



علوم و تحقیقات بذر ایران
سال سوم / شماره دوم / ۱۳۹۵ (۸۰ - ۶۷)



بررسی واکنش موتانت‌های پیری در آرابیدوپسیس به پیش‌ماده سنتز اتیلن (ACC)

سارا رویان^۱، رضا شیرزادیان خرم آباد^{۲*}، پیام طالبی کهدوئی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۱۱

چکیده

هورمون اتیلن بر بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی از جمله پیری موثر است. پیری آخرین مرحله رشد و توسعه گیاه بوده که به مرگ گیاه ختم می‌شود. در مسیر بیوسنتز اتیلن آخرین پیش ماده 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid (ACC) است. گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی ACC با تبدیل این ماده به اتیلن دستخوش تغییرات خاصی از جمله کوتاهی و ضخیم‌شدن ریشه، کوتاهی هیپوکوتیل و چرخش رأس هیپوکوتیل می‌شوند که واکنش سه گانه (Triple response) نامیده می‌شود. وقوع این علائم نشان‌دهنده نرمال بودن فعالیت‌های درک و بیوسنتز اتیلن در گیاه است. در این تحقیق واکنش موتانت‌های *old-3*, *old-9*, *old-14*, *etr1-3* و *ko-5* به غلظت‌های مختلف ACC با اندازه‌گیری صفات مرتبط با واکنش سه گانه در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا بررسی شد. ژن‌های *OLD* به عنوان ژن‌های موثر بر فرایند پیری در آرابیدوپسیس شناخته می‌شوند. واکنش سه گانه در اغلب موتانت‌ها با افزایش غلظت ACC مشاهده می‌شود. درحالی‌که در موتانت *etr1-3* هیچکدام از علائم واکنش سه گانه مشاهده نشد. لذا تغییر فعالیت ژن‌های *OLD3*، *OLD9* و *OLD14* در گیاهچه‌های موتانت‌های *old-3*, *old-9*, *old-14* باعث تغییر معنی‌داری در درک و بیوسنتز اتیلن نشده، ولی در گیاهچه‌های موتانت *etr1-3* تغییر قابل توجهی در زمینه درک اتیلن توسط حسگرهای اتیلن رخ داده است. از آنجائی‌که فرایند پیری در موتانت‌های *old-3*, *old-9*, *old-14* سریع‌تر از گیاهان والدینی صورت گرفته، این بدان معنی است که ژن‌های کنترل‌کننده فرایند پیری از ژنهای موثر بر اتیلن متفاوت هستند.

واژه‌های کلیدی: آرابیدوپسیس، اتیلن، ریشه، موتانت، هیپوکوتیل

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

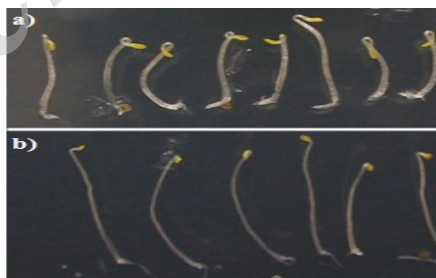
* نویسنده مسئول: R.shirzadian@gmail.com

مقدمه

شود. ACC ممکن است در جای دیگری در گیاه نیز سنتز و به سلول هدف انتقال و در آنجا تبدیل به اتیلن شود (Guzman and Ecker, 1990). تغییرات مورفولوژیک گیاهان تیمار شده با ACC را تغییرات سه‌گانه می‌نامند. علائم واکنش سه‌گانه شامل کوتاهی و ضخیم شدن ریشه، کوتاهی هیپوکوتیل و چرخش رأس هیپوکوتیل می‌باشد (شکل ۱) (Guzman and Ecker, 1990).

بررسی مجموعه‌ای از گیاهان جهش‌یافته آرابیدوپسیس تالیانا *onset of leaf death (old)* نشان داد است که تیمار اتیلن تنها در محدوده‌ای از سن گیاه مؤثر می‌باشد و با افزایش سن گیاه، پیری در گیاهان جهش‌یافته *old* در حضور اتیلن افزایش می‌یابد (Jing et al., 2002). پس از ایجاد جمعیت‌های موتانت EMS از ۲ والدین مادری *Col-0* و *Ler-0*، حدود ۶۰ گیاه موتانت *old* بر اساس واکنش به تیمار اتیلن از جمعیت‌های فوق جدا و در ۲ گروه موتانت‌های زود پیرشونده (*early leaf senescence*) و دیر پیرشونده (*Late leaf senescence*) قرار گرفتند. پاسخ متفاوت گیاهچه‌های موتانت‌های *old* به اتیلن در طی دوره تیمار اتیلن حاکی از آن است که موتانت‌های *old12*، *old9*، *old3* و *old14* به‌عنوان موتانت‌های زود پیر در ژن‌های متفاوتی دارای جهش هستند (Jing et al., 2005).

اتیلن (C_2H_4) از جمله هورمون‌های مهم گیاهی محسوب می‌شود که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی چون پیری و رسیدگی میوه در گیاهان دخالت دارد. پیری آخرین مرحله رشد و نمو گیاه بوده که منجر به مرگ گیاه می‌شود. در طی فرایند پیری ترکیبات سلولی در بافت‌های در حال پیر شدن تجزیه و ترکیبات حاصله به بافت‌های جوان منتقل می‌شود. از علائم پیری می‌توان به زرد شدن برگ‌ها اشاره کرد که به دلیل کاهش و تخریب فتوسنتز صورت می‌گیرد (Lim et al., 2007). اتیلن به‌عنوان یکی از هورمون‌های الفاکنده پیری در گیاهان بوده و اسید آمینه متیونین پیش‌ماده آن می‌باشد که (ACC) ($1-$ aminocyclopropane 1-carboxylic acid) نیز در جریان تبدیل متیونین به اتیلن به‌عنوان یک ترکیب حد واسط عمل می‌کند. در مسیر بیوسنتز اتیلن ACC آخرین پیش‌ماده محسوب می‌شود (Wang et al., 2002). سنتز این پیش‌ماده مرحله‌ای محدودکننده در فرایند متابولیک سنتز اتیلن در گیاهان می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده است که پیری در برخی از گیاهان موتانت آرابیدوپسیس که دارای نقص ژنتیکی در مسیر بیوسنتز اتیلن هستند با تأخیر رخ می‌دهد (Zakarias and Reid, 1990). متیونین تحت تأثیر آنزیم S-AdoMet Synthetase (SAM) تبدیل به S-AdoMet و این ماده تحت تأثیر آنزیم ACC synthase به ACC تبدیل می‌شود.



شکل ۱- واکنش سه‌گانه تغییرات مورفولوژیک شامل کوتاهی و ضخیم شدن ریشه، کوتاهی هیپوکوتیل و چرخش رأس هیپوکوتیل در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط غذایی حاوی ACC در آرابیدوپسیس: (Guzman and Ecker, 1990; Shirzadian-Khorramabad et al., 2010). واکنش گیاهچه‌های مادری (*Ler-0*) در محیط غذایی MS حاوی ACC (a) و فاقد ACC (b)

Figure 1. Triple response (morphological changes including short and thick roots, short hypocotyls and rotation hypocotyls top in a nutrient medium containing ACC) in *Arabidopsis*: wild type (*Ler-0*) seedlings responses to MS medium containing ACC (a) and no ethylene (b).

