مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، ۲۹۵-۲۸۷

بررسی اثر کلرید کبالت بر سطح برگ، کلروفیل، کاوتنوئید و بیان ژن ACC اکسیداز گیاه سیب زمینی *Solanum tuberosum* L. رقم وایت دزیره در کشت در شیشه

مرضیه تقی زاده .M.Sc [۱]، علی اکبر احسانپور .Ph.D [۲*]

۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۰

چکیده

هدف: اتیلن یکی از هورمون‌های گیاهی است که در شرایط کشت در شیشه تولید می‌شود و تجمع آن با کاهش رشد و تغییرات مورفولوژیکی گیاه همراه است. هدف این مطالعه بررسی اثر کلرید کبالت به‌عنوان یک مهار کننده سنتز اتیلن بر رشد و برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیان ژن Aminocyclopropane 1-carboxylic acid (ACC) اکسیداز سیب زمینی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا جوانه‌های جانبی گیاه به مدت ۵ هفته در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر $CoCl_2$ در شرایط درون شیشه کشت داده شدند و غلظت بهینه انتخاب شد. سپس سطح برگ، میزان کلروفیل و کاروتنوئید و بیان ژن ACC اکسیداز بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که کلرید کبالت در محیط کشت از ایجاد ریشه‌های هوایی و نابجا جلوگیری کرد و سبب افزایش سطح برگ، میزان کلروفیل وکاروتنوئید شد. غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید کبالت بهترین تاثیر را بر شاخص‌های رویشی نشان داد. همچنین در این غلظت بیان ژن ACC اکسیداز نسبت به گیاه شاهد کاهش یافت.

نتیجه گیری: کبالت با کاهش بیان ژن ACC اکسیداز سبب کاهش تولید و تجمع اتیلن در کشت در شیشه می‌شود و در نهایت رشد گیاه سیب زمینی به خوبی بهبود می‌یابد.

واژگان کلیدی: اتیلن ، سیب زمینی، کبالت کلرید، ACC اکسیداز (Aminocyclopropane 1-carboxylic acid)

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سیب‌زمینی *Solanum tuberosum* L. یکی از ۹۰۰ گونه جنس *Solanum* از خانواده Solanaceae و از مهم‌ترین محصولات غذایی جهان است که تولید آن به ۲۷۵ میلیون تن در سال می‌رسد و ۱۸ میلیون هکتار از اراضی جهان را به‌خود اختصاص داده است (۱). سیب‌زمینی دارای گلیکوآلکالوئیدهای فراوان و مقدار زیادی نشاسته است و به‌همین خاطر دارای ارزش غذایی، دارویی و صنعتی فراوانی است (۲). این گیاه در معرض آفات و بیماری‌های مختلفی قرار گرفته و هر ساله مقدار زیادی از محصول آن از بین می‌رود. استفاده از فناوری‌های نوینی چون کشت بافت گیاهی می‌تواند کمک شایانی در افزایش کمیت و کیفیت محصولات، تولید گیاهان سالم و عاری از ویروس بنماید (۱، ۳ و ۴). استفاده از فناوری کشت بافت گیاهی، دسترسی به گیاهانی سالم و عاری از بیماری و عوامل بیماری‌زا و نیز دست‌یابی به اصلاحات ژنتیکی را ممکن ساخته است؛ همچنین کشت بافت گیاهی راه کوتاهی است که به‌وسیله آن می‌توان ژن‌های مقاوم به عوامل بیماری‌زا و ژن‌های مقاوم به شرایط نامناسب مانند شوری و خشکی را به گیاه منتقل کرد (۵). یکی از مشکلات کشت بافت سیب زمینی تولید و تجمع اتیلن در شیشه به‌عنوان یک فرآورده طبیعی متابولیسم گیاه است که در اثر قطع گیاهان در هنگام واکشت کردن و همچنین از برگ‌ها و جوانه‌های جوان تولید می‌شود و بر رشد و نمو نمونه گیاهی اثر نا مطلوب می‌گذارد (۶).

اثرات فیزیولوژیکی اتیلن در گیاهان شامل پیچیدگی پهنک برگ‌ها، شکستن خواب دانه، جوانه‌زنی، القا ریشه‌زایی در برگ‌ها، ساقه و دمگل، تسریع رسیدگی میوه، دخالت در انتقال قطبی اکسین، افزایش نفوذپذیری غشا (۶)، ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زیستی، تکثیر و ریخت‌زایی گیاهان (۷) و کاهش قدرت باززایی گیاه از پروتوپلاست سیب‌زمینی است (۸). همچنین گزارشاتی مبنی بر تاثیر سیگنال‌ها و تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری، درجه حرارت بالا، شرایط غرقابی، حمله پاتوژن‌ها، ایجاد زخم و فلزات سنگین بر تولید اتیلن وجود دارد (۹). قسمت عمده تولید و تجمع اتیلن در کشت بافت گیاهی در شرایط درشیشه در نتیجه زخمی کردن گیاه به‌صورت جداکشت صورت می‌گیرد که سبب ایجاد ناهنجاری‌های زیستی و اثرات زیان‌باری از قبیل کاهش وزن خشک، کاهش میزان کلروفیل، کاهش سطح برگ، ایجاد ریشه‌های نابجا افزایش فاصله میان گره‌ها می‌شود (۱۰ و ۱۱). برای کاهش اثرات منفی اتیلن می‌توان از فعالیت یا بیوسنتز اتیلن جلوگیری نمود (۸). برای این کار می‌توان از بازدارنده‌های سنتز اتیلن که منجر به کاهش اثرات منفی اتیلن در شرایط درشیشه می‌گردد استفاده نمود.

