مقایسه واکنش بیان ژن‌های القایی در پاسخ به تیمارهای تنش‌زا در اسفناج و کلزا

Comparison of Induced Gene Response to Stressful Treatment in *Spinacia oleracea* and *Brassica napus*

سعید نواب پور[1*]، محمد باقر باقریه[2] و رحیم حداد[3]

چکیده

به‌منظور مطالعه الگوی بیان برخی از ژن‌های فتوسنتزی و دفاعی بذور گیاهان اسفناج (واریته وینا) و کلزا (واریته فالکون) در شرایط کنترل شده اتاقک رشد کشت داده شدند. طیف گسترده‌ای از تیمارهای آزمایشی تنش‌زا با غلظت‌های متفاوت در یک آزمایش مقدماتی ارزیابی شده و در نهایت سه تیمار متیل وایلوژن، نیترات نقره و تری آمینوترایزول با چهار غلظت متفاوت به‌همراه شاهد و تیمار ترکیبی (اسید اسکوربیک+تیمارهای تنش‌زا) در آزمایش‌های بعدی وارد شدند. اعمال تیمارهای آزمایشی به‌صورت اسپری بر روی برگ در مرحله حداکثر رشد رویشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار صورت پذیرفت. سنجش TBARM به‌منظور ارزیابی میزان سطح اکسیداسیون سلولی انجام شد. نمونه برداری در زمان‌های 6، 12، 24، 48 و 72 ساعت پس از اعمال کلیه‌ی تیمارها انجام شد. نمونه‌برداری برای انجام مطالعه‌ی بیان ژن و هیبریداسیون نورترن بلات در زمان 48 ساعت پس از اعمال تیمارها صورت پذیرفت. با توجه به حجم زیاد نتایج، کلیه‌ی نتایج اعم از بررسی درصد سلول‌های مرده، TBARM و بیان ژن‌ها در سطوح مختلف تیمارهای آزمایشی فقط در 48 ساعت پس از اعمال تیمارها تجزیه و تحلیل گردیدند. نتایج نشان داد کلیه‌ی تیمارهای آزمایشی از طریق افزایش نسبی سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مقدار درصد سلول‌های مرده، میزان TBARM و روند بیان ژن‌ها تأثیر می‌گذارند. ژن فتوسنتزی *RBCS* با افزایش غلظت تیمارهای تنش کاهش فعالیت داشت. اسپری پیش تیمار اسیداسکوربیک منجر به افزایش بیان نسبی این ژن تا حد 50 درصد گردید. ضمناً این مسئله به بهبود نسبی وضعیت ظاهری گیاهان و کاهش میزان TBARM کمک کرد. در مورد سایر ژن‌های مورد مطالعه اگرچه تفاوت‌هایی در الگوی بیان بسته به نوع گیاه و تیمارهای آزمایشی دیده شد، اما عموماً نسبت به تیمارهای تنش‌زا واکنش مثبت نشان داده و با افزایش غلظت تیمارها حداقل تا سطح ما قبل آخرتیمار افزایش خطی بیان ژن مشاهده گردید. در مورد این ژن‌ها بدون استثناء اعمال پیش تیمار اسیداسکوربیک موجب تعدیل بیان ژن به سمت شاهد (عدم اعمال تیمار) گردید.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، اسفناج، کلزا، اسید اسکوربیک، آنتی اکسیدان

1. استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
2. استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه گلستان، گرگان
3. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین
*: نویسنده مسوول

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کلزا (*Brassica napus*) به‌عنوان یکی از گیاهان روغنی مهم در مناطق معتدله دارای طیف وسیعی از سازگاری اقلیمی است. روغن کلزا در مقام مقایسه با روغن حاصله از دانه های روغنی ممتاز آفتابگردان، ذرت و سویا به‌دلیل حضور اسیدهای چرب اشباع نشده و فاقد کلسترول از کیفیت تغذیه ای بالایی برخوردار است (شریعتی و قاضی، 1379). سبزیجات برگی امروزه در دنیا به‌صورت گسترده ای کشت می‌شوند و به سبب ارزش غذایی فراوانی که دارند، جزو محصولات پر اهمیت به شمار می‌آیند. سبزیجاتی مانند اسفناج (*Spinasch oleracea*) به لحاظ دارا بودن انواع ویتامین‌ها، مواد معدنی، مواد پروتئینی و مواد سلولزی نقش بسیار مهمی در تغذیه و سلامتی انسان ایفا می‌کنند. این دسته از سبزیجات به‌طور عمده قسمت قابل توجهی از سبد روزانه‌ی خواربار خانواده را تشکیل می‌دهند (پیوست، 1381).