در شبکه اندوپلاسمی دریافت و به هسته ارسال می‌شود (Ma et al., 2006). در این مسیر EIN5 به‌عنوان یکی از اجزای سیگنالینگ اتیلن نیز فعالیت می‌کند. فعالیت اگزوریبونوکلئاز ۵' به ۳' آنزیم EIN5/XRN4 به‌عنوان یکی از اجزای مسیر سیگنالینگ اتیلن در پایین دست CTR1 فعالیت و برای تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با اتیلن ضروری است (Olmedo et al., 2006). از طرف دیگر EIN3 به‌عنوان یک فاکتور رونویسی بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با اتیلن موثر است. در غیاب اتیلن EIN3 به واسطه‌ی تولید دو پروتئین F box شامل EBF1 و EBF2 (Ethylene binding F box protein) توسط پروتئوزوم‌ها تخریب می‌شود. اما در حضور اتیلن EIN5 با فعالیت اگزوریبونوکلئازی خود موجب تخریب پروتئین‌های EBF1 و EBF2 شده و در نتیجه موجب تجمع EIN3 و راه‌اندازی سیگنالینگ اتیلن می‌شود (Olmedo et al., 2006). فعالیت ۳، (۲)، ۵- بی فسفات نوکلئوتید فسفاتازی آنزیم FRY1 موجب کاهش سطح PAP می‌شود و سطح XRN4 در سلول افزایش می‌یابد. فعالیت اگزوریبونوکلئازی XRN4 موجب تخریب پروتئین‌های EBF1, EBF2 می‌شود و موجب تجمع EIN3 و راه‌اندازی سیگنالینگ اتیلن می‌شود (Olmedo et al., 2006).

در این مطالعه واکنش موتانت‌های مختلف آرابیدوپسیس شامل *old-3*, *old-9*, *old-14*, *etr1-3* و *ko-5* که در ژن‌های *OLD3*, *OLD9*, *ETR1* و *OLD14* دارای موتاسیون هستند در صفات مرتبط با واکنش سه گانه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

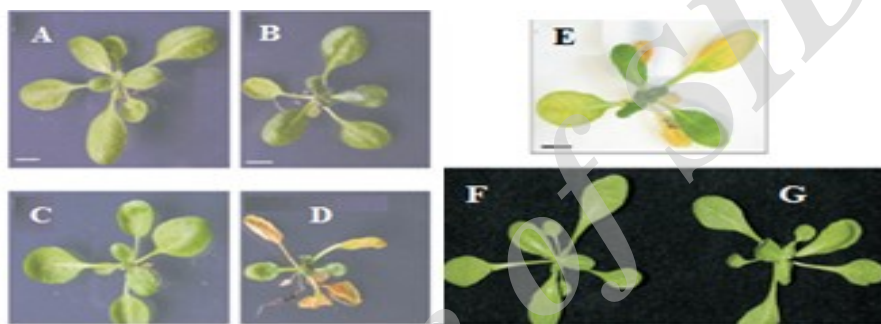
این آزمایش در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. بذور *Ler-0* و موتانت‌های *etr1-3* و *old9* و *old3* و *ko-5* و *old14* از دپارتمان بیولوژی ملکولی دانشگاه گرونینگن هلند تهیه شد (شکل ۲) (Jing et al., 2005; Shirzadian-Khorramabad et al., 2010). کلیه موتانت‌ها دارای یک موتاسیون نقطه‌ای EMS در ژنوم خود در یک مکان معین هستند و موتانت *ko-5* دارای یک قطعه T-DNA در ژن *OLD3* می‌باشد (Shirzadian-Khorramabad et al., 2010). برای استریل کردن بذوراز محلول هیپوکلرید سدیم ۱٪ به مدت ۱۰

تعدادی از موتانت‌های *old* دارای فنوتیپ‌های دیر پیر-شونده بوده و تعداد برگ‌های کم‌تری در این موتانت‌ها در واکنش به تیمار اتیلن در مقایسه با گیاهان مادری زرد می‌شود و همچنین تأخر در گلدهی و تغییر شکل برگ نیز از نشانه‌های بارز این گروه از موتانت‌ها بود. این امر نشان-دهنده ارتباط بین پیری با شکل برگ و زمان گلدهی می‌باشد (Shirzadian-khorramabad et al., 2010).

طبق مطالعات انجام شده، ۱۶ ژنوتیپ موتانت با قابلیت سبز ماندن (Stay Green) طولانی‌تر نسبت به ژنوتیپ مادری شناسایی شدند. برای ارزیابی واکنش این موتانت‌ها به اتیلن از آزمون سه‌گانه (Triple response) استفاده شد (Shirzadian-khorramabad et al., 2010). بر مبنای این مطالعات موتانت‌های *old* از نظر پاسخ به اتیلن به دو گروه تقسیم شدند: گروه اول شامل *old101*, *old102*, *old104*, *old107*, *old108*, *old110*, *old111*, *old112* و *old118* بودند که از نظر واکنش به اتیلن پاسخ مشابهی با ژنوتیپ مادری خود تحت تیمار اتیلن نشان دادند و گروه دوم شامل *old106*, *old113*, *old114*, *old115* و *old116* بودند که کاهش پاسخ و حساسیت به اتیلن را نشان دادند (Shirzadian-khorramabad et al., 2010). جایگاه‌های ژنی مختلفی برای کنترل روند پیری برگ وجود دارد که در تنظیم پیری گیاه نقش دارند (Kim et al., 2007).

پس از سنتز اتیلن این هورمون گازی شکل توسط گیرنده‌هایی مانند ETHYLENE RESPONSE1 (ETR1), ETR2, ETHYLENE INSENSITIVE4 (EIN4), ETHYLENE RESPONSE SENSOR1 (ERS1), and ERS2 در قسمت دیواره سلولی و شبکه اندوپلاسمی دریافت می‌شود و سپس در مسیر سیگنالینگ ویژه‌ای به سیتوپلاسم و هسته سلول ارسال می‌گردد (Wilson et al., 2014; Omalley et al., 2005). در گوجه‌فرنگی ۶ و در آرابیدوپسیس ۵ گیرنده اتیلن شناسایی شده است (Francisco et al., 2006). اولین گیرنده در مسیر سیگنالینگ اتیلن گیرنده پروتئینی CTR1 می‌باشد و دارای ارتباط مستقیمی با گیرنده‌های ETR1 و ERS1 می‌باشد (Wilson et al., 2014). این گیرنده‌ها سیگنال اتیلن را به گیرنده‌های پایین دست منتقل می‌کنند (Anne et al., 2003). سیگنال اتیلن توسط ETR1 و ETR2 و همچنین EIN4

درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵٪ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. آزمایش های فوق در دو آزمایش جداگانه فاکتوریل، که فاکتور اول در هر آزمایش شامل ژنوتیپ (۳ ژنوتیپ در گروه *Col-0* شامل *Col-0*, *etr1-3*, *ko-5* و *Ler-0* شامل *Ler-0*, *etr1-3*, *old3*, *old9*, *old14*) و فاکتور دوم شامل ACC در ۴ سطح (صفر، ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول) بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه های آماری با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 انجام و از روش مقایسه میانگین LSD جهت مقایسه میانگین بهره گرفته شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL 2007 ترسیم شد.