مسیر بیوسنتز اتیلن از آمینواسید متیونین شروع و ابتدا به S-آدنوزیل‌متیونین (SAM) تبدیل می‌شود و سپس توسط آنزیم ACCسنتاز به ACC (۱- آمینوسیکلوپروپان- ۱- کربوکسیلیک اسید) تبدیل می‌شود. این واکنش اولین واکنش محدودکننده سرعت در این مسیر است. در مرحله بعد، اکسیداسیون ACC به‌وسیله ACC اکسیداز سبب تشکیل اتیلن، دی‌اکسید کربن و یا سیانید می‌شود (۶ و ۱۲). گروهی از مواد مسدود کننده یا کاهش دهنده سنتز اتیلن هستند. این گروه شامل موادی هستند که با مسدود کردن قسمتی از مسیر بیوسنتز اتیلن مانع از تولید آن می‌شود، مانند AVG (آمینواتوکسی‌وینیل‌گلایسین)، AOA (آمینواستیک‌اسید) که از فعالیت ACC سنتاز در همان مراحل اولیه سنتز اتیلن (تبدیل SAM به ACC) جلوگیری می‌کند (۶). $CoCl_2$ (کلرید کبالت) از مهارکننده‌های بیوسنتز اتیلن است که از تبدیل ACC به اتیلن جلوگیری می‌کند (۱۳ و ۱۴). علاوه براین، کبالت (Co) دارای وزن مخصوص ۷۵۶/۸ و به‌عنوان یک عنصر ضروری جز سازنده چندین آنزیم وکوآنزیم در انسان و حیوانات پروکاریوت‌ها است (۱۲). همچنین کبالت برای گیاهان خانواده بقولات که تثبیت کننده ازت از طریق هم‌زیستی هستند بسیار لازم است (۱۵و ۱۶). هدف از این مطالعه استفاده از کلرید کبالت در شرایط کشت در شیشه گیاه سیب زمینی، به‌منظور بررسی اثر این عنصر در کاهش بیان ژن ACC اکسیداز و در نتیجه تاثیر عدم تولید اتیلن بر برخی از شاخص‌های رشد گیاه سیب زمینی است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از گیاهان سیب زمینی رقم وایت دزیره که قبلا در شرایط کشت بافت در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان موجود بود استفاده شد. جوانه‌های این گیاهان روی محیط کشت موراشیک- اسکوگ (MS) (Murashige and Skoog) حاوی غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت کلرید، رشد داده شدند. بخش هوایی گیاهچه‌های سیب زمینی رشد یافته در محیط‌های شاهد (MS) و تیمارهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم کبالت

Archive of SID

www.SID.ir

کلرید در لیتر پس از ۵ هفته از محیط کشت جدا و میزان کلروفیل و کاروتنوئید به‌روش Arnon 1949 اندازه گیری شد (۱۷).

جهت بررسی بیان ژن ACC اکسیداز از گیاهان کشت شده در محیط کشت MS و تیمار شده با ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت کلرید در پایان هفته سوم کشت استفاده گردید و RNA آن‌ها طبق دستور العمل کیت استخراج RNX-Plus RNA (شرکت سیناژن) استخراج گردید. ارزیابی مقدار RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومترو ژل اگارز یک درصد انجام شد. سپس طبق دستورالعمل، cDNA سنتز شد. برای بررسی میزان بیان ژن ACCاکسیداز(با Accession No: *AYO989391*)، طراحی شده از ژنوم cDNA سیب زمینی توسط سایت NCBI) PCR ژن مورد نظر با پرایمرهای اختصاصی با توالی زیر انجام شد.

FW:5′-GGACATTGGGTGAACATTCC-3′

RV:3′-AGAAATGATGGCCTCACCAG-5′

در این آزمایش پرایمر ژن GAPDH (گلیسیرید آلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز) با توالی زیر به‌عنوان ژن کنترل داخلی برای تایید نتایج حاصل از RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.