نقش مولکول اکسیژن در حیات سلول بر کسی پوشیده نیست. در اغلب واکنش‌های حیاتی و فعالیت‌های متابولیک اکسیژن نقش بلامنازعی را ایفا می‌نماید. با این حال احیای ناقص مولکول اکسیژن می‌تواند منجربه تولید رادیکال های فعال اکسیژن[1] شود. این رادیکال‌ها به ویژه در غلظت‌های بالا پتانسیل اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی سلول نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها را دارا هستند (Golden *et al.*, 2002). در صورتی‌که غلظت‌های متعادل این رادیکال‌ها در القای سازگاری نسبی گیاه برای ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده حائز اهمیت هستند. از طرفی به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی در پروسه تنظیم بیان ژن‌ها ایفای نقش می‌نمایند (Larkindale *et al.*, 2007). در سلول-های گیاهی در خلال واکنش‌های شدید فتوسنتزی رادیکال-های فعال اکسیژن تولید می‌گردند. اگرچه تعداد این رادیکال‌ها زیاد است و عموما طول عمر کوتاهی دارند ولی مهم‌ترین آن‌ها شامل اکسیژن اتمی ($1/2\ O_2$)، یون سوپر اکسید ($O^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) هستند. به‌طور طبیعی توزیع و میزان این رادیکال‌ها به‌گونه‌ای است که نقش مهمی در تنظیم فعالیت‌های سلول ایفا می-نمایند (Pitzshke *et al* 2006). از آن جمله پراکسید هیدروژن و سوپراکسید در تشکیل دیواره لیگنینی سلول‌های گیاهی نقش مهمی دارند (Lewis and Yamamoto, 1990). این رادیکال‌ها در بیان ژن‌های مسیر تولید هورمون‌های اتیلن، اسید جازمونیک و اسید سالسیلیک نقش مهمی ایفا می‌کنند (Mackerness, 2000). اهمیت یون سوپراکسید در فعال نمودن ژن‌های دفاعی نظیر *PR1* و *PR5* ثابت شده است (Mackerness *et al.*, 2001). از طرفی این یون به‌عنوان یک مولکول سیگنالی ثانویه با کنترل میزان تولید پراکسید هیدروژن روند بیان برخی ژن‌های دفاعی و فتوسنتزی را تعدیل می‌نماید. در این ارتباط پراکسید هیدروژن با افزایش فعالیت مسیر متابولیکی آنزیم *MAP* کیناز الگوی زمان‌بندی باز و بسته شدن روزنه‌ها را به‌عنوان یک واکنش دفاعی نسبت به شرایط تنش تنظیم می‌نماید (Neill *et al.*, 2001). نتایج برخی مطالعات مبین تشابه نسبی فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های جانوری و گیاهی است. دوک و میئورا (Doke and Miura, 1995) با بررسی میزان آنزیم NADPH اکسیداز در سیب‌زمینی گزارش نمودند روند افزایش نسبی میزان این آنزیم همبستگی بالایی با مقادیر ROS دارد و با القای مقاومت، نقش مهمی در حفاظت غشاء سلولی (شبیه آنچه در سلول‌های جانوری است) دارد. نتایج مشابهی توسط کلوپ و همکاران (Kolupae *et al.*, 2008) در القای مقاومت به تنش گرمایی گزارش شده است. یکی از فعالیت‌های مهم رادیکال‌های اکسیژن نقش انکار ناپذیر آن‌ها در فرایند فیزیولوژیک پیری[2] است. اهمیت فرایند پیری در سلول‌های گیاهی عمدتا به روند تجزیه مولکول‌های بزرگ و انتقال مواد حاصله به اندام‌های ذخیره‌ای و دانه‌ها بر می‌گردد. در این راستا ژن‌های زیادی با طیف وسیعی از فعالیت فعال می‌شوند. در میان این ژن‌ها پروتئازها، نوکلئازها و پراکسیدازها اهمیت بیشتری دارند. قابل ذکر است که در روند پیری فعالیت ژن‌های زیادی نظیر ژن-های فتوسنتزی به شدت کاهش می‌یابد. اساساً توازن بین فرایند فتوسنتز و پیری به‌ویژه به لحاظ زمانی حائز اهمیت است. در این ارتباط نقش رادیکال‌های اکسیژن به عنوان فاکتور تنظیمی فوق العاده مهم است (Choi *et al.*, 2007; Larkindale *et al.*, 2005). این اهمیت در زمان اعمال یا بروز تنش‌های محیطی که با اختلال در پروسه انتقال الکترون در سیستم فتوسنتزی روند تولید رادیکال‌ها را تشدید می‌نماید دو چندان خواهد بود (Pitzshke *et al.*, 2006). براین اساس و با توجه به مطالب ذکر شده این پژوهش به‌منظور دستیابی به الگوی افتراقی بیان ژن-های مختلف دفاعی و القایی با تغییرات نسبی میزان رادیکال-های آزاد و هم‌چنین بررسی میزان خسارت تنش اکسیداتیو و ارتباط آن با بیان ژن‌های مورد مطالعه تنظیم شده است.

1. Reactive Oxygen Species (ROS)

2. Senescence

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش از دو گیاه اسفناج و کلزا استفاده گردید بذور گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* cv. Vienna) در شرایط اتاقک رشد با دمای2±20 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری 14 ساعت روشنایی و 10 ساعت تاریکی کشت گردید. با توجه به حساسیت این گیاه به میزان رطوبت مقدار رطوبت نسبی 5±70 درصد ثابت گردید.

بذور گیاه کلزا، واریته فالکون (*Brassica napus cv. Faclon*) در شرایط کشت گلدانی با بستر سبک (کوارتز-ماسه-پرلیت و کوکوپیت به‌ترتیب به نسبت 30، 30، 20 و 20 درصد) کشت و در مرحله چهاربرگی جهت بهاره سازی به مدت 6 هفته در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن در شرایط گلخانه تحقیقاتی با میزان روشنایی 16 ساعت و دمای 22 درجه سانتی‌گراد در روز و 16 درجه سانتی‌گراد در شب منتقل شد. در ابتدا درهر گلدان بزرگ 15 کیلوگرمی سه بوته و پس از استقرار کامل به یک بوته تنک شد.

تیمارهای تنش‌زا

در یک سری آزمایش-های مقدماتی طیف وسیعی از محلول‌ها و ترکیبات شیمیایی در غلظت‌های مختلف بر روی برگ گیاه اسفناج و کلزا اعمال گردید. جدول 1 لیست این ترکیبات را به همراه غلظت‌های به‌کار رفته نشان می‌دهد. کلیه محلول‌ها به‌صورت اسپری با کپسول هوای فشرده بر روی برگ در زمان حداکثر رشد رویشی اعمال گردید.

زمان نمونه برداری برای کلیه تیمارها شامل 6، 12، 24، 48 و72 ساعت پس از اعمال تیمارها بود. اعمال تیمار-های آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با 4 تکرار صورت پذیرفت. نمونه برداری جهت تعیین تاثیر رادیکال‌های فعال اکسیژن بر میزان خسارت اکسیداتیو و در پی آن بیان ژن‌ها صورت گرفت.

جدول 1: مواد و ترکیبات تنش‌زای مورد استفاده در آزمایش

Table 1: Name of chemical and compound materials that have been used in experiment

ماده شیمیایی Chemical agent	غلظت Concentration	نقش مفروض Putative role
متیل وایلوژن (µM) Methyl viologen	6- 12-24-48	تولید یون سوپر اکسید Producing of supper oxide ion
سولفات مس(mM) Copper sulphate	0.5-1-2-4	تولید یون فلزی سمی و القاء اکسیداسیون سلولی Producing of toxic metal ion and oxidative induction
سولفات کادمیم(mM) Cadmium phosphate	1-2-3-4	" "
فسفات آلومینیوم (µM) Alominium phosphate	5-10-20-40	" "
نیترات آهن (mM) Iron nitrate	1-2-4-8	" "
نیترات نقره (mM) Silver nitrate	0.5-1-2-4	" "
تری آمینو ترایزول (3AT) (mM) 3-Amino traizole	5-10-20-40	کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش H_2O_2 Reduction of catalase activity and H_2O_2 production