شکل ۲- فنوتیپ گیاه مادری و موتانت های استفاده شده در این تحقیق در حضور گاز اتیلن و عدم حضور آن. گیاهچه های ۲۴ روزه مادری *Ler-0* (A) و *old14* (B) در شرایط نرمال. گیاهچه های ۲۴ روزه تحت ۳ روز تیمار گاز اتیلن شامل ژنوتیپ های *Ler-0* (C)، *old14* (D)، *old9* (E) (Jing et al., 2005) و *old3* (G) در مقایسه با ژنوتیپ مادری *Ler-0* (F) در شرایط نرمال. مقیاس اشکال فوق ۵ mm می باشد (Shirzadian-Khorramabad et al., 2010)

Figure 2. The phenotype of wild type and mutant seedlings in presence of ethylene gas and its absence. 24-old-day seedlings of wild type seedlings *Ler-0* (A) and *old14* (B) in normal conditions. 24-old-day seedlings treated with ethylene gas for 3 days including genotypes *Ler-0* (C), *old14* (D) *old9* (E) (Jing et al., 2005). 24-old-day seedlings mutant seedlings *old3* (G) Compared with the wild type seedlings *Ler-0* (F) Under normal conditions. scale is 5 mm (Shirzadian-Khorramabad et al., 2010)

می باشند. بیشترین طول ریشه در ژنوتیپ موتانت *etr1-3* و کمترین طول ریشه در ژنوتیپ موتانت *ko-5* مشاهده شد. همچنین غلظت های مختلف ACC نیز در سطح یک درصد دارای تفاوت معنی داری می باشند. اثر متقابل ژنوتیپ در غلظت های مختلف ACC بر صفت طول ریشه نیز در سطح یک درصد معنی دار است (جدول ۱ و ۲).

دقیقه استفاده شد. جهت انجام آزمون Triple Response (شکل ۱) از ACC (شرکت SIGMA) با وزن ملکولی (۱۰۱/۱) استفاده شد. بذور به مدت پنج روز در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف هورمون ACC (صفر، ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول) در سه تکرار و تاریکی مطلق کشت و خصوصیات مورفولوژیک مورد نظر شامل طول ریشه و طول هیپوکوتیل، قطر ریشه و پیچیدگی رأسی در روز پنجم در موتانت های مورد بررسی توسط نرم افزار IMAGE J1, 4, 3, 67 اندازه گیری شدند. پتری های حاوی محیط کشت و بذور مورد نظر در ژرمیناتور (Growth chamber) ساخت کمپانی WEISS TECHNIK آلمان مدل (ZPR-2000) در دمای 22 ± 1

نتایج

بررسی صفت طول ریشه ژنوتیپ های مادری و

موتانت در واکنش به غلظت های مختلف ACC

آنالیز داده های به دست آمده از بررسی تأثیر ACC بر طول ریشه نشان می دهد که ژنوتیپ ها در زمینه صفت طول ریشه در سطح یک درصد دارای تفاوت معنی داری

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی صفات طول ریشه و طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های مادری *Ler-0* و موتانت‌های آن در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC.

Table 1. Variance analysis of data obtained from the measurement of root length and hypocotyl length in wild type *Ler-0* and its mutants in response to different concentrations of ACC.

S.O.V	منابع تغییرات	درجه آزادی df	Mean squares میانگین مربعات	
			طول ریشه Root length	طول هیپوکوتیل Hypocotyl length
Genotype	ژنوتیپ	4	93.92 **	42.60**
ACC treatment	تیمار ACC	3	14.90 **	15.93**
Genotype* treatment	ژنوتیپ* تیمار	12	1.59 **	1.62*
Error	خطا	40	0.34	0.73
Total	کل	59		

* معنی‌دار در سطح پنج درصد ** معنی‌دار در سطح یک درصد n.s غیر معنی‌دار
* Significant at the five percent level ** significant at the one percent level n.s non-significant

تغییر می‌تواند بر دیگر صفات گیاه موثر باشد که به مطالعه دقیق‌تری نیاز دارد. جالب این‌که با افزایش غلظت ACC تفاوت قابل توجهی در زمینه طول ریشه در گیاهچه‌های موتانت *etr1-3* مشاهده نشد.

بیش‌ترین طول ریشه در ژنوتیپ موتانت *etr1-3* و بعد از آن در ژنوتیپ‌های مادری *Col-0* و *Ler-0* در غلظت صفر میکرومول (شاهد) مشاهده شد. بنابراین احتمالاً وقوع موتاسیون *etr1-3* بر طول ریشه موثر است و طبیعتاً این

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی صفات طول ریشه و طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های مادری *Col-0* و موتانت‌های آن در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC

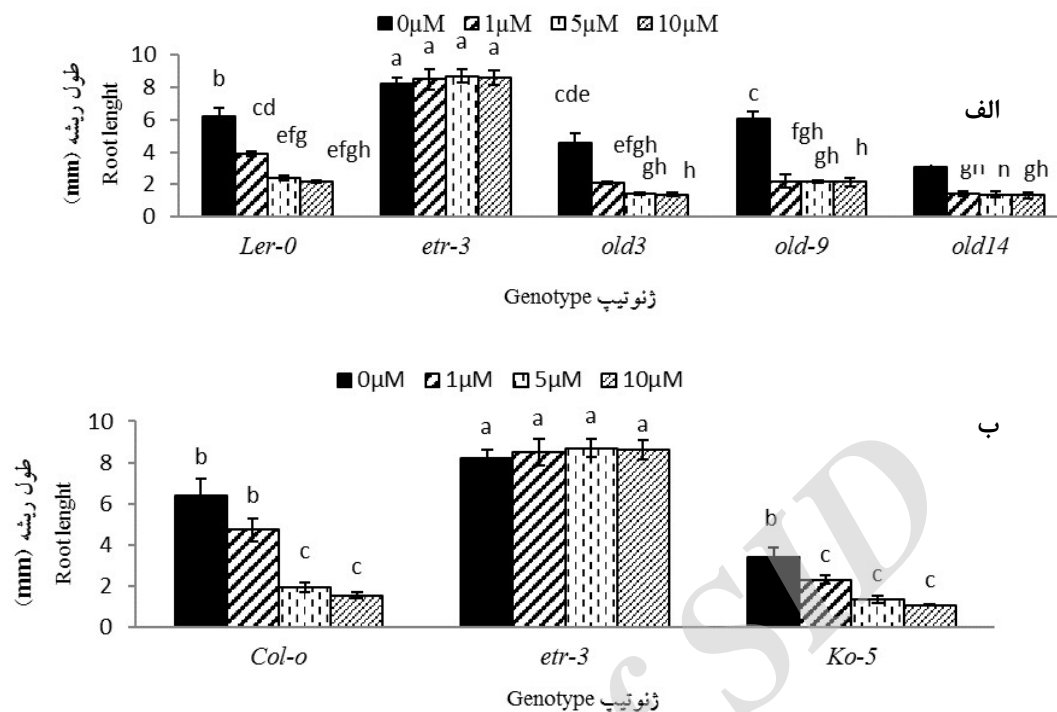
Table 2. Variance analysis of data obtained from the measurement of root length and hypocotyl length in wild type *Col-0* and its mutants in response to different concentrations of ACC.