FW:5′-ACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3′

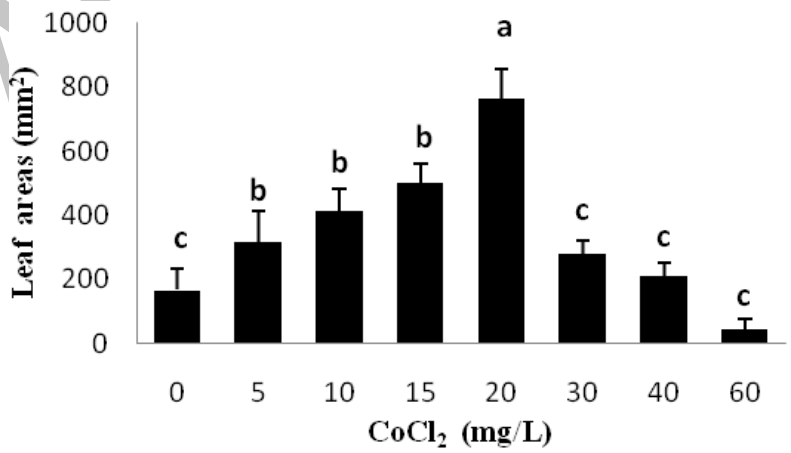
RV:3′- GCAAATGAGCCCCAGCCTTC-5

فاکتورهای اندازه گیری شده بر اساس یک طرح آماری کاملا تصادفی با ۴ تکرار برای هر آنالیز انجام گرفت، داده‌های حاصل با نرم افزار SPSS و تست دانکن در سطح معنی داری ($P\leq 0.05$) محاسبه گردید.

نتایج

کشت گیاهچه‌های سیب زمینی .*Solanum tuberosum* L رقم وایت دزیره در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های ۱۵، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر $CoCl_2$ به مدت ۵ هفته در مقایسه با محیط کشت MS (شاهد) منجر به بهبود ظاهری رشد و عدم بروز ناهنجاری‌های ناشی از تجمع اتیلن گردید.

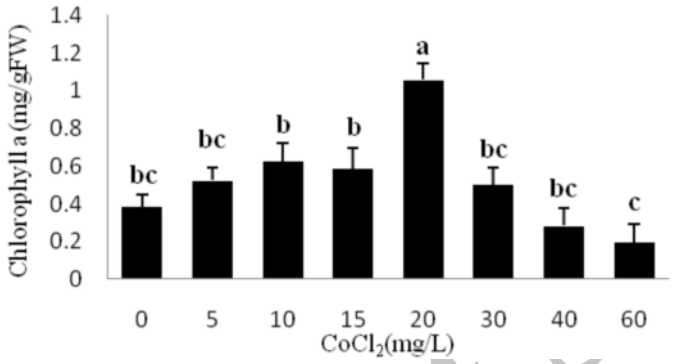
کاهش رشد و تغییر خصوصیات مورفولوژی و ظاهری همچون ضعیف شدن ساقه و کاهش قطر آن، ظهور و رشد ریشه‌های مویین نابجا بر روی اندام هوایی گیاه در نوساقه‌های رشد یافته در محیط کشت SM ساده به وضوح قابل مشاهده بود اما این علائم در غلظت‌های مختلف $lCoC_2$ مخصوصا در غلظت بیشتر یا مساوی۰۲میلی‌گرم در لیتر $lCoC_2$ رویت نگردید. نتایج حاصل از شکل ۱ نشان داد که غلظت‌های ۵ و ۰۱و ۵۱ میلی‌گرم در لیتر $lCoC_2$ نسبت به شاهد افزایش سطح برگ نشان دادند، اما بیشترین سطح برگ با اختلاف بسیار زیاد نسبت به شاهد و سایر غلظت‌های $lCoC_2$ در غلظت ۰۲ میلی‌گرم در لیتر $lCoC_2$ مشاهده شد. در غلظت‌های ۰۳ و ۰۴و ۰۶ میلی‌گرم در لیتر $lCoC_2$ میزان سطح برگ نسبت به شاهد اختلافی نشان نداد.



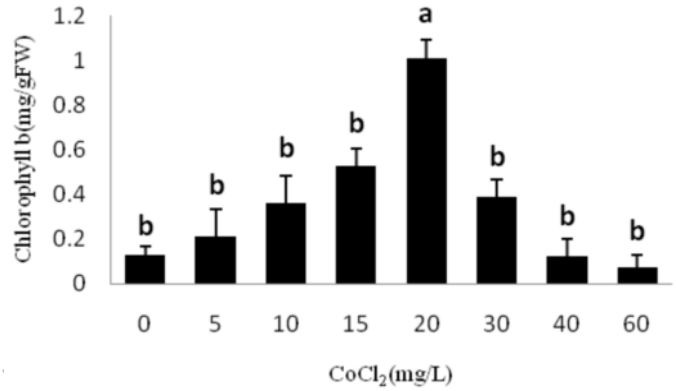
شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف $CoCl_2$ بر سطح برگ در گیاه سیب زمینی. داده‌ها میانگین چهار تکرار± انحراف معیار و حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن داده ها ($P\leq ۰/۰۵$) بر اساس آزمون دانکن است.