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج RNA

به این منظور مقدار5گرم نمونه منجمد برگ در ازت مایع هموژنیزه گردید مقدار 10 میلی‌لیتر فنل و 15 میلی‌لیتر بافر (100 mM Tris-HCl pH 9, 200 Mm NaCl, 5 mM Dithiotheitol, 1%(w/v), 20mM EDTA) افزوده شد. سپس سانتریفیوژ با دور 3000 در دقیقه به مدت 10دقیقه انجام شد. مایع بالای لوله به آرامی جمع‌آوری و با افزودن مقدار مساوی کلروفرم عمل سانتریفیوژ 2 تا 3 بار به همین ترتیب تکرار گردید. مقدار0/33 حجم LiCl 8 مولار افزوده ودر دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرارگرفت. استخراج RNA با انجام سانتریفیوژ لوله‌ها با سرعت 10000دور در دقیقه به‌مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. پس از شستشوی RNA استخراجی با اتانول 70 در صد در غلظت 2µg/µl در فریزر 70- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

هیبریداسیون RNA با کاوش‌گر DNA نشان‌دار فسفر رادیو اکتیو (آنالیزنورترن بلات)

در ابتدا انتقال RNA به ژل آگارز و الکتروفورز آن انجام شد. پس از حذف قسمت‌های اضافی ژل، RNA به غشای نایلونی Hybond N+ (Amersham) با افزودن 5%NaOH مولار در مدت حداقل 10ساعت منتقل گردید. به منظور انجام هیبریداسیون ابتدا کاوش‌گرهای DNA به‌وسیله ستون سفاروز خالص سازی شد. کاوش‌گرهای مزبور شامل کلون RBCS گیاه نخود کدکننده پروتئین روبیسکو (Mackerness *et al*. 1999)، ژن SOD I آرابیدوپسیس کد کننده پروتئین کنترل میزان یون سوپر اکسید (Christopher *et al*. 2009)، ژن CAT I آرابیدوپسیس کد کننده پروتیین کاتالاز (Robertson Mc-Clung, 1997)، ژن MT I لوبیا کد کننده پروتئین پاد اکسیدان (Foley *et al*. 1997) و کلون P450 کلزا به‌عنوان فاکتور رونویسی (Navabpour *et al*. 2007) بودند. کاوش‌گرهای تک رشته را در محیط بافری به غشاء حامل RNA افزوده و به‌مدت یک شب در شیکر 65 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. غشاء را با محلول 0.2×SSC/1%SDS شستشو و پس از خشک کردن در کاست فیلم x-ray در فریزر 70- درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت نگهداری کرده و سپس ظاهر گردید.

سنجش TBARM (Measurment of Thiobarbituric Acid Reactive Material)

در این سنجش که معیاری برای اندازه گیری میزان تنش اکسیداسیونی است مقدار مالون دی آلدیید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ است اندازه گیری می‌شود. در این خصوص از روش هگگ و همکاران (Hagege *et al*. 1990) با تغییراتی استفاده گردید. مقدار 0/5 گرم برگ را هموژنیزه نموده و یک میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (15% w/v) به آن اضافه شد. محلول حاضر را با افزودن 10 میلی‌لیتر استون به‌شدت مخلوط نموده و با دور 4750 در دقیقه به‌مدت 15 دقیقه سانتریفوژگردید. رسوب کوچکی که پس از سانتریفوژ حاصل شد را با 5 میلی-لیتر استون شستشو داده، ورتکس و مجدداً با همان دور به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ نموده و آخرین مرحله چهار مرتبه تکرارشد. سپس مقدار 3 میلی‌لیتر H_3PO_4 (1% w/v) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباربیورتیک (0.6% w/v) افزوده ومحلول برای مدت 30 دقیقه در دمای $100^{\circ c}$ قرار گرفت. واکنش را با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف و مقدار جذب محلول حاصل را با طول موج 532 و 590 نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Uvikon930 watford) اندازه گیری گردید.

نتایج بحث

در این مطالعه به بررسی تاثیر تیماری‌های تنش‌زا بر سطح اکسیداتیو سلول (فعالیت رادیکال‌های اکسیژن) و در پی آن مقایسه بیان ژن‌ها پرداخته شده است. بر اساس نتایج حاصله با اعمال تیمارهای آزمایشی برای هر دو گیاه تنوع زیادی در بیان ژن‌های مورد مطالعه دیده شد در واقع برخی از ژن‌ها در هر دو گیاه نسبت به بعضی ترکیبات واکنش مثبت نشان دادند در حالی‌که سایر ژن‌ها بسته به نوع گیاه و تیمار مورد استفاده روند متفاوتی از فعالیت را نشان دادند. ترکیباتی مثل نیترات آهن و فسفات آلومینیوم روند ثابت و قابل اطمینانی از بیان کلون‌های مورد مطالعه را نشان ندادند. اگر چه این مساله در مورد نمک‌های سولفات مس و سولفات کادمیوم به‌طور نسبی کمتر بود ولی با توجه ثبات نسبی نتایج مربوط به تیمارهای متیل وایلوژن، نیترات نقره و تری آمینوترایزول نمونه برداری از این تیمارها در زمان‌های 6، 12، 24، 48 و72 ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی از برگ تیمار شده (3 تکرار تصادفی) انجام شد. هم‌چنین پیش تیمار اسید آسکوربیک با غلظت 30 میلی‌مولار (منتخب بر

Archive of SID

www.SID.ir

اساس نتایج آزمایش‌های مقدماتی) به عنوان پاک کننده عمومی رادیکال‌های اکسیژن در یک آزمایش مستقل 3 ساعت قبل از اعمال تیمار محلول‌های تنش‌زا بر روی برگ اسپری گردید. در این جا نیز نمونه برداری به‌طور مشابه در زمان‌های فوق‌الذکر انجام شد. به‌طور کلی با توجه به حجم داده‌ها و ثبات بیشتر نتایج در 48 ساعت پس از اعمال تیمار های تنش‌زا یا تیمار ترکیبی (پیش تیمار اسید آسکوربیک + تیمار های تنش‌زا) صرفاً نتایج مربوط به نمونه برداری 48 ساعت پس از زمان آخرین اسپری برای درصد سلول‌های مرده، سنجش TBARM و بیان ژن‌ها تنظیم گردیده است.