S.O.V	منابع تغییرات	درجه آزادی df	Mean squares میانگین مربعات	
			طول ریشه Root length	طول هیپوکوتیل Hypocotyl length
Genotype	ژنوتیپ	4	105.13**	25.062**
ACC treatment	تیمار ACC	3	14.63**	10.53**
Genotype* treatment	ژنوتیپ* تیمار	12	6.67**	3.60*
Error	خطا	40	0.81	0.61
Total	کل	59		

* معنی‌دار در سطح پنج درصد ** معنی‌دار در سطح یک درصد n.s غیر معنی‌دار
* Significant at the five percent level ** significant at the one percent level n.s non-significant

میانگین صفت طول ریشه‌چه در ژنوتیپ *Ko-5* نسبت به والد مادری خود *Col-0* از کاهش ۴۶/۷۸ درصدی برخوردار بود و همچنین این صفت در ژنوتیپ‌های *old3* و *old14* نسبت به والد مادری خود *Ler-0* به ترتیب از کاهش‌های ۲۵ و ۵۰/۴۸ درصدی برخوردار شدند همچنین در موتانت *ko-5* نسبت به ژنوتیپ مادری *Col-0* میزان ۴۴/۵۰ درصد کاهش طول مشاهده گردید (شکل ۳).

با افزایش غلظت ACC، تمامی ژنوتیپ‌ها واکنش بیش‌تری به کاهش طول ریشه در مقایسه با ژنوتیپ *etr1-3* ۳ نشان می‌دهد. میانگین طول ریشه از تیمار شاهد (غلظت صفر میکرومول) به تیمار ۱ میکرومول ۳ درصد افزایش طول نشان داد و در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومول به ترتیب ۵ و ۴/۵ درصد افزایش طول مشاهده گردید (شکل ۳)، همچنین این ژنوتیپ موتانت در صفت طول ریشه با ژنوتیپ مادری خود *Col-0* و همچنین ژنوتیپ *Ler-0* تفاوت معنی‌دار نداشت، این درحالی است که



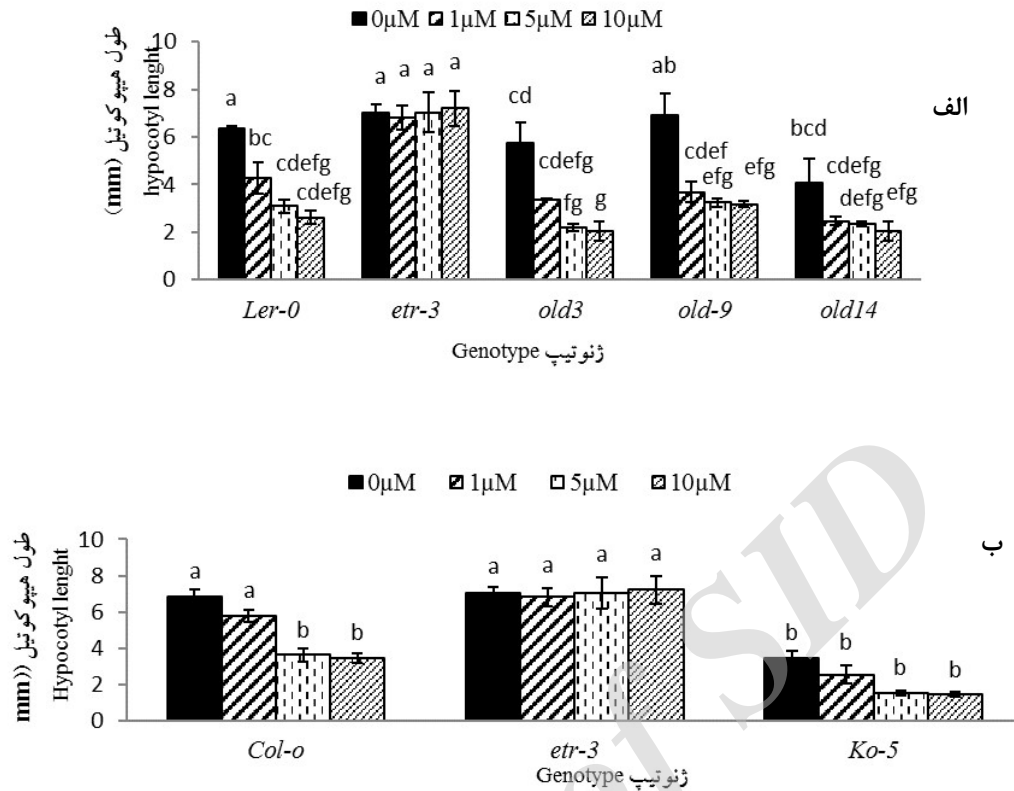
شکل ۳- الف: مقایسه میانگین طول ریشه در ژنوتیپ‌های موتانت *etr1-3*, *old3*, *old9*, *old14* و ژنوتیپ مادری *Ler-0* در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC. ب: مقایسه میانگین طول ریشه در ژنوتیپ‌های موتانت *etr-3*, *ko-5* و ژنوتیپ مادری *Col-0* در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC

Figure 3. Average comparison of the root length between mutant genotypes *etr1-3*, *old3*, *old9*, *old14* and wild type *Ler-0* in response to different concentrations ACC_(B) Average comparison of the root length mutant genotypes *etr3*, *ko-5* and wild type genotypes *Col-0* in response to different concentrations of ACC

می‌باشند، بیش‌ترین طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ موتانت *etr1-3* و در ژنوتیپ‌های مادری *Ler-0* و *Col-0* و کم-ترین طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ موتانت *ko-5* مشاهده می‌شود. همچنین غلظت‌های مختلف ACC نیز دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشند. اثر متقابل ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف ACC بر صفت طول هیپوکوتیل معنی‌دار است (جدول ۱ و ۲)، بیش‌ترین طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ *Col-0*، *etr1-3* و کم‌ترین طول در *Ler-0* در غلظت صفر میکرومول (شاهد) مشاهده شد و کم‌ترین طول در ژنوتیپ موتانت *ko-5* در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومول مشاهده گردید (شکل ۴).

میانگین طول ریشه بین ژنوتیپ *old9* و والد مادری *Ler-0* دارای تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری نبود. با افزایش غلظت از صفر به ۱۰ میکرومول ACC به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های *Ler-0*، *old3*، *old9*، *old14*، *Col-0*، *ko-5* به ترتیب میزان ۶۲، ۷۰، ۶۴/۵، ۵۶/۵، ۷۵/۹، ۳۰/۲۶ درصد کاهش طول ریشه‌چه مشاهده شد، درحالی‌که در موتانت *etr1-3* میزان ۱/۲۹ درصد افزایش طول ریشه‌چه مشاهده گردید (شکل ۳).

بررسی صفت طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های مادری و موتانت در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC
آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌ها در زمینه صفت طول هیپوکوتیل دارای تفاوت معنی‌داری



شکل ۴- الف: مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ‌های موتانت *etr-3*, *old3*, *old9*, *old14* و ژنوتیپ مادری *Ler-0* در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC. ب: مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ‌های موتانت *etr-3*, *ko-5* و ژنوتیپ مادری *Col-0* در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC

Figure 4. Average comparison of the hypocotyl length in mutant genotypes *etr1-3*, *old3*, *old9*, *old14* and wild type genotypes *Ler-0* in response to different concentrations ACC. (B) Average comparison of hypocotyl length mutant genotypes *etr3*, *ko-5* and wild type genotypes *Col-0* in response to different concentrations of ACC

۵۳/۸۴، ۵۰/۰۲، ۴۷/۰۸، ۸۷/۲۴ درصد کاهش طول هیپوکوتیل مشاهده گردید، درحالی‌که در موتانت *etr1-3* به میزان ۲/۶ درصد افزایش طول ثبت شد که تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ۴).

