \geq 0.01$ ) مشاهده شد که می تواند بیان گر واکنش قابل توجه گیاهان مادری (*Ler-0*) به تنش اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتريازول باشد. به طور کلی گیاهان موتانت *ron1-1* در غلظت صفر میکرومولا ر آمینوتريازول (شاهد) دارای اختلاف معنی داری ( $P \geq 0.01$ ) با گیاهان مادری می باشند که این تفاوت به دلیل موتاسیون *ron1-1* ایجاد شده در ژن *RONI* بوده که سبب کاهش وزن تر (شاخصاره، ریشه و کل) در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری شده است. همان گونه که در شکل ۲-الف، ب و ج) مشاهده می شود 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 آنتی اکسیدانی 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 آمینوترازوول در گیاهان موتانت *ron1-1* سبب افزایش تجزیه ROS خصوصاً  $H_2O_2$  شده است. در بسیاری از گزارش‌ها افزایش فعالیت آنزیم APX موجب کاهش میزان ROS خصوصاً  $H_2O_2$  شد. استفاده از آمینوترازوول باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم APX به میزان ۱/۵ الی دو برابر در توتوون شد (Gechev et al. 2002).

آمینوترازوول مهارکننده فعالیت آنزیم CAT می‌باشد که با تجمع  $H_2O_2$  سبب مهار فعالیت آن شده و تنش اکسیداتیو را القا می‌کند و در نهایتاً 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 آمینوترازوول ( $P \geq 0.01$ ) بوده اما برای اثر مقابل آن‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین ( $P \geq 0.01$ ) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف آمینوترازوول با گیاهان شاهد (صفر میکرومولار آمینوترازوول) بوده به نحوی که با افزایش غلظت آمینوترازوول فعالیت این آنزیم کاهش یافته است (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 آمینوترازوول، میزان تجمع ROS خصوصاً  $H_2O_2$  در گیاهان

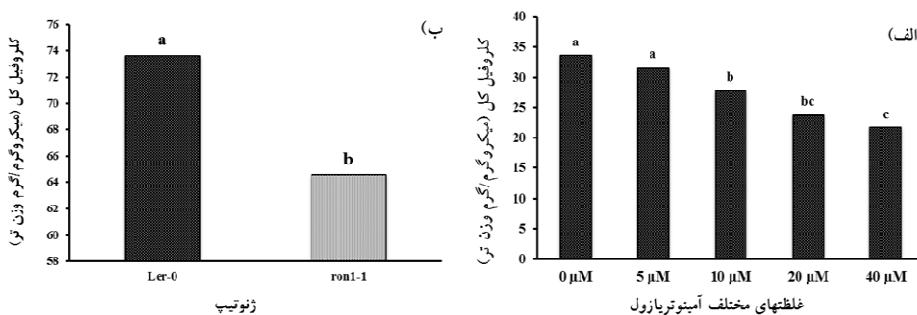


شکل ۳- تیمار گیاهان (مرحله ۴ برگی) مادری (*Ler-0*) و موتانت *ron1-1* آرایدپسیس در غلظت‌های مختلف آمینوترازوول برای مدت ۴ روز. مقیاس ۵ میلی‌متر می‌باشد.