فنوتیپ ظاهری و میزان سلول های مرده در گیاهان تحت تیمار

اعمال تیمارهای تنش‌زا به‌ویژه در سطوح بالا در هر دو گیاه (کلزا و اسفناج) موجب افت قابل توجه شادابی برگ‌ها گردید. این مسئله در مورد تیمار متیل وایلوژن با شدت بیشتری دیده شد در حالی‌که فنوتیپ ظاهری در مورد گیاهان تیمار شده با تری آمینوترایزول وضعیت نسبی بهتری داشتند. متوسط میزان سلول‌های مرده که با بررسی میکروسکوپی صورت گرفت انطباق بسیار زیادی با وضعیت ظاهری در هر دو گیاه نشان داد (شکل 1). به‌طوری‌که بیش-ترین میزان سلول‌های مرده در تیمار متیل و ایلوژن و کم-ترین آن در تیمار تری امینو ترایزول ملاحظه گردید. هم-چنین در اغلب موارد و برای یک تیمار مشترک میزان سلول-های مرده در گیاه اسفناج بیشتر از تعداد آن در کلزا بود (شکل 1). به‌نظر می‌رسد با توجه به شکل برگ در گیاه اسفناج امکان تاثیربیش‌تر و سریع‌تر تیمارهای تنش‌زا مهیا گردیده است.

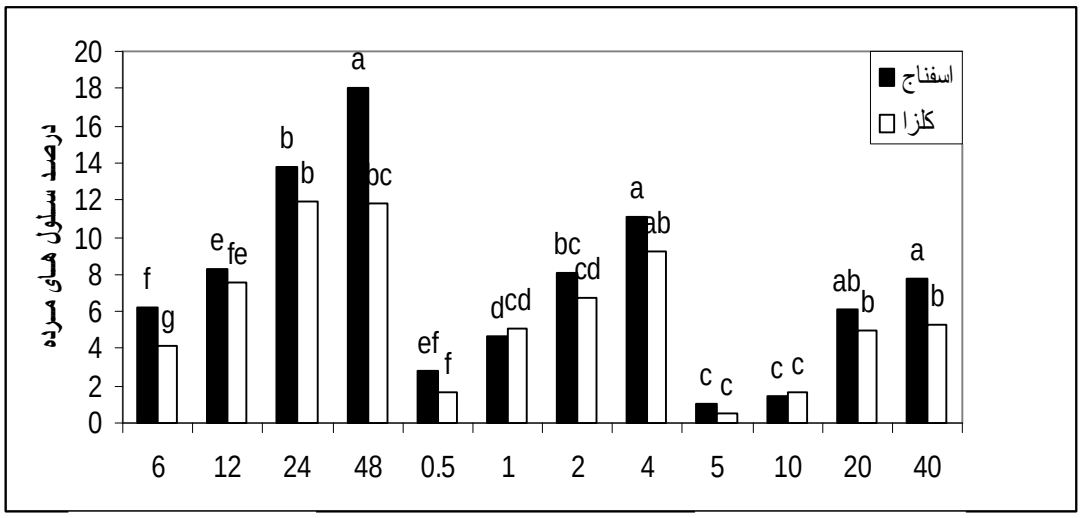
با اسپری پیش تیمار اسید اسکوربیک (30 میلی-مولار) 3 ساعت قبل از اعمال تیمارهای تنش‌زا وضعیت ظاهری گیاهان بهبود چشم‌گیری نشان داد این موضوع در کاهش معنی‌دار میزان سلول‌ها ی مرده نیز ملاحظه گردید (شکل 2). در اینجا نیز اگرچه متوسط سلول‌های مرده در سطوح تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک و متیل وایلوژن نسبت به سایر تیمارهای ترکیبی بیشتر بود ولی میزان کاهش نسبی آن در مقایسه با اعمال تیمارهای تنش‌زای مربوطه کاهش نسبی بیشتری را در میزان سلول‌های مرده نشان داد. از آن‌جا که اسید اسکوربیک به‌عنوان یک پاک کننده عمومی رادیکال‌های فعال اکسیژن نقش مهمی ایفا می‌کند (Larkindale *et al.*, 2005; Sturgeon *et al.*, *1998*) و از طرفی شواهدی در تاثیر تیمارهای تنش‌زا از طریق افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن و در پی آن تنش اکسیداتیو در دست است (Navabpour *et al.*, 2003). به‌نظر می‌رسد اعمال پیش تیمار اسید اسکوربیک با کنترل میزان رادیکال-های فعال اکسیژن و ایجاد تعادل مناسب، شرایط بهتری را در راستای ایجاد مقاومت نسبی سلول‌ها و پائین آوردن قابل توجه درصد سلول‌های مرده فراهم آورده است (شکل 2). نتایج مشابهی توسط سایر پژوهش‌گران نیز گزارش شده است (Navabpour *et al.*, 2003).

ارزیابی میزان اکسیداتیو سلولی (سنجش TBARM)

به‌منظور ارزیابی تاثیر تیمارهای آزمایشی (اعم از تیمارهای تنش‌زا و ترکیبی) در سطح سلولی با انجام سنجش TBARM، میزان مالون دی آلدئید محصول نهایی اکسیداسیون سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد در اینجا نیز بیش‌ترین و کم‌ترین میزان متوسط TBARM (شاخص میزان اکسیداسیون سلولی) به‌ترتیب مربوط به تیمارهای متیل وایلوژن و تری آمینوترایزول بود که با تغییرات درصد سلول‌های مرده در مورد این تیمارها کاملا هم‌خوانی داشت (شکل 1 و 3)، در عین حال بر خلاف روند ملاحظه شده در مورد درصد سلول‌های مرده (شکل 1)، میزان TBARM در بیشتر موارد در کلزا بیشتر از اسفناج بود (شکل 3). به‌نظر می‌رسد این عدم تطابق که عمدتاً در تیمارهای متیل وایلوژن و آمینوترایزول ملاحظه شد به‌دلیل تاثیر سریع و شدید تیمارهای مربوطه و مکانیزم عمل آن‌ها بوده است به گونه‌ای که سلول فرصت چندانی برای فعال نمودن سیستم دفاعی نداشته است و پیش از ایجاد تعادل هموستاتیک مرگ سلولی رخ داده است. این موضوع در برخی مطالعات دیگرنیز گزارش شده است (Amory *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 2007). کاربرد پیش تیمار اسید اسکوربیک نیز تاثیر معنی‌داری در کاهش میزان TBARM در کلیه تیمارهای آزمایشی به‌ویژه در مورد گیاه کلزا داشت (شکل4). به‌طور کلی انطباق نسبی قابل توجهی بین نتایج به‌دست آمده برای صفات درصد سلول‌های مرده و میزان TBARM تحت تاثیر تیمارهای مورد مطالعه حاصل گردید با این حال تنوع نسبی موجود در نتایج حاصله برای صفات مزبور در بین تیمارهای آزمایشی در گیاه امکان انجام مطالعات با جزییات بیشتر را فراهم می‌آورد.