تغییرات طول هیپوکوتیل و طول ریشه گیاهچه‌های موتانت *etr1-3* در غلظت‌های مختلف ACC از تفاوت معنی‌داری برخوردار نبودند (شکل ۳ و ۴). بیش‌ترین میزان طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در ژنوتیپ *etr1-3* و به‌ترتیب در غلظت‌های ۵ میکرومول برای صفت طول ریشه‌چه و ۱۰ میکرومول برای صفت طول هیپوکوتیل مشاهده گردید. همچنین کم‌ترین میزان طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل هر دو در ژنوتیپ *Ko-5* و در غلظت ۱۰ میکرومول دیده شد. روند کاهش طول ریشه‌چه و

در موتانت *etr1-3* میانگین طول هیپوکوتیل از تیمار شاهد (غلظت صفر میکرومول) به تیمار ۱ میکرومول از کاهش ۲/۸۴ درصدی برخوردار بود و از تیمار صفر تفاوت معنی‌داری نشان نداد. این درحالی است که میانگین طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ *Ko-5* نسبت به والد مادری خود (*Col-0*) از کاهشی ۵۵ درصدی برخوردار است و همچنین این صفت در ژنوتیپ *old14* نسبت به والد مادری خود *Ler-0* کاهشی ۳۵/۷۴ درصدی داشت (شکل ۴). در میانگین طول هیپوکوتیل بین ژنوتیپ‌های *old3* و *old9* و والد مادری شان *Ler-0* تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری مشاهده نشد. با افزایش غلظت از صفر به ۱۰ میکرومول ACC به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های *Ler-0*، *old3*، *old9*، *old14*، *Col-0*، *ko5*، ۶۴/۶۵، ۵۸/۹،

نشان نمی‌دهند (جدول ۳). بررسی وضعیت فنوتیپی گیاهان موتانت و مادری در حضور ACC نشان داد که ژنوتیپ‌های مادری *Col-0* و *Ler-0* فنوتیپ واکنش سه‌گانه شامل کوتاهی ریشه‌چه و هیپوکوتیل و همچنین چرخش رأس هیپوکوتیل را نشان دادند، همچنین موتانت‌های *old3*, *old9*, *old14*, *ko-5* رفتاری مشابه ژنوتیپ مادری خود (فنوتیپ واکنش سه‌گانه) را نشان دادند و این درحالی است که ژنوتیپ موتانت *etr1-3* بر خلاف ژنوتیپ مادری خود (*Col-0*) با افزایش غلظت ACC و حضور اتیلن هیچ‌کدام از علائم واکنش سه‌گانه پاسخ به اتیلن را نشان نداد و تفاوت معنی‌داری در طول ریشه‌چه و طول هیپوکوتیل مشاهده نگردید، همچنین با افزایش غلظت ACC پیچیدگی در رأس هیپوکوتیل ملاحظه نشد (جدول ۳).

هیپوکوتیل در گیاهچه‌های مادری *Ler-0* و *Col-0* به گونه‌ای است که بین تیمار شاهد (غلظت صفر میکرومول) و تیمار ۱ میکرومول و همچنین بین غلظت ۱ میکرومول و ۵ میکرومول تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود، اما بین غلظت ۵ و ۱۰ میکرومول تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. این نسبت در سایر موتانت‌های حساس به اتیلن نیز تقریباً مشاهده می‌شود (شکل ۳ و ۴).

بررسی تغییرات واکنش سه‌گانه گیاهچه‌های موتانت در حضور و عدم حضور ACC

در صورت عدم استفاده از ACC در محیط MS و در شرایط تاریکی، کلیه گیاهچه‌های مادری *Ler-0* و *Col-0* و موتانت *old3*, *old9*, *old14*, *ko-5* و *etr1-3* از نقطه نظر واکنش سه‌گانه رفتاری مشابه ژنوتیپ مادری داشته و لذا کلیه ژنوتیپ‌های موتانت و مادری در صورت عدم حضور اتیلن علائمی از واکنش سه‌گانه را

جدول ۳- بررسی وجود یا عدم وجود فنوتیپ سه‌گانه (Triple Response) در ژنوتیپ‌های موتانت و مادری *Col-0* و *Ler-0* در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC پس از ۵ روز تاریکی مطلق، تکرار برای هر داده ۳ می‌باشد.

Table 3. Assessment of presence or absence of the Triple Response phenotype in mutant and wild type seedlings *Col-0* and *Ler-0* in response to different concentrations of ACC after 5 days of darkness, repeat for each observation 3.

ژنوتیپ	کوتاه شدن طول هیپوکوتیل	کوتاه شدن ریشه‌چه	چرخش در قلاب رأسی
Genotype	shortening hypocotyl length	Shortening radicle length	Rotation apical hook
<i>Ler-0</i>	✓	✓	✓
<i>old3</i>	✓	✓	✓
<i>old9</i>	✓	✓	✓
<i>old14</i>	✓	✓	✓
<i>Col-0</i>	✓	✓	✓
<i>Ko-5</i>	✓	✓	✓
<i>etr-3</i>	×	×	×

✓ (presence) and × (absence)

✓ (وجود) و × (عدم وجود)

در موتانت *etr1-3* با حضور اتیلن اثر مهارکنندگی بر طولی شدن هیپوکوتیل و ریشه‌چه و چرخش قلاب رأسی در این موتانت دیده نشد (جدول ۳). همچنین تمام ژنوتیپ‌های موتانت و مادری در غلظت‌های مختلف ACC در هر دو صفت طول ریشه و طول هیپوکوتیل دارای تفاوت معنادار می‌باشند درحالی‌که موتانت *etr1-3* در هر دو صفت در غلظت‌های مختلف ACC فاقد تفاوت معنادار می‌باشد (جدول ۴).

جدول ۴- تجزیه واریانس طول ریشه و هیپوکوتیل در ژنوتیپ‌های موتانت و مادری در غلظت‌های مختلف ACC به روش برش‌دهی

Table 4. Variance analysis of root length and hypocotyl data in mutant and wild type genotypes ACC in different concentrations by the cutting method

ژنوتیپ Genotyp	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		طول ریشه Radicle length	طول هیپوکوتیل Hypocotyl length
<i>Ler-0</i>	3	8.304**	10.275**
<i>old3</i>	3	2.172 *	3.326**
<i>old9</i>	3	8.993**	6.169**
<i>old14</i>	3	2.507 *	2.130**
<i>Col-0</i>	3	8.251**	15.966**
<i>Ko-5</i>	3	0.073 n.s	0.125 n.s
<i>etr1-3</i>	3	9.425 **	11.289**

* معنی‌دار در سطح پنج درصد ** معنی‌دار در سطح یک درصد n.s غیر معنی‌دار

* Significant at the five percent level ** significant at the one percent level n.s non-significant

جدول ۵- نسبت طول ریشه به طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ‌های موتانت و والد در محیط فاقد ACC به طول ریشه و طول هیپوکوتیل در این گیاهچه‌ها در محیط دارای 10 μM ACC