Archive of SID
www.SID.ir

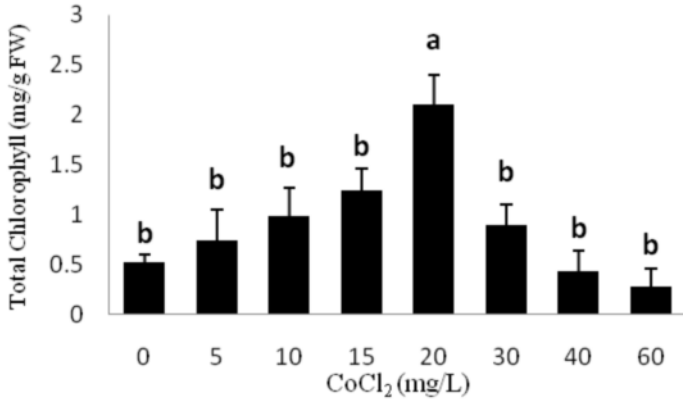
نتایج به‌دست آمده در شکل ۲ نشان دادکـه غلظـت‌هـای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ میلـی‌گـرم در لیتـر $CoCl_2$ سـبب افـزایش مقـدار کلروفیل a نسـبت بـه شـاهد شـده اسـت، امـا غلظـت ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر $CoCl_2$ میزان کلروفیـلa کمتـری نسـبت بـه شاهد نشان داد. همچنین غلظت ۰۲ میلی‌گـرم در لیتـر $CoCl_2$ بیشترین مقدار کلروفیل a را نسبت به شاهد و سـایر غلظـت‌هـا نشان داد. شکل ۳ و۴ نشان می‌دهد که غلظت ۰۲ میلی‌گـرم در لیتر $CoCl_2$ بیشترین میزان افزایش کلروفیل b و کلروفیل کل را نسبت به شاهد و سایر غلظت‌هـا نشـان داد در حـالی‌کـه سـایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نشان ندادند. شکل ۵ نشان داد که غلظت ۰۲ میلی‌گرم در لیتـر $CoCl_2$ بیشـترین میزان کاروتنوئید را نسبت به شاهد و سایر غلظت‌ها نشان داد در حالی‌که سایر غلظت‌ها اختلاف معنی داری نسبت به شاهد نشان ندادند.



شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف $CoCl_2$ بر مقدار کلروفیل a در گیاه سیب زمینی. داده ها میانگین چهار تکرار± انحراف معیار و حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن داده ها ($P\leq ۰/۰۵$) بر اساس آزمون دانکن است.

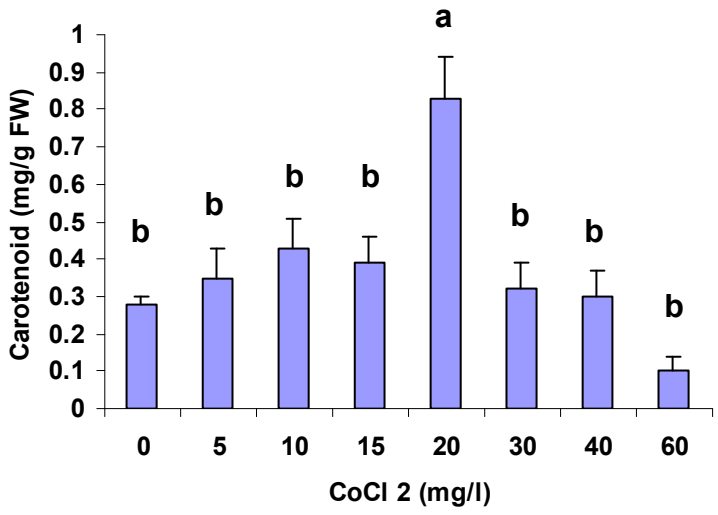


شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف $CoCl_2$ بر مقدار کلروفیل b در گیاه سیب زمینی. داده ها میانگین چهار تکرار± انحراف معیار و حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن داده ها ($P\leq ۰/۰۵$) بر اساس آزمون دانکن است.

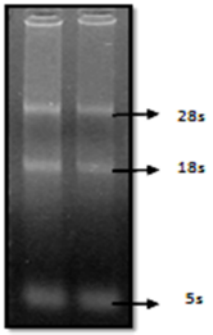


شکل ۴ : اثر غلظت‌های مختلف $CoCl_2$ بر مقدار کلروفیل کل در گیاه سیب زمینی. داده‌ها میانگین چهار تکرار± انحـراف معیـار و حـروف غیـر مشـترک بیانگر معنی دار بودن داده ها ($P\leq ۰/۰۵$) بر اساس آزمون دانکن است.

www.SID.ir

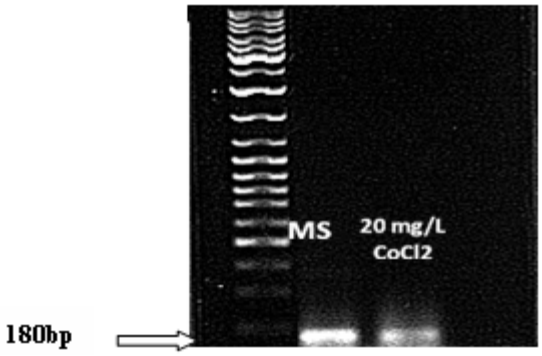


شکل ۵ : اثر غلظت‌های مختلف $CoCl_2$ بر مقدار کاروتنوئید در گیاه سیب زمینی. داده ها میانگین چهار تکرار± انحراف معیار و حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن داده ها ($P\leq ۰/۰۵$) بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۶: تعیین کیفیت RNA استخراج شده از گیاه توسط ژل آگارز یک درصد