Archive of SID

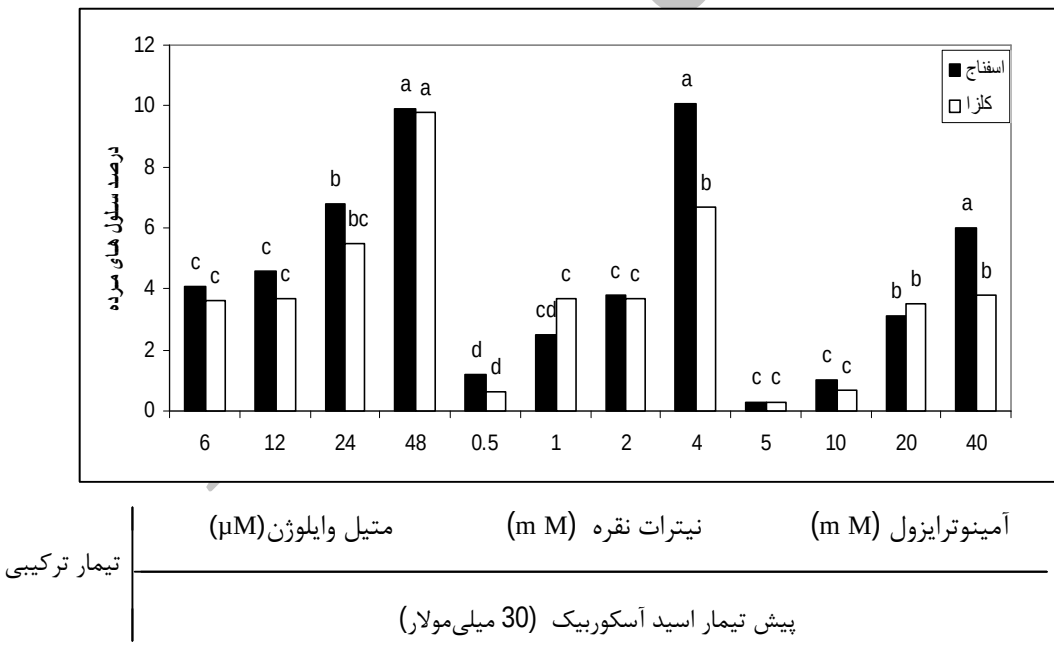
www.SID.ir



شکل 1: متوسط درصد سلول‌های مرده از 3 نمونه تصادفی برگ 48 ساعت پس از اعمال تیمار در اسفناج و کلزا

مقایسه میانگین برای تمام تیمارها به‌وسیله آزمون دانکن انجام شده است (α=%5) در مورد هر تیمار میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی‌دار ندارند.

Fig 1: Average of cell death by 3 random samples 48h after sprayed treatment on Brassica and spinach, leaves
The mean comparing has been done by Duncan method (α= 5%) in each treatment the means that have at least one common letter have no significant difference.

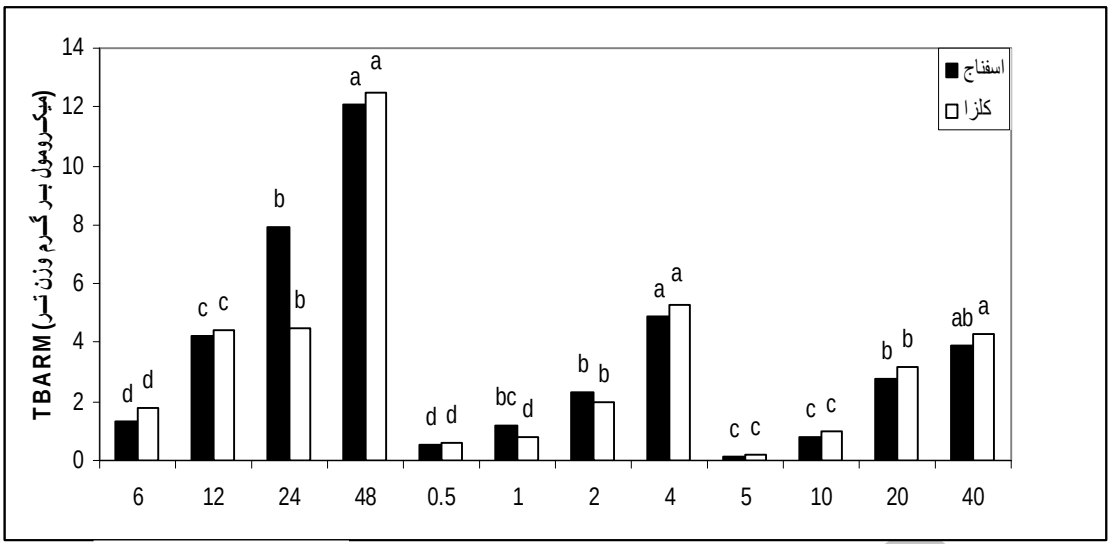


شکل 2: متوسط درصد سلول‌های مرده از 3 نمونه تصادفی برگ 48 ساعت پس از اعمال تیمار ترکیبی (ابتدا اسپری اسید آسکوربیک 30 میلی‌مولار و پس از 3 ساعت اسپری تیمارهای تنش‌زا در اسفناج و کلزا).

مقایسه میانگین برای تمام تیمارها به‌وسیله ازمون دانکن انجام شده است (α=%5) در مورد هر تیمار میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی‌دار ندارند.

Fig 2: Average of cell death by 3 random samples 48h after sprayed last treatment in combined treatment (Ascorbic acid spray followed by oxidative treatment sprayed after 3h) on Brassica and spinach, leaves.
The mean comparing has been done by Duncan method (α= 5%) in each treatment the means that have at least one common letter have no significant difference.