Table 5. The ratio of root and hypocotyl length in mutant and wild type seedlings in absence of ACC to root length and hypocotyl length in these seedlings in presence of 10 μM ACC

ژنوتیپ Genotype	طول هیپوکوتیل Hypocotyl length			طول ریشه Root length		
	(0μM ACC)	(10μM ACC)	Ratio	(0μM ACC)	(10μM ACC)	Ratio*
<i>Ler-0</i>	6.351 ± 0.123	2.61 ± 0.271	2.43	6.185 ± 0.54	2.186 ± 0.065	2.86
<i>old3</i>	5.770 ± 0.851	2.047 ± 0.422	2.81	4.581 ± 0.61	1.37 ± 0.11	3.34
<i>old9</i>	6.89 ± 0.494	3.180 ± 0.131	2.16	6.061 ± 0.46	2.154 ± 0.26	2.81
<i>old14</i>	4.082 ± 1.029	2.046 ± 0.40	1.99	3.065 ± 0.47	1.338 ± 0.18	2.31
<i>Col-0</i>	6.86 ± 0.351	3.46 ± 0.272	1.98	6.374 ± 0.81	1.53 ± 0.155	4.16
<i>etr1-3</i>	7.023 ± 0.36	3.46 ± 0.272	0.97	8.22 ± 0.36	8.61 ± 0.44	0.90
<i>ko-5</i>	3.457 ± 0.400	1.44 ± 0.141	2.40	3.39 ± 0.45	1.06 ± 0.03	3.198

* Ratio بر اساس نسبت اندازه طول ریشه اصلی و طول هیپوکوتیل در 0μM ACC به 10μM ACC محاسبه شد.

* Ratio based on the length of the main root and hypocotyl length was calculated in 0μM ACC to 10μM ACC.

در موتانت *etr1-3* خلاف این امر صادق است و با افزایش غلظت ACC به 10 میکرومول کاهش طولی در ریشه و هیپوکوتیل مشاهده نگردید (جدول ۵).

بحث

گیاهان موتانت *old* یک مجموعه‌ای از گیاهان موتانت هستند که تاثیر هورمون گازی اتیلن بر فرایند پیری در

نتایج حاکی از این می‌باشد که در کلیه ژنوتیپ‌ها با افزایش غلظت ACC طول ریشه و طول هیپوکوتیل کاهش می‌یابد، درحالی‌که در ژنوتیپ موتانت *etr1-3* خلاف این می‌باشد. همچنین در تمام ژنوتیپ‌ها با افزایش غلظت ACC از صفر به 10 میکرومول طول ریشه و هیپوکوتیل به مقدار نصف کاهش یافته، یعنی در شرایط شاهد طول ریشه و طول هیپوکوتیل دو برابر طول ریشه و هیپوکوتیل در غلظت 10 میکرومول می‌باشد، درحالی‌که

تقسیم شدند (2010): گروه اول شامل *old101*, *old102*, *old104*, *old107*, *old108*, *old110*, *old111*, *old112* و *old118* که پاسخی مشابه ژنوتیپ مادری خود از نظر صفات سه‌گانه (Triple response) تحت تیمار اتیلن داشتند، و گروه دوم شامل *old106*, *old109*, *old113*, *old114*, *old115* و *old116* که کاهش پاسخ و حساسیت به اتیلن را در مقایسه با ژنوتیپ شاهد (Wild type) نشان دادند (Shirzadian- 2010 *et al.*, khoramabad). موتانت‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر پاسخی مشابه گروه اول در واکنش به اتیلن داشتند، درحالی‌که موتانت *etr1-3* رفتاری مشابه گروه دوم و عدم حساسیت به اتیلن را نشان داد. موتانت *etr1-3* با افزایش غلظت ACC تغییری در طول ریشه و طول هیپوکوتیل آن رخ نمی‌دهد. این موضوع نشان‌دهنده این است که فعالیت حسگرهای اتیلن و مسیر بیوسنتزی آن در گیاهان موتانت *etr1-3* با نقص روبرو شده و این ژنوتیپ نسبت به غلظت‌های مختلف اتیلن حساسیت ندارد. در حضور اتیلن موتانت‌های *etr1-3* به اتیلن حساسیتی نشان نمی‌دهند و گیرنده‌های اتیلن در این موتانت‌ها قادر به درک، انتقال و سیگنال اتیلن نمی‌باشند و مانند حالتی که اتیلن وجود ندارد رفتار می‌کنند (Zhao *et al.*, 2002). زیر خانواده ETR1 و ERS1 نقش برجسته و مهمی در تنظیم پاسخ گیاه آرابیدوپسیس به اتیلن دارند (Qu *et al.*, 2007). تفاوت در پاسخ به اتیلن بین موتانت‌های *etr1-9* و *ers1-3* به دلیل تفاوت در بیان ETR1 و ERS1 می‌باشد. نقش ETR1 و ERS1 (زیر خانواده ۱) در تنظیم سیگنالینگ اتیلن نسبت به سه عضو دیگر از گیرنده‌های اتیلن مهم‌تر و برجسته‌تر می‌باشد. از دست رفتن فعالیت هر کدام از گیرنده‌های اتیلن تا حدی توسط عضو دیگری از این گیرنده‌ها جبران می‌شود، در صورتی که وقوع جهش باعث از بین رفتن فعالیت هر دو گیرنده ETR1 و ERS1 شود. وقوع این نوع جهش توسط هیچکدام از گیرنده‌های دیگر جبران نخواهد شد. همچنین وقوع جهش در ژن گیرنده ETR1 اثرات به مراتب شدیدتری نسبت به گیرنده ERS1 دارد، و به‌طور کلی اعضای زیر خانواده ۱ به وقوع جهش حساس‌تر می‌باشند و اثرات تنش در این گیرنده‌ها توسط فعالیت گیرنده‌های دیگران جبران نخواهد شد (Qu *et al.*, 2007). در صورتی که وقوع جهش در هر کدام دیگر از گیرنده‌ها