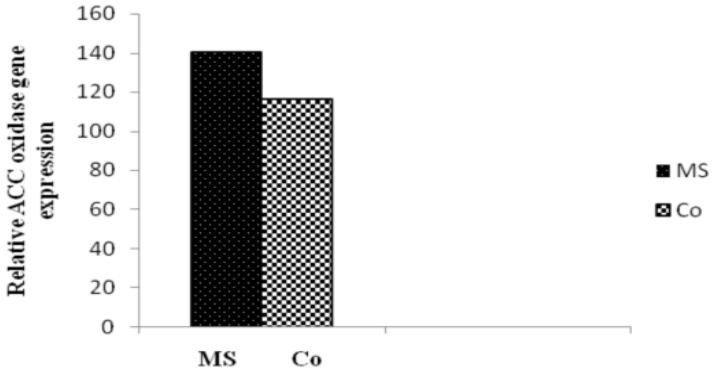
نتایج حاصل از بررسی بیان ژن ACC اکسیداز پس از انجام RT-PCR بر روی بخش هوایی گیاه سیب زمینی رشد یافته در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر $CoCl_2$ و گیاه شاهد (شکل ۷) و آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار ImageJ (شکل ۹) نشان داد که میزان بیان ژن ACC اکسیداز در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر $CoCl_2$ نسبت به شاهد کاهش یافته بود. این نتایج توسط نتایج حاصل از PCR ژن GAPDH (ژن کنترل داخلی) شکل ۸ تائید شد.



شکل ۷: اثر $CoCl_2$ بر بیان ژن ACC اکسیداز. MS: گیاه رشد یافته در محیط کشت شاهد $CoCl_2$: گیاه رشد یافته در محیط کشت حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر کلرید کبالت

www.SID.ir

شکل ۸ :کنترل داخلی، ژن GAPDH.



شکل۹ : نتایج حاصل از آنالیز شدت باندهای DNA حاصل از RT-PCR با استفاده از نرم‌افزار ImageJ در بخش هوایی گیاه سیب زمینی. MS: گیاه رشد یافته در محیط کشت شاهد $CoCl_2$: گیاه رشد یافته در محیط کشت حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر کلرید کبالت

بحث

در مطالعه حاضر مشاهده شد که گیاهچه‌های سیب زمینی رشد کرده در محیط کشت دارای غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر $CoCl_2$ از نظر ظاهری و به‌طور کیفی به‌مراتب رشد بهتری را در مقایسه با گیاهان رشد یافته در محیط MS (کنترل) و سایر غلظت‌های $CoCl_2$ نشان داده و $CoCl_2$ در این غلظت بیشتر از سایر غلظت‌ها مانع ظهور علائم مورفولوژیکی و ظاهری در روند رشد و نمو گیاه سیب زمینی رقم وایت دزیره گردید. افزایش سطح پهنک برگ و عدم ریشه زایی بخش‌های هوایی در گیاهچه‌های سیب زمینی از مهم‌ترین نمودهای ظاهری بازدارندگی اتیلن بود که در مطالعه حاضر مشاهده شد.

در غلظت‌های کمتر کبالت به‌دلیل تولید بیشتر و تجمع اتیلن در شیشه، گیاهچه‌ها رشد کمتری نسبت به بهترین غلظت کبالت (۲۰ میلی‌گرم در لیتر)، که بیشترین اثر بازدارندگی بر بیان ژن ACC اکسیداز را داشته، نشان دادند. بر اساس مطالعات پیشین، مشخص شد که اتیلن بازدارنده و کاهش دهنده تقسیم سلولی است. تجمع اتیلن در محیط کشت سبب کاهش چگالی سلولی می‌شود. هنوز مکانیزم دقیق عمل‌کرد اتیلن در کاهش میتوز مشخص نیست اما احتمالا به‌دلیل تداخل در جهت‌گیری میکروتوبول‌ها میتوز کاهش می‌یابد. اما در غلظت‌های بالاتر احتمالا به دلیل سمیت کبالت میزان رشد گیاه کاهش یافته اشت. احتمالا یون کبالت با ممانعت از بیان ژن ACC اکسیداز و کاهش تولید اتیلن در شرایط کشت در شیشه می‌تواند بر روند تقسیم سلولی اثر گذاشته و با افزایش سرعت تقسیم سلولی و افزایش تعداد سلول در واحد سطح می‌تواند رشد سیب زمینی را بهبود بخشیده و برگ‌های بزرگ‌تری را تولید نماید. بر اساس این نتایج یون کبالت بیشترین افزایش سطح را در غلظت ۲۰ میلی-گرم در لیتر نشان داد. این نتایج با نتایج بدست آمده از افزایش سطح برگ در مطالعات پیشین در کاربرد از بازدارنده‌های فعالیت و عمل‌کرد اتیلن (Silver thiosulphat)(STS) روی گیاه سیب زمینی، مطابقت دارد (۱۸). اگرچه مکانیزم عمل یون نقره با یون کبالت در افزایش سطح برگ گیاه سیب زمینی کاملا متفاوت است اما در نهایت اثر رشد و نموی مشاهده شده از نظر سطح برگ مشابه هم هستند. همچنین Jayakumar و همکارانش (۱۹) نشان دادند که غلظت مناسب کبالت سبب افزایش سطح برگ در گیاه سویا شد.