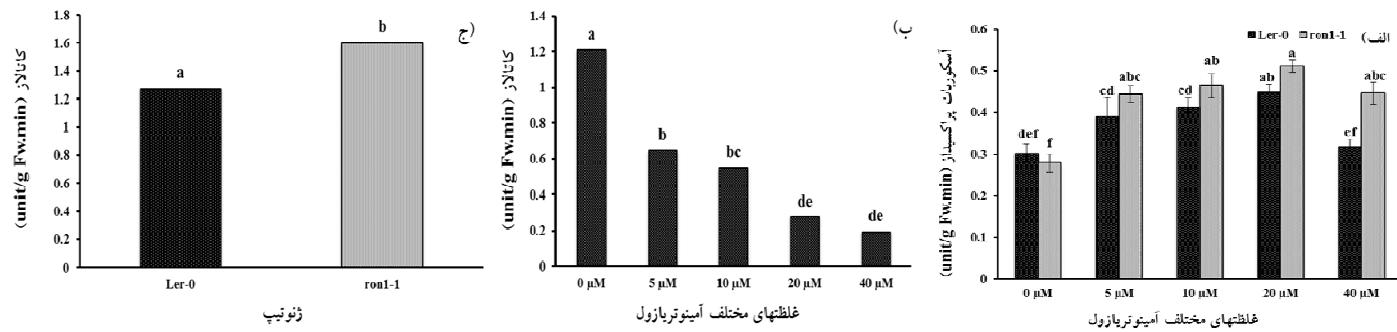
استفاده از آمینوترازوول به میزان ۷ میکرومولار باعث کاهش میزان کلروفیل کل در گیاهچه‌های یک هفتاهی *atr7* در مقایسه با گیاهچه‌های *loh2* در آرایدپسیس شده است (Mehtrov et al. 2008). کاهش میزان محتوای کلروفیل نیز در گیاهچه‌های موتانت *old3-1* که حاوی یک موتاسیون نقطه‌ای در ژن سنتز کننده سیستین در آرایدپسیس 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 نشان دهنده اختلاف معنی‌داری برای ژنوتیپ‌ها، غلظت‌های مختلف آمینوترازوول و اثر مقابله آنها می‌باشد (جدول ۲). با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها ( $P \geq 0.05$ ، اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها در غلظت‌های مختلف آمینوترازوول برای فعالیت این آنزیم مشاهده شد (شکل ۵-الف). جالب توجه این است که افزایش غلظت آمینوترازوول در ژنوتیپ‌های موتانت و مادری موجب افزایش فعالیت آنزیم APX شد که این افزایش دارای تفاوت معنی‌داری در غلظت‌های مختلف آمینوترازوول بین گیاهان موتانت *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (*Ler-0*) می‌باشد. البته وقوع موتاسیون *ron1-1* در ژن *RON1* موجب افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم APX در گیاهچه‌های موتانت در واکنش به افزایش غلظت از ۱۰ میکرومولار آمینوترازوول به بالا شده است. در حالی که در غلظت شاهد میزان فعالیت آنزیم APX در گیاهچه‌های موتانت و مادری مشابه است. با توجه به اینکه این آنزیم یکی از مهم‌ترین اجزای

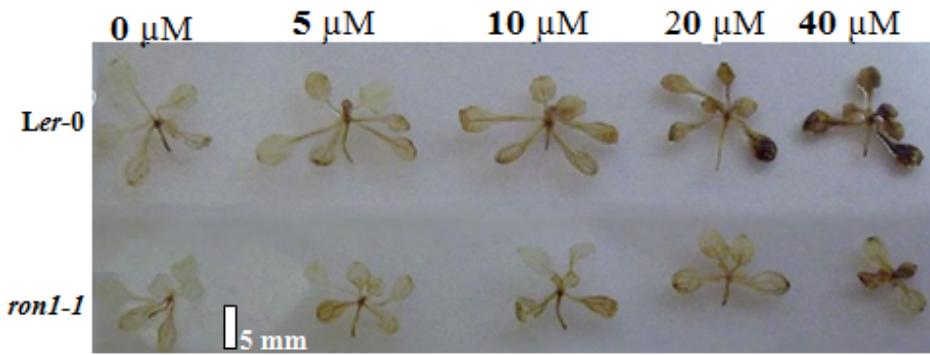
## اثر کاهش فعالیت ژن RONI/SALI بر واکنش به تنش...



شکل ۴- مقایسه میزان کلروفیل کل. (الف) در غلهای مختلف آمینوترازول و (ب) در ژنوتیپ‌های مادری (*Ler-0*) و گیاهان موتانت *ron1-1*. مقایسه میانگین توسعه 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 غلهای مختلف آمینوترازول؛ (ج) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بین ژنوتیپ *Ler-0* و موتانت *ron1-1*. مقایسه میانگین توسعه 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 موتانت (*ron1-1*) آرایدوبیسین تحت تنش اکسیداتیو القا شده با آمینوترازول با استفاده از ماده رنگ‌آمیزی DAB قسمت هوایی گیاه‌های هوایی ۱۴ روزه (۴ برجه) در این آزمایش استفاده شدند. مقیاس ۵ میلی‌متر می‌باشد.

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

ماتری (Ler-0) نسبت به موتانت *ron1-1* افزایش یافته است 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 موتانت می‌تواند به عنوان عوامل مهم افزایش تخریب  $H_2O_2$  در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری در شرایط تنش اعمال شده محسوب شود. از سوی دیگر احتمالاً میزان اولیه تجمع