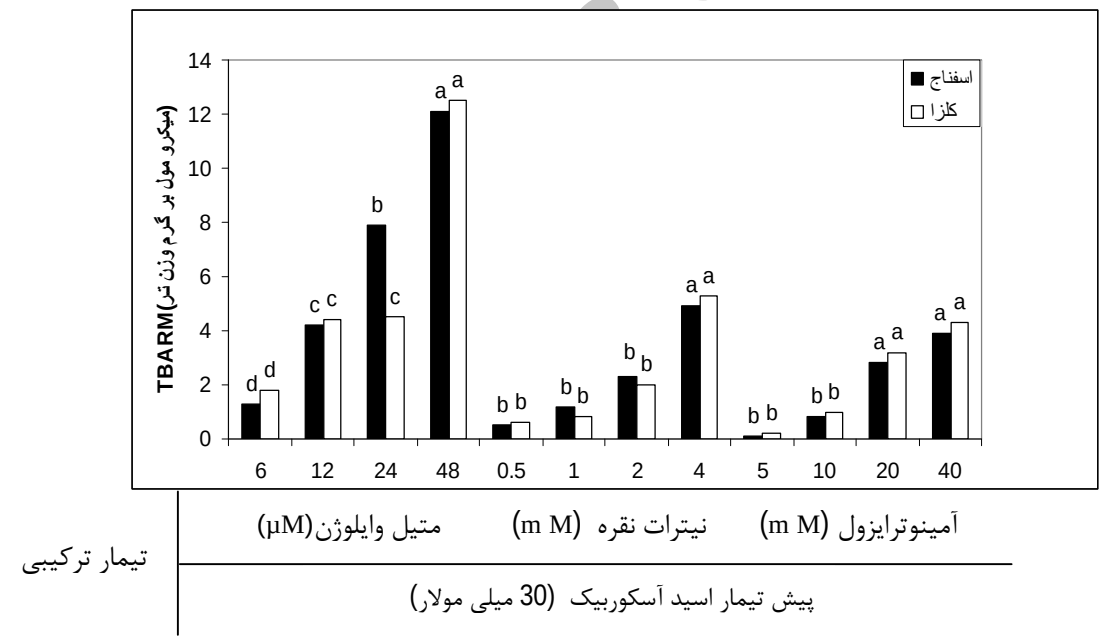
www.SID.ir



شکل 3: میزان TBARM 48 ساعت پس از اسپری تیمارهای تنش بر برگ اسفناج و کلزا

مقایسه میانگین برای تمام تیمارها به‌وسیله آزمون دانکن انجام شده است (α=%5) در مورد هر تیمار میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف اماری معنی‌دار ندارند.

Fig 3: TBARM measurement result 48h after sprayed treatment on leaves of Brassica and spinach. The mean comparing has been done by Duncan method (α= 5%) in each treatment the means that have at least one common letter have no significant difference.



شکل 4: میزان TBARM 48 ساعت پس از اعمال تیمار ترکیبی (ابتدا اسپری اسید آسکوربیک 30 میلی‌مولار و پس از سه ساعت اسپری تیمارهای تنش‌زا در اسفناج و کلزا.

مقایسه میانگین برای تمام تیمارها به‌وسیله آزمون دانکن انجام شده است (α=%5) در مورد هر تیمار میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف اماری معنی‌دار ندارند.

Fig 4: TBARM measurement result 48h after sprayed last treatment in combined treatment (Ascorbic acid spray followed by oxidative treatment sprayed after 3h) on Brassica and spinach, leaves.
The mean comparing has been done by Duncan method (α= 5%) in each treatment the means that have at least one common letter have no significant difference.

www.SID.ir

تغییرات بیان ژن‌ها

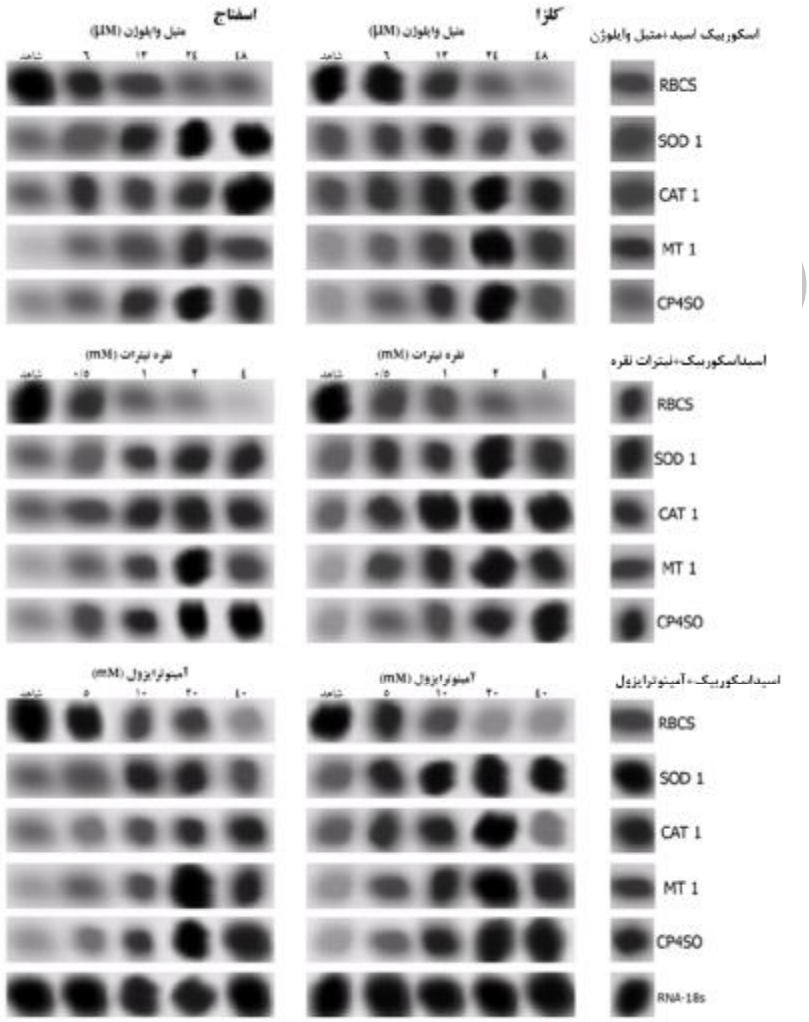
بیان ژن فتوسنتزی RBCS به‌شدت تحت تاثیر تیمارهای تنش‌زا کاهش یافت. میزان این کاهش در هر سه تیمار تنش‌زا و در مورد هر دو گیاه تشابه زیادی داشت. به‌طوری‌که در مورد کلیه تیمارها به‌جز تری آمینو ایزول میزان کاهش بیان ژن با افزایش غلظت تیمارها با شیب ملایمی کاهش یافت. در مورد تیمار تری آمینوتوایزول در گیاه اسفناج میزان بیان ژن RBCS به‌طور نسبی تا مرز غلظت 20 میلی‌مولار تقریبا ثابت و قابل توجه بود و پس از آن در تیمار40 میلی‌مولار به‌طور ناگهانی کاهش یافت (شکل 5). تری آمینو ایزول ترکیبی است که از فعالیت آنزیم کاتالاز ممانعت می‌کند. کاتالاز از دسته آنزیم‌های تعدیل کننده میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن است. این آنزیم تقریباً در تمام موجودات یوکاریوت وجود دارد و وظیفه اصلی آن تبدیل پر اکسید هیدروژن به آب و اکسیژن است (Sanchez-Casas and Klessig 1994; Maning *et al*., 2009). با اعمال تیمار تری آمینو ترایزول و کاهش فعالیت کاتالاز بروز تنش اکسیداتیو افت فنوتیپ ظاهری، افزایش درصد سلول‌های مرده و بالا رفتن سطح TBARM در بافت تیمار شده حاصل گردید. میزان بیان این ژن در شرایط تیمار ترکیبی (اسپری اسید اسکوربیک (30میلی‌مولار قبل از اعمال هریک از تیمارهای متیل وایلوژن 24 میلی‌مولار، نیترات نقره 2 میلی‌مولار ویا تری آمینوترایزول20 میلی‌مولار) به طرز قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش نسبی بیان ژن *RBCS* شد. با توجه به نقش اسیداسکوربیک به‌عنوان پاک کننده عمومی رادیکال‌های آزاد این موضوع قابل انتظار بود. نتایج مشابهی در سایر گزارش‌ها ارائه شده است (Navabpour *et al*., *2003*; Mackerness *et al*., 1999).