وجود فلزات سنگین و افزایش غلظت آن‌ها هم موجب بروز علائم سمیت در گیاهان می‌شوند. وجود مقادیر سمی فلزات سنگین در محیط موجب کاهش رشد گیاهان و در حالت تشدیدتر باعث از بین رفتن گیاهان می‌شود. احتمالا علائم به‌واسطه گستره‌ای از روابط متقابل در سطح سلولی ملکولی می باشد و کاهش رشد در غلظت‌های بالای کبالت احتمالا به‌دلیل آسیب‌های وارده در اثر سمیت غلظت‌های بالای کبالت و یا احیانا تجمع ROS (Reactive oxygen species)است (۲۰و۲۱). مشخص شده که ROS می‌تواند به آنزیم‌های سیکل تری کربوکسیلیک اسید

Archive of SID
www.SID.ir

(TCA) و زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری مانند ATP سنتتاز، سوکسینات دی هیدروژناز، اکونیتاز و NADH دی-هیدروژناز آسیب وارد کرده و آن‌ها را مهار یا فعالیت‌شان را کاهش دهد (۷و۲۲). به همین دلیل در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر $CoCl_2$ به دلیل سمی بودن این یون و عدم رشد گیاه سطح برگ‌ها بسیار کاهش یافت.

کلروفیل در زندگی گیاهان عالی نقش بسیار مهمی دارد. از آن‌جا که محتویات کلروفیلی گیاه، یکی از پارامترهای شاخص عملکرد هورمون اتیلن است، بررسی تأثیر یون کبالت (به عنوان کاهنده تولید اتیلن) بر میزان کلروفیل، به صورت غیر مستقیم نشان دهنده‌ی تاثیر اتیلن بر کلروفیل و فرآیند فتوسنتز است.

به‌طورکلی در این مطالعه، افزایش غلظت کبالت تا حدودی سبب افزایش کلروفیل، کارتنوئید در واحد سلول شد اما غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت بیشترین اختلاف و افزایش را نسبت به شاهد و سایر غلظت‌ها نشان داد. بیوسنتز و تخریب کلروفیل فرآیند پیچیده‌ای است که توسط فاکتورهای مختلفی تنظیم می‌شود. این افزایش در میزان کلروفیل و کارتنوئید به‌طور غیرمستقیم اثر کبالت به‌عنوان کاهش دهنده بیوسنتز اتیلن را نشان می‌دهد. کاهش کلروفیل تحت تاثیر هورمون اتیلن و اثرات منفی این هورمون بر کلروفیل در شرایط کشت در شیشه گزارش شده است و مشخص گردیده که میان اتیلن موجود در ظروف کشت بافت و سطح کلروفیل اندازه‌گیری شده رابطه معکوس وجود دارد (۱۸)، که این کاهش توسط کاربرد بازدارنده‌های بیوسنتز یا فعالیت اتیلن مهار می‌گردد. افزایش کلروفیل در غلظت‌های به کار برده شده $CoCl_2$ در این مطالعه به‌دلیل ممانعت از بیوسنتز اتیلن است. مشخص شده که بیان ژن‌های کد کننده آنزیم کلروفیلاز(Chlorophyllase) در میوه‌های پرتقال تحت تیمار با اتیلن افزایش یافت، در نتیجه با افزایش میزان کلروفیل، که می‌تواند ناشی از افزایش تقسیم سلولی سلول‌های برگ، افزایش سطح پهنک برگ و افزایش کلروفیل و کارتنوئید در واحد سلولی باشد و یا حفظ محتویات کلروفیلی (احتمالا از طریق ممانعت از تخریب کلروفیل در عدم حضور اتیلن)، می‌تواند میزان تثبیت دی‌اکسیدکربن و متعاقبا فتوسنتز را افزایش دهد و در نهایت از رشد بهتر و مطلوب‌تری برخوردار شود (۱۰). مشابه این اثر در مورد میزان کلروفیل سیب زمینی (۱۰) و یا اثر بازدارندگی STS به‌عنوان بازدارنده عمل‌کرد اتیلن روی تخریب کلروفیل (۷) اثر یون کبالت بر افزایش کلروفیل در گیاه سویا گزارش شده است.

در غلظت‌های بالای کبالت ۳۰ و۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر به علت سمی بودن و عدم رشد گیاه تفاوت معنی‌داری در میزان کلروفیل و کارتنوئید مشاهده نشد. جانشینی یون Mg^{2+} در مولکول کلروفیل با فلزات سمی مشخصی مانند مس، روی، کادمیوم یا جیوه در طی تنش‌های فلزات سنگین در گیاهان عالی نشان داده شده است که باعث تجزیه کلروفیل می‌شوند (۱۰و ۱۸). نتایج نشان داده که یون‌های فلز سنگین وابسته به غلظت بر روی انتقال الکترون در جایگاه‌های چندگانه اثر می‌گذارد و انتقال انرژی را تغییر می‌دهد. نتایج آزمایشات ما بر روی گیاه سیب زمینی در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش کلروفیل و سطح برگ گیاه شد زیرا فلزات سنگین از جمله کبالت، افزایش غلظت‌شان سبب سمیت و کاهش رشد در گیاه می‌شود. همچنین مشخص شده که افزایش غلظت کبالت در محدوده سمی سبب کاهش سطح برگ، و میزان کلروفیل شده است (۲۳و ۲۴)، که این بررسی‌ها تایید کننده نتایج حاصل از آزمایشات ما بود.