این گیاهان بسته به نوع موتاسیون و فعالیت ژن مربوطه متفاوت است، (Shirzadian-Khorramabad *et al.*, 2010). در بسیاری از این موتانت‌ها آغاز زمان پیری با والد *Ler-0* متفاوت است. به‌طور مثال موتانت *old3* دارای یک موتاسیون نقطه‌ای در ژن کدکننده OASTL (O- acetylserine-lyase) بوده و موجب تبدیل آمینواسید گلایسین به آمینواسید گلوتامیک اسید شده و مسئول سنتز سیستئین نیز می‌باشد (Shirzadian-Khorramabad *et al.*, 2010). گیاهچه‌های *old3* پس از ۱۴ روز رشد در شرایط نرمال وارد مرگ سلولی شده و می‌میرند. واکنش گیاهچه‌های *old3* به اتیلن در مقایسه با گیاهان مادری به‌صورت زردشدن سریع‌تر برگ‌ها و کاهش میزان کلروفیل و آزادسازی یون‌ها از برگ‌ها همراه است (Jing *et al.*, 2002). نتایج نشان می‌دهد که گیاهان *old3* به اتیلن واکنش داده و لذا سیستم بیوسنتز و سیگنالینگ اتیلن در این گیاهان فعال است. واکنش گیاهچه‌ها به اتیلن در دیگر موتانت‌ها به دلیل جهشی که در برخی ژن‌های آن‌ها رخ داده با افزایش سن گیاه بیش‌تر شده و سریع‌تر وارد فرآیند پیری می‌شوند (Jing *et al.*, 2005). طی ۱۲-۳ روز تیمار اتیلن موتانت‌های *old3*, *old9*, *old12* و *old14* به‌ترتیب و به‌طور ثابت طی روزهای تیمار اتیلن ۴، ۶، ۶ و ۷ برگ زرد نشان دادند. در حالی‌که موتانت‌های *old11* و *old1-1* با افزایش روزهای تیمار اتیلن از ۶ به ۱۶ روز تعداد برگ زرد (علائم پیری) در آن‌ها کاهش یافت. به نظر می‌رسد موتانت‌های *old* دارای اثرات بیش‌تری بر تغییرات ناشی از سن در گیاهان هستند زیرا به اتیلن حساسیت بیش‌تری نشان داده و سریع‌تر پیر شدند. بنابراین موتانت‌های *old3*, *old5* و *old14* در گروه ۱ یعنی موتانت‌هایی که فرآیند پیری در آن‌ها بدون حضور اتیلن آغاز می‌شود قرار می‌گیرند (Jing *et al.*, 2005). دامنه و تنوع موتانت‌های *old* نشان می‌دهد که ژن‌های *OLD* به‌صورت یک شبکه پیچیده نظارتی است و پیری القاشده توسط سن گیاه و اتیلن را کنترل می‌کند. لازم به ذکر است که در ژنوتیپ‌های مادری با افزایش زمان تیمار اتیلن تعداد برگ‌های زرد افزایش می‌یابد. بنابراین احتمالاً ژن *old* به‌عنوان محدود-کننده القای پیری توسط اتیلن عمل می‌کند (Jing *et al.*, 2002; Jing *et al.*, 2005). بر اساس مطالعات انجام شده موتانت‌های *old* از نظر پاسخ به اتیلن به دو گروه

ذکر است که وقوع جهش در گیرنده ETR1 توسط افزایش بیان دیگر گیرنده‌های اتیلن جبران نمی‌گردد (Zhao *et al.*, 2002). زیرا ETR1 اولین گیرنده اتیلن در مسیر سیگنالینگ اتیلن می‌باشد و تا زمانی که این گیرنده به خوبی کار نکند و قادر به درک اتیلن نباشد نمی‌تواند این سیگنال را به گیرنده‌های پایین دست خود منتقل کند. پس از ساخته شدن اتیلن در سلول، این هورمون گازی توسط گروهی از گیرنده‌ها از جمله ETR1, ERSS, ETR2, و همچنین EIN4 در دیواره سلولی و شبکه اندوپلاسمی دریافت شده و سپس در مسیر سیگنالینگ به هسته ارسال می‌شود (Ma *et al.*, 2006). وقوع موتاسیون در ژن این گیرنده‌ها منجر به اختلال در عملکرد و یا عدم عملکرد آن‌ها می‌شود و گیاهان موتانت این ژن‌ها مثل *etr1-3* قادر به درک اتیلن نخواهند بود (Ma *et al.*, 2006). گیرنده ETR1 بالا دست CTR و دیگر گیرنده‌های اتیلن قرار دارد و موتاسیون در آن منجر به اختلال در عملکرد ETR1 شده و این گیرنده به دلیل موتاسیون و عدم درک اتیلن قادر نخواهد بود که سیگنال اتیلن را به گیرنده CTR که یک تنظیم‌کننده منفی در مسیر سیگنالینگ اتیلن است انتقال دهد و در نتیجه EIN2 به عنوان یکی از اجزای سیگنالینگ اتیلن مختل خواهد شد و در نهایت بیان ژن‌های مرتبط با اتیلن دچار اختلال می‌گردد (Wang *et al.*, 2002). بنابراین در موتانت *etr-3* عدم درک و پاسخ به اتیلن مشاهده می‌گردد و گیرنده ETR1 این گروه از موتانت‌ها حساسیتی به اتیلن نشان نمی‌دهند و مانند حالتی که اتیلن وجود ندارد رفتار می‌کنند. لازم به ذکر است که احتمالاً ژن‌های *old* پاسخ گیاهان را به تیمار اتیلن تنظیم می‌کنند، پاسخ به اتیلن در سن ۵ روزگی در گیاهان موتانت *old3*, *old9* و *old14* و *ko-5* مشابه یکدیگر و مشابه ژنوتیپ مادری آن‌ها بود. لذا وقوع جهش در ژن *old* این موتانت‌ها تأثیری در بیوسنتز، سیگنالینگ و درک اتیلن و فعالیت طبیعی ژن *OLD* در سن ۵ روزگی نداشته است و گیاهان موتانت مشابه ژنوتیپ مادری خود قادر به درک اتیلن می‌باشند.

نتیجه‌گیری

در بررسی‌های انجام شده تمامی ژنوتیپ‌ها با افزایش غلظت ACC رفتاری مشابه با ژنوتیپ مادری خود نشان دادند و کاهش طول ریشه، کاهش طول هیپوکوتیل و

(ETR2, ERS1, EIN4) توسط گیرنده‌های دیگر نقص ناشی از جهش تا حد زیادی جبران می‌گردد (Qu *et al.*, 2007). بنابراین می‌توان استنباط نمود که اعضای زیر خانواده ۱ به دلیل این‌که جزء اولین گروه گیرنده‌هایی می‌باشند که اتیلن را درک می‌کنند، حساسیت بیش‌تری نسبت به سایر گیرنده‌ها دارند و در صورت وقوع جهش در آن‌ها قادر به درک اتیلن نخواهد بود. در نتیجه به دلیل عدم درک اتیلن در گیاه، سیگنالینگ و انتقال پیام اتیلن انجام نمی‌شود. اولین گیرنده در مسیر سیگنالینگ اتیلن گیرنده CTR1 می‌باشد. این گیرنده تنظیم‌کننده منفی واکنش پایین دست خود است. گیرنده EIN2 پایین‌تر از CTR1 و بالا دست گیرنده‌ی EIN3 قرار دارد و تنظیم‌کننده مثبت واکنش پایین دست خود بوده و در سنتز اتیلن نقش به‌سزایی دارد. در مسیر سیگنالینگ اتیلن EIN3 پس از گیرنده EIN2 قرار گرفته است، و از جمله فاکتورهای رونویسی مهم در هسته می‌باشد (Chen *et al.*, 2011; Ju *et al.*, 2012). فعالیت این فاکتور منجر به فعال شدن فاکتورهای همچون EILS شده و بیان ژن ERF1 را تنظیم می‌کند و به دنبال آن با بیان ژن‌های واکنش‌گر به حضور اتیلن، گیاه واکنش لازم به حضور اتیلن را نشان خواهد داد (Wang *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2014). گیرنده CTR1 ارتباط مستقیمی با ETR1 و ERS1 داشته و منجر به فعال‌سازی آبشار سیگنالینگ Map kinase می‌گردد (Wang *et al.*, 2002). وقوع جهش در ژن ETR1 منجر به تغییر شکل این گیرنده شده و قادر به درک و دریافت سیگنال اتیلن نخواهد بود و آبشار سیگنالینگ Map kinase غیر فعال می‌گردد (Wang *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2014). گیرنده‌های ETR از اجزای درگیر در مسیر سیگنالینگ اتیلن می‌باشند که در موتانت *etr1-3* ژن این گیرنده سیگنالینگ اتیلن دچار موتاسیون شده در نتیجه پیام اتیلن منتقل نشده و گیاهچه‌های *etr1-3* حساسیتی به حضور و افزایش غلظت اتیلن نشان نمی‌دهند. وقوع جهش در ژن گیرنده ETR بیان این ژن را در سطح پس از رونویسی تحت تأثیر قرار می‌دهد و این جهش و تغییرات پس از رونویسی آن منجر به بروز فنوتیپ متفاوت در این گونه موتانت‌ها می‌شود (Zhao *et al.*, 2002). وقوع جهش در دیگر اعضای خانواده گیرنده اتیلن تأثیر ناچیزی بر بیان ژن ETR نشان می‌دهد، همچنین لازم به