ژن سوپر اکسید دیسموتاز (*SOD* I) کد کننده گروه پروتئین‌های متالوآنزیم است. محصول آنزیمی این ژن توانایی پاک‌سازی یون سوپر اکسید را داراست. یون سوپر اکسید قابلیت تبدیل به پر اکسید هیدروژن را با شدت بالایی دارد (Bowler *et al*., 1992). اعمال تیمارهای تنش‌زا می‌تواند منجر به افزایش غلظت یون سوپراکسید به‌عنوان اولین حلقه زنجیره رادیکال‌های آزاد شود. از طرفی سلول‌های گیاهی در یک واکنش دفاعی با افزایش بیان ژن *SOD*1 در کاهش فراوانی یون سوپر اکسید وارد عمل می‌گردند. این موضوع در تعدیل مقادیر رادیکال‌های ثانویه و از آن جمله پر اکسید هیدروژن و مهم‌تر از آن یون هیدروکسیل موثر خواهد بود (Orozco-Cardenas *et al*., 2001). یون هیدروکسیل بسیار فعال بوده و ضمن واکنش با DNAخسارات بیشتری نسبت به سایر رادیکال‌ها وارد می‌نماید (Bowler *et al*., 1992). در این پژوهش تفاوت نسبی قابل توجهی در الگوی بیان ژن *SOD* در دو گیاه کلزا و اسفناج در مورد تیمارهای آزمایشی (متیل وایلوژن و تری آمینوترایزول) مشاهده شد. در گیاه کلزا در تیمار متیل وایلوژن بیان ژن با افزایش غلظت تیمار تغییر چندانی نشان نداد. در حالی‌که در اسفناج با افزایش غلظت متیل وایلوژن میزان بیان ژن افزایش خطی نشان داد. در مورد تیمار تری آمینوترایزول عکس‌العمل ژن *SOD* در اسفناج چندان تفاوتی نداشت ولی در کلزا میزان افزایش بیان در غلظت 5 میلی‌مولار شروع و در غلظت‌های بالاتر بعدی تقریباً ثابت باقی ماند. به‌طور کلی عکس‌العمل متفاوت گیاهان در بیان ژن‌ها نسبت به تیمارهای مشترک با توجه به ساختار ژنتیکی و حساسیت بیان ژن‌ها نسبت به تغییرات مولکولی در سطح سلول قابل انتظار است. گزارش‌های مشابهی در این خصوص ارائه شده است (Choi *et al*., 2007; Gupta *et al*., 1993).

ژن *CAT*1 کد کننده آنزیم کاتالاز واجد نقش آنتی اکسیدانی می‌باشد. این ژن با پاکسازی رادیکال پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نقش مهمی در تنظیم غلظت H_2O_2 دارد. اگرچه غلظت بالای پر اکسید هیدروژن منجربه بروز تنش اکسیداتیو و خسارت‌های سلولی می‌گردد ولی بر اساس نتایج برخی مطالعه‌ها تاثیر غلظت‌های متعادل H_2O_2 به‌عنوان یک فاکتور سیگنالی در بیان ژن‌ها گزارش شده است (Mackerness *et al*., 2001; Navabpour *et al*., 2003). از این‌رو بررسی میزان فعالیت *CAT*1 و در پی آن میزان H_2O_2 که بر فعالیت گروهی از ژن‌ها تاثیر گذار است اهمیت زیادی دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که الگوی بیان این ژن در هر دو گیاه نسبت به تیمارهای اعمال شده شباهت زیادی داشت (شکل 5). به‌طور کلی دو الگوی تقریباً متمایز برای بیان این ژن ملاحظه گردید. در گیاه اسفناج برای تیمارهای متیل وایلوژن و تری آمینوترایزول روند افزایشی بیان *CAT*1 تا آخرین غلظت تیمار اتفاق افتاد. در حالی‌که در مورد سایر تیمارها میزان بیان به‌طور خطی افزایش یافته در غلظت ما قبل آخر به حداکثر رسیده و پس ازآن درآخرین غلظت کاهش نسبی ژن ملاحظه شد (شکل 5). این مسئله که چندان دور از انتظار نیست توسط برخی پژوهش‌گران دیگر نیز گزارش شده است (Qi –Lin *et al*., 2009). به‌طور کلی میزان بیان این ژن در گیاه کلزا بیشتر بود هم‌چنین در بین کلیه تیمارهای اعمال شده متوسط بیان *CAT*1 تحت تاثیر

www.SID.ir

تیمار نیترات نقره بالاتر بود (شکل 5). نیترات نقره در برخی تحقیقات به‌عنوان جایگزینی برای مطالعه واکنش‌های دفاعی و بررسی بیان ژن‌های حساس به‌عوامل بیماری‌زا استفاده شده است (Epple *et al.*, 1995). هم‌چنین پژوهش‌های گلیج استرز (Clijsters *et al.*, 1999) مبین تاثیر نیترات نقره در تحریک تنش فلزات سنگین و در پی آن افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن بوده است. شباهت الگوی بیان ژن‌ها در تحقیق حاضر با گزارش‌های مورد اشاره و کاهش معنی‌دار میزان TBARM در تیمار ترکیبی (پیش تیمار اسیداسکوربیک + تیمار نیترات نقره) موید این مسئله می‌باشد.