نتایج حاصل از RT-PCR در این مطالعه نشان داد که یون کبالت سبب کاهش بیان ژن ACC اکسیداز در مسیر بیوسنتز اتیلن شده که از تبدیل ACC به اتیلن ممانعت کرده و در نهایت سبب کاهش میزان اتیلن تولید شده توسط گیاه سیب زمینی رقم وایت دزیره در شرایط کشت در شیشه شد. قبلا نیز گزارش شده سالیسیک اسید SA سبب کاهش بیان ژن ACC اکسیداز شده است (۲۵) و همچنین AOA (Aminooxy acetic Acid) و 2,5– Norboradiene هم سبب کاهش بیان ژن ACC اکسیداز می‌شود (۲۶). اگرچه هیچ‌گونه شباهتی بین $CoCl_2$ با سالیسیلیک اسید، 2,5– Norboradiene و Amino acetic acid وجود ندارد اما مطالعات نشان داده که $CoCl_2$ با کاهش بیان ژن ACC اکسیداز مشابه ترکیبات ذکر شده عمل کرده و سبب کاهش میزان بیوسنتز mRNA مربوط به ژن ACC اکسیداز نسبت به گیاه شاهد شد. همچنین تیماردهی اوزون به مدت یک ساعت سبب افزایش بیان ژن ACS و ACO1 (ACC اکسیداز و ACC سنتاز) در گوجه فرنگی شد. در گزارشات دیگری AVG (Amino ethoxyvinyl glycine) سبب کاهش میزان رونوشت‌برداری (Transcript) ACS و ACO پس از ۷

Archive of SID
www.SID.ir

روز تیماردهی در گیاه تنباکو نسبت به شاهد شد (۲۷). Rancelis و همکارانش (۲۸) با استفاده از تکنیک RAPD-PCR اثر کبالت بر تغییر الگوی میتلاسیون و دمیتلاسیون DNA گیاه *Vicia faba* را نشان دادند (۲۸)، پس می‌توان پیشنهاد نمود که شاید چنین مکانیسمی در کاهش بیان ژن ACC اکسیداز نیز اتفاق افتاده است. به‌طور کلی عمل‌کرد کبالت در کاهش بیان ژن ACC اکسیداز مشخص نیست و هیچ گزارش مبنی بر تاثیر کبالت بر کاهش بیان ژن ACC اکسیداز در دست نیست. احتمالا کبالت با جلوگیری از فعالیت فاکتورهای رونویسی TF (Transcription Factors) یا کاهش سنتز TF و یا ممانعت از فعالیت RNA پلی‌مراز از رونویسی ممانعت می‌کند و یا با تغییر الگوی متیلاسیون DNA سبب کاهش میزان بیوسنتز ACC اکسیداز شده است. در نهایت این سوال که مکانیسم دقیق کاهش بیان ژن ACC اکسیداز چیست نیاز به بررسی‌های بیشتری در آینده دارد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت کبالت کلرید از طریق مکانیسم ناشناخته‌ای سبب کاهش بیان ژن ACC اکسیداز در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر شده و با کاهش تولید و بیوسنتز اتیلن ناهنجاری‌های رشد مشاهده شده در گیاهان کنترل بسیار کاهش یافت. همچنین کبالت در این غلظت سبب افزایش سطح برگ، کلروفیل و کارتنوئید شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه اصفهان به واسطه حمایت از این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Sisler EC , Serek M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Resent developments. Physiologia Plantarum. 1997; 100: 577-582.

2. Torrigiani P, Scaramagli S, Castiglione S, Altamura MM, et al. Downregulation of ethylene production and biosynthetic gene expression is associated to changes in putrescine metabolism in shoot-forming tobacco thin layers. Plant Science. 2003; 164: 1087-1094.

3. Apelbum A, Sisler EC, Feng X, Goren R. Assessment of the potency of 1-substituted cyclopropenes to counteract ethylene-induced processes in plant. Plant Growth Regulation. 2007; 55: 101-113.

4. Arigita L, Sanchez Tames R, Gonzalez A. 1-Methylcyclopropene and ethylene as regulators of *in vitro* organogenesis in kiwi explans. Plant Growth Regulation. 2003; 40(1): 59-64.

5. Ehsanpour AK, Hasanzadeh M. [The effect of Silver Thiosulphate (STS) on growth parameters of potato in in vitro culture]. Journal of Sciences. 2000; 13: 37-43. Persian

6. Torabi F, Majad A, Ehsanpour AA. Plant regeneration from cell suspension culture of potato (*Solanum tuberosum* L.). Pakistan journal of biological sciences: PJBS. 2008; 11(5): 778.

7. Ververidis P, John P. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. Phytochemistry. 1991; 30: 725-727.

8. Shin D, Moon SJ, Han S, Kim BG, et al. Expression of StMYB1R-1, a novel potato single MYB-like domain transcription factor, increases drought tolerance. Plant Physiology. 2011; 155: 421-432.

9. Henstrand JM, Handa AK. Effect of ethylene action inhibitors upon wound-induced gene expression in tomato pericarp. Plant Physiology. 1989; 91(1): 157-162.