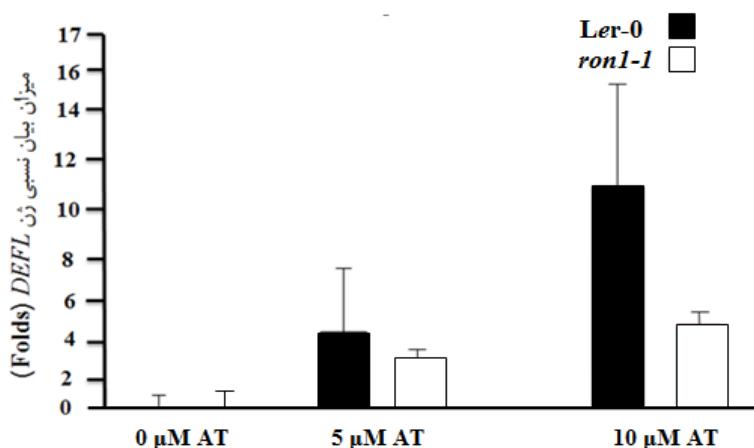
آمینوتريازول و همچنین ميزان فعالیت آنزیم CAT در برخی غلظتها در گیاهان موتانت بیشتر از گیاهان مادری (*Ler-0*) می‌باشد. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها سبب تخریب ROS خصوصاً H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> می‌شوند (Wang et al. 1999). لذا با توجه به نقش بسیار مهم آنزیم APX در تجزیه H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و همچنین به عنوان یکی از مهم‌ترین اجرای چرخه گلوتاتیون-آسکوربات (Edreva 2005)، افزایش فعالیت آن در گیاهان موتانت می‌تواند باعث کاهش تجمع ROS شود (شکل ۵-الف). کاهش مشابهی در ميزان 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 آمینوتريازول به عنوان ممانعت کننده فعالیت آنزیم CAT محسوب می‌شود، اثر ممانعت کننده‌گی آن در غلظتها مختلف در گیاهچه‌های مادری بیشتر بوده است، لذا می‌توان گفت فعالیت آنزیم CAT در گیاهچه‌های مادری به شدت کاهش یافته است و ميزان تجمع H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در گیاهان مادری بیشتر مشاهده می‌شود. با توجه به این که نتایج آزمایش سنجهش ميزان ROS در گیاهچه‌ها حاکی از کاهش ميزان آنها در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* بود، جهت بررسی مولکولی اين موضوع ميزان نسبی بيان ژنهای مارکر تنش اکسیداتیو به روش Real time PCR اندازه‌گيری شد.

ژن<sup>۱</sup> *DEFL* یکی از ژنهای مارکر تنش اکسیداتیو است که بيان آن در واکنش به افزایش ROS در گیاه افزایش می‌يابد (Shirzadian-Khorramabad et al. 2010) *DEFL* در گیاهچه‌های مادری با افزایش غلظت آمینوتريازول افزایش می‌يابد (شکل ۷) و ميزان بيان آن در گیاهچه‌های مادری در کلیه غلظتهاي آمینوتريازول بیشتر از گیاهان موتانت است. به نحوی که در غلظت ۱۰ ميكرومولار آمینوتريازول بيان آن در گیاهان مادری نسبت به گیاهان موتانت *ron1-1* حدود ۲/۵ برابر افزایش داشته است (شکل ۷). اين افزایش بيان نشان‌دهنده افزایش حضور ROS خصوصاً H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> بوده که با نتایج به دست آمده در آزمایش DAB (شکل ۶) مطابقت دارد. از آن جایی که، اين ژن یکی از ژنهای مارکر تنش اکسیداتیو بوده و بيان آن در واکنش به تجمع ROS در گیاهان افزایش می‌يابد

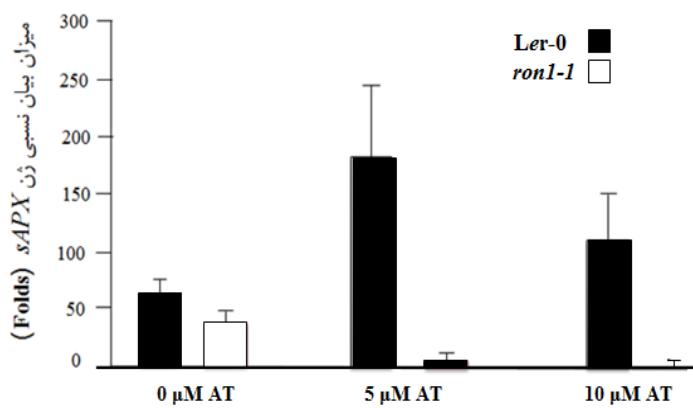
فعالیت آنزیم CAT ندارد. ولی وقوع موتاسیون *ron1-1* باعث کاهش چشمگیر تجمع مولکولهای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در گیاهچه‌های موتانت شده است (شکل ۶). استفاده از آمینوتريازول به ميزان ۱۰ ميلی‌مولار به صورت اسپری روی برگ گیاهان توتون باعث کاهش سه برابری ميزان فعالیت آنزیم CAT شده است (Gechev et al. 2002). همچنین استفاده از آمینوتريازول به ميزان دو ميلی‌مولار در آرابيدوپسیس سبب کاهش دو برابری ميزان فعالیت آن آنزیم شده است (May and Leaver 1993). آنزیم CAT یکی از آنزیم‌های مهم در سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاهان می‌باشد و سبب تجزیه H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در پراکسیزومها طی اکسیداسیون تنفس نوری و  $\beta$ -اکسیداسیون اسیدهای چرب، به آب و اکسیژن می‌شود (Del Rio et al. 2006; Corpas et al. 2009) اما با توجه به اینکه آمینوتريازول مهارکننده فعالیت آنزیم CAT می‌باشد فعالیت این آنزیم در غلظتهاي مختلف آمینوتريازول به طور چشمگیری کاهش یافته است و سبب القا تنش اکسیداتیو شده است.

در بررسی ميزان تجمع ROS با استفاده از محلول DAB، بخش-های هوایی گیاهچه‌های ۱۴ روزه‌ای که ۴ روز در محیط کشت حاوی غلظتهاي مختلف آمینوتريازول نگهداری شده بودند در محلول DAB رنگ‌آمیزی شدند. در اثر واکنش این ماده با H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> رنگ قهوه‌ای در برگ نمونه‌های تیمارشده تولید می‌شود. ميزان قهوه‌ای شدن برگ‌ها متناسب با ميزان حضور H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و احتمالاً حضور سایر ROS در برگ‌ها است، بهصورتی که هر اندازه ميزان آنها بیشتر باشد شدت رنگ قهوه‌ای بیشتر می‌شود. با توجه به نتایج اين آزمایش، ميزان حضور ROSها خصوصاً H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> با افزایش غلظت آمینوتريازول در گیاهان موتانت و مادری (*Ler-0*) افزایش می‌باشد. اما ميزان افزایش حضور آنها در گیاهان مادری به مراتب بیشتر از گیاهان موتانت می‌باشد (شکل ۶). علی‌رغم کاهش ميزان تجمع ROSها در سطوح مختلف آمینوتريازول در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری، همان‌طور که در آزمایش‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ملاحظه شد ميزان حساسیت گیاهچه‌های موتانت به تنش اکسیداتیو القا شده بیشتر بوده است. همچنین ميزان مرگ سلولی و کاهش سبزینگی در غلظتهاي مختلف آمینوتريازول در گیاهان موتانت بیشتر مشاهده شد (شکل ۳). ميزان فعالیت آنزیم APX در غلظتهاي مختلف

<sup>۱</sup> Defensin-like



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



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

های محیطی به شدت پاسخ می‌دهند. با وجود این‌که سیتوسول منبع اصلی تولید ROS نمی‌باشد (Yoshimura et al. 2000; APX1, APX2) (Ishikawa et al. 2008 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 آراییدوپسیس موجب افزایش حساسیت به انواع تنش‌های محیطی از قبیل سرما، نور زیاد، خشکی، گرما و Pnueli تیمار با عوامل القا کننده ROS (مانند متیل والیوژن) شد (et al. 2003; Koussevitzky et al. 2008) (APX1). میزان بیان ژن *APX1* با افزایش غلظت آمینوترازول (۵ میکرومولار) و القا تنش اکسیداتیو تقریبا حدود ۲۵ برابر بیان اولیه افزایش یافت. ولی این

(Shirzadian-Khorramabad et al. 2010) 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 میان 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. ایزوفرم‌های 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) 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* و<sup>۱</sup> *ELIP2* و همچنین میزان متابولیت‌های ثانویه مانند گلوتاتیون 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.

<sup>2</sup> Early light-inducible protein2

افزایش بیان در گیاهان مادری (*Ler-0*) و موتانت *ron1-1* تقریباً برابر بود و اختلافی بین ژنتیپ‌ها مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). با توجه به شکل ۸، الگوی کلی بیان ژن<sup>۱</sup> *APX* در گیاهان مادری با افزایش غلظت آمینوتراپازول به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. به طوری که بیان آن در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار آمینوتراپازول در گیاهان مادری به بیشترین میزان رسیده و میزان بیان نسبی آن در این گیاهان حدود ۱۵ برابر گیاهان موتانت می‌باشد. از آنجاکه ژن *APX* کد کننده 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 تخریب کننده  $H_2O_2$  در سلول‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است (Wang et al. 1999). بنابراین، افزایش بیان این ژن نشان‌دهنده افزایش حضور ROS خصوصاً  $H_2O_2$  بود که با نتایج حاصل از آزمایش DAB (شکل ۶) مطابقت دارد.

نقش مهمی را زمانی که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد در فتوسترات بازی می‌کند و یون سوپر اکسید تولید شده ( $O_2^-$ ) در فتوسیستم I به وسیله واکنش مهله‌ر 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 آمینوتراپازول 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 *SAL1/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 آمینوتراپازول، 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

<sup>1</sup> Stomatal 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, Toorchchi 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. *International 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. 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 Oxygen Species, Oxidative 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, Garcialeblas 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.
- Raiikhel 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, Micó 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11:187-194.

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.