و با ژنوتیپ مادری خود *Col-0* و دیگر ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این آزمایش تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین این موتانت حساسیتی به افزایش غلظت ACC در محیط کشت نشان نداد. این امر ناشی از جهشی می‌باشد که در گیرنده ETR1 این ژنوتیپ رخ داده و از این رو این موتانت به یک موتانت غیر حساس به اتیلین تبدیل شده است، در حالی است که پاسخ به اتیلین در سایر گیاهان موتانت مشابه یکدیگر و مشابه ژنوتیپ مادری آن‌ها بود.

پیچیدگی قلاب رأسی در آن‌ها مشاهده شد. این بدان معناست که بیوسنتز اتیلین و سیگنالینگ آن در گیاهان موتانت مورد بررسی فعال است و وقوع جهش در این موتانت‌ها تأثیری در بیوسنتز، سیگنالینگ و درک اتیلین نداشته است. از آنجائی که این موتانت‌ها به مراتب زودتر از گیاه والدینی خود فرایند پیری را شروع می‌کنند، لذا می‌توان گفت که ژن‌های کنترل‌کننده و موثر بر پیری و اتیلین در آرابیدپسیس متفاوت هستند. اما ژنوتیپ موتانت *etr1-* 3 پاسخی متفاوت به غلظت‌های مختلف ACC نشان داد

منابع

- Anne, E., Hall, B. and Bleeker, A.B. 2002. Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the arabidopsis ethylene receptors reveals that the *ers1 etr1* double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent. *Plant Cell*, 15: 2032–2041. **(Journal)**
- Chen, R., Binder, B.M., Garrett, W.M., Tucker, M.L., Cooper, B. and Chang, C. 2011. Proteomic responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings treated with ethylene. *Molecular Biosystems*, 7: 2637–2650. **(Journal)**
- Francisco, D.L., Torre, M., Del, C., Rodríguez-Gacio, A. and Matilla, J. 2006. How ethylene works in the reproductive organs of higher plants. *Plant Signaling and Behavior*, 1(5): 231-242. **(Journal)**
- Guzman, P. and Ecker, J.R. 1990. Exploiting the triple response of arabidopsis to identify ethylene related mutants. *Plant Cell*, 2: 513-523. **(Journal)**
- Guiboileau, A., Sormany, R., Meyer, C. and Masclaux-Daubresse, C. 2010. Senescence and death of plant organs. *Biologies*, 333: 382-391. **(Journal)**
- Jing, H.C., Sturre, M.J.G., Hille, J. and Dijkwel, P.P. 2002. Arabidopsis onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *Plant Journal*, 32(1): 51-63. **(Journal)**
- Jing, H.C., Schippers, J.H.M., Hille, J. and Dijkwel, P.P. 2005. Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and *OLD* genes in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2915–2923. **(Journal)**
- Ju, C., Yoon, G.M., Shemansky, J.M., Lin, D., Yin, I. and Chang, J. 2012. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 19486–19491. **(Conference)**
- Kim, H.J., Lim, P.O. and Nam, H.G. 2007. Molecular regulation of leaf senescence. *In: Senescence processes in plants*. Eds. Gan, S. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom. pp. 231-255. **(Book)**
- Lim, P.O., Kim, H.J. and Nam, H.G. 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 115-136. **(Book)**
- Ma, B., Sui, M., Sun, H., Takada, K., Mori, H., Kamada, H. and Ezura, H. 2006. Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. *Plant Physiology*, 141: 587–597. **(Journal)**
- Omalley, R.C., Rodriguez, F., Esch, J., Binder, B., ODonnell, P., Klee, H. and Bleeker, A. 2005. Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and Tomato. *Plant Journal*, 41: 651–659. **(Journal)**
- Olmedo, G., Goue, H., Gregory, B., Nourizadeh, S., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P. and Ecker, J. 2006. Ethylene-insensitive encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *PNAS*, 36: 13286-13293. **(Journal)**
- Qu, X., Hall, B., Gao, Z. and Schaller, G.E. 2007. A strong constitutive ethylene response phenotype conferred on *Arabidopsis* plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1. *BMC Plant Biology*, 7: 3. **(Journal)**

- Shirzadian-Khorramabad, R., Jing, H.C., Hille, J. and Dijkwel, P.P. 2010. Identification of *Arabidopsis* stay-green mutants with a functional ethylene response pathway. Agronomy Society of New Zealand Special Publication. Grassland Research and Practice. 14: 119-130. **(Journal)**
- Wang, K., Li, H. and Ecker, J. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. Plant Cell, 15: 131-151.
- Wilson, R.L., Bakshi, A. and Binder, B.M. 2014. Loss of the ETR1 ethylene receptor reduces the inhibitory effect of far-red light and darkness on seed germination of *Arabidopsis thaliana*. Plant Science, 5: 1-13. **(Journal)**
- Zakarias, L. and Reid, M.S. 1990. Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. Physiologia Plantarum, 80: 549-554. **(Journal)**

Archive of SID

The response of *Arabidopsis* mutants associated with senescence to the precursor of ethylene (ACC)

Sara Royan¹, Reza Shirzadian Khoramabad^{*2}, Payam Talebi Kahdoei³

Received: March 13, 2016

Accepted: May 31, 2016

Abstract

Ethylene is involved in many developmental and processes including plant senescence. Senescence is the final step of plant development resulting in death of plants. 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid) ACC) is produced in the last step of the ethylene biosynthesis. The Morphological characteristics of treated plants by ACC induce a phenotype called triple response including root and hypocotyl shortness and thickness. The occurrence of these symptoms indicates that plant system sense ethylene and its biosynthesis is activate. In this project, we examined the response of the wild type seedlings *Ler-0*, *Col-0* and several mutants including *old-3*, *old-9*, *old-14*, *etr1-3* and *ko-5* to various concentration of ACC in *Arabidopsis thaliana* following evaluation of triple response characteristics. *OLD* genes in *Arabidopsis* are known as senescence involved genes. According to the obtained results, it shown that with increasing ACC concentrations, the triple response has been detected in most mutants, while in mutant *etr1-3* none of those responses were observed meaning that *etr1-3* is not able to sense and signal ethylene. These results suggest that change in *OLD9*, *OLD3* and *OLD14* function doesn't cause any significant impact on ethylene biosynthesis and signaling, while change in gene activity *ETR* in *Arabidopsis* led to the loss of the triple response in *etr-3* plants. Thus, the genes controlling ethylene biosynthesis is different from genes regulating plant senescence.

Key words: *Arabidopsis*; Ethylene; Hypocotyl; Mutants; Root

1. MSc. of Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3. MSc. student of Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

*Corresponding author: R.shirzadian@gmail.com