10. Ehsanpour AA, Jones MGK. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Delaware using silver thiosulfate(STS). Journal of Sciences Islamic Republic of Iran. 2001; 12(2): 103-110.

11. Kadner R, Druege U. Role of ethylene action in ethylene production and poststorage leaf senescence and survival of pelargonium cuttings. Plant Growth Regulation. 2004; 43(3): 187-196.

12. Luo H, Efimov K, Jiang H, Feldhoff A, et al. CO_2 Stable and Cobalt Free Dual Phase Membrane for Oxygen Separation. Angewandte Chemie International Edition. 2011; 50: 759-763.

13. Grover S, Purves KW. Cobalt and plant development. Plant Physiology. 1976; 57(6): 886-889.

14. Yu YB, Yang FS. Auxin-induced ethylene prodaction and inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. Plant Physiology. 1979; 64(4): 1074-1077.

15. Li B, Xin W, Sun S, Shen Q, et al. Physiological and molecular responses of nitrogen-starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources. Plant and Soil. 2006; 287: 145-159.

16. Liu JH, Lee-Toman SH, Raid DM. Differential and woundinducible expression of 1-

Archive of SID
www.SID.ir

aminocyclopropene-1-carboxylate oxidase genes in sunflower seedlings. Plant Molecular Biology. 1997; 34: 923-933.

17. Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. 1949; 24(1): 1-9.

18. Rostami F, Ehsanpour A. Application of Silver Thiosulphate (STS) on silver Accumulation and protein pattern of potato under *in vitro* culture. Malaysia Application of Biology. 2009; 38(2): 49-54.

19. Jayakumar K, Jaleel CA. Uptake and accumulation of cobalt in plants: a study based on exogenous cobalt in soybean. Botany Research International. 2009; 2(4): 310-314.

20. Dietz KJ, Krämer U, Baier M. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity. The Plant Jornal. 1999; 12: 341-349.

21. Hall J. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany. 2002; 53(366): 1-11.

22. Sweetlove L, Heazlewood J, Herald V, Holtzapffel R, et al. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. The Plant Journal. 2002; 32(6): 891-904.

23. Brooks SC, Herman JS, Hornberger G, Mills AL. Biodegradation of cobalt–citrate complexes: Implications for cobalt mobility in groundwater. Journal of contaminant hydrology. 1998; 32: 99-115.

24. Luo D, Zheng H, Chen Y, Wang G, et al. Transfer characteristics of cobalt from soil to crops in the suburban areas of Fujian Province, southeast China. Journal of environmental management. 2010; 91: 2248-2253.

25. Huang YF, Chen C, Kao C. Salicylic acid inhibits the biosynthesis of ethylene in detached rice leaves. Plant Growth Regulation. 1993; 12: 79-82.

26. Kim WT, Yang SF. Structure and expression of cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs isolated from excised mung bean hypocotyls. Acta Physiologiae Plantarum. 1994; 194: 223-229.

27. Mathooko MF, Tsunashima Y, Kubo Y, Inaba A. Expression of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC) oxidase gene in peach(*Prunus persica* L.) fruit in response to treatment with carbon dioxide and 1-methylcyclopropene: possible role of ethylene. African Jurnal of Biotechnology. 2004; 3: 497-502.

28. Rancelis V, Cesniene T, Kleizaite V, Zvingila D, et al. Influence of cobalt uptake by *Vicia faba* seeds on chlorophyll morphosis induction, SOD polymorphism, and DNA methylation. Environmental Toxicology. 2010; 27(1): 32-41.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2013; 4(3): 287-295

Original Article

Study of Effect of $CoCl_2$ on Growth Parameters and Expression of ACC Oxidase Gene in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar White Desiree, Under *In Vitro* Culture

Marzieh Taghizadeh M. M.Sc. [1], Aliakbar Ehsanpour AA. Ph.D.[2*]

1. M.Sc. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
* Email corresponding author: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

Received: 7 Jan. 2012 Accepted: 30 Apr. 2013

Abstract

Aim: Ethylene, a phytohormone, is produced during *in vitro* plant tissue culture and its accumulation is associated with reduction of growth and morphological changes. The aim of this study was to evaluate application of $CoCl_2$, as ethylene synthesis inhibitor, on growth and some physiological parameters as well as expression of ACC oxidase gene of potato.

Material and Methods: In this study, nodal segments of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. White Desiree were cultured on MS medium containing concentration of 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 mg/L $CoCl_2$. After 5 weeks, chlorophyll a,b, total, cartenoied, content, leaf area and expression level of ACC oxidase gene were investigated.

Results: $CoCl_2$ inhibited root production in aerial parts and increased leaf areas and amount of chlorophyll a,b and carotenoid. Application of 20 mg/L $CoCl_2$ was the best for potato growth. ACC oxidase gene expression was decreased at this concentration.

Conclusion: Application of $CoCl_2$ decreased ACC oxidase gene expression and prevented ethylene accumulation in the *in vitro* culture and consequently improved growth of potato plant.

Keywords: ACC oxidase (Aminocyclopropane 1-carboxylic acid), $CoCl_2$, Ethylene, *In vitro* culture, Potato

Archive of SID

www.SID.ir