شکل 5: هیبریداسیون نورترن بلات گیاهان اسفناج و کلزا در مرحله حداکثر رشد رویشی تحت تاثیر تیمارهای فوق قرار گرفته، نمونه برگ پس از 48 ساعت برداشت و با استخراج RNA و انتقال آن به غشا حساس با کلون‌های فوق هیبرید گردیدند. پس از آن با انتقال غشاء به کاست رادیوگرافی با ظهور فیلم رادیوگرافی نتایج بیان ژن‌ها به‌صورت فوق مرتب شد. تیمارهای ترکیبی شامل: 1- تیمار ترکیبی اسیداسکوربیک (30mM) سه ساعت قبل از متیل وایلوژن (24µM) اسپری شده است. 2- تیمار ترکیبی اسیداسکوربیک (30mM) سه ساعت قبل از نیترات نقره (3mM) اسپری شده است 3- تیمار ترکیبی اسیداسکوربیک (30mM) سه ساعت قبل از آمینوترایزول (20mM) اسپری شده است. به منظور حصول اطمینان از بارگیری برابر در چاهک‌ها از RNA-18s استفاده گردید.

Fig 5: Northern hybridization analysis. Samples have been taken from spinach and brassica treated leaves 48h after the last spray for RNA isolation. Ten micrograms RNA were separated on a denaturing agarose gel, blotted to nylon membrane and probed with ^{32}P labeled gene fragments. For combined treatments ascorbic acid (30mM) sprayed followed by methyl viologen (24µM), silver nitrate (3mM) and 3-amin-trizoil (20mM) after 3h. In order to chek equal amount of louding in each track 18s-RNA has been used.

www.SID.ir

ژن *MT1* کد کننده پروتئین متالوتاینین است. این پروتئین با وزن مولکولی کم و غنی از اسید آمینه سیستئین نقش مهمی در کنترل یون‌های سمی فلزی دارد (Robinson *et al*., 1993). حتی در برخی سلول‌های جانوری و قارچ‌ها کنترل بیان این ژن توسط یون‌های فلزی صورت می‌پذیرد. این ژن گروه فامیلی گسترده داشته و ایزوژن‌های زیادی در بین موجودات مختلف دارد. از این‌رو الگوی بیان آن در اندام‌های مختلف تنوع زیادی دارد (Foley *et al*.,1997; Choi *et al*., 2007). نتایج برخی مطالعات از نقش تعیین کننده این ژن در القای مقاومت نسبت به اثر اکسیدانی رادیکال‌های فعال اکسیژن دارد (Navabpour *et al., 2003*). هم‌چنین نقش این ژن در فرایند پیری حائز اهمیت است. از مهم‌ترین رخدادها طی پروسه پیری انتقال مولکول‌های بزرگ پس از تجزیه از برگ‌های مسن‌تر به اندام‌های ذخیره‌ای و دانه می‌باشد. شواهدی انکار ناپذیرِی دال بر نقش *MT1* در کمک به دوام و بقای سلول-های برگ به‌منظور انتقال مواد پروتئینی و ذخیره‌ای به دانه وجود دارد (Butt *et al,. 1998 ;* Navabpour *et al., 2003*). بررسی الگوی بیان ژن *MT1* تحت تاثیر کلیه تیمارهای تنش زا تشابه قابل توجهی نشان داد به‌طوری‌که در کلیه موارد با افزایش غلظت تیمار میزان بیان ژن به‌طور خطی افزایش یافته و در غلظت ما قبل آخر به حداکثر مقدار رسید و پس ازآن کاهش چشم‌گیری نشان داد (شکل 5).

کلون *CP450* کد کننده پروتئین سیتوکروم P450 است. این پروتئین در فرایند سوخت و ساز ترکیباتی چون استروئیدها، اسیدهای چرب و لیکوتریئنزها ایفای نقش می نماید. هم‌چنین این پروتئین واجد خواصی است که در مهار اثرات سوء ترکیبات سرطازا و موتاژن‌ها بسیار موثر است (Navabpour *et al*., 2007). الگوی بیان ژن *CP450* تحت تاثیر تیمار متیل وایلوژن شباهت زیادی به وضعیت بیان ژن *MT1* داشت. در اینجا نیز افزایش خطی میزان بیان ژن تا سطح ما قبل آخر دیده شد و در آخرین مرحله تنش کاهش بیان ژن رخ داد. در حالی‌که در سایر موارد عموما روند افزایشی بیان ژن و تقریبا ثابت آن در دو مرحله پایانی سطوح تیمارها ملاحظه شد (شکل 5).

به‌منظور کاربرد اسید اسکوربیک به‌عنوان پیش تیمار در تیمارهای ترکیبی در یک آزمایش غلظت 20 و 30 میلی-مولار بر روی برگ اسفناج و کلزا در زمان حداکثر رشد رویشی (مشابه سایر تیمارها) اعمال و نتایج نشان داد که تفاوت محسوسی در بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به شاهد (عدم اعمال تیمار) حاصل نگردید (نتایج این آزمایش ارائه نشده است). اعمال پیش تیمار اسیداسکوربیک (30میلی‌مولار) در مورد کلیه تیمارهای تنش‌زا میزان TBARM را به‌میزان قابل توجه و معنی‌داری کاهش داد (شکل 4). باتوجه به نقش اسیداسکوربیک (به‌عنوان پاک کننده عمومی همه رادیکال‌های آزاد) این امر می‌تواند دلیل روشنی بر تاثیر تیمارهای تنش‌زا در افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌عنوان فاکتورهای القایی در بیان ژن‌های مورد مطالعه تلقی گردد. هرچند کاهش نسبی بیان ژن‌های مورد بحث در آخرین سطح برخی تیمارها علی‌رغم بالا بودن میزان نسبی رادیکال‌های آزاد (بر اساس نتایج سنجش TBARM) به نظر ناقض تحلیل فوق می‌آید، ولی این مسئله در ارتباط با بسیاری از ژن‌ها، آنزیم‌ها و کوفاکتورها دیده می‌شود که سطح فعالیت آن‌ها تحت تاثیر عوامل القا کننده تا یک نقطه آستانه بالا رفته و پس ازآن دیگر ظرفیت لازم جهت روند افزایشی وجود ندارد. این مسئله در نتایج سایر پژوهش‌گران گزارش شده است (Mackerness *et al*., 2001).

سپاسگزاری

نویسندگان لازم می‌دانند از دکتر متیوتمیس (Mathew Themiss) جهت در اختیار دادن برخی کلون‌ها و حمایت مالی دانشگاه وارویک انگلستان و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تقدیر و تشکر نمایند.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 1-2 متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir