

## پاسخهای فیزیولوژیکی و مولکولی ناقل *AtNRT2.4* به شرایط محرومیت نیتروژن در گیاه *Arabidopsis thaliana*

پرژک ذوفن<sup>۱</sup>، منصور شریعتی<sup>۱\*</sup> و فرانسواز دنیل ودل<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

<sup>۲</sup> اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

<sup>۳</sup> فرانسه، ورسای، مرکز تحقیقات بین المللی کشاورزی (INRA)

تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۲۷

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۲۰

### چکیده

نیترات یکی از مهمترین منابع نیتروژنی معدنی برای اکثر گیاهان می باشد. مطالعات فیزیولوژیکی نشان داده است در گیاهان حداقل دو سیستم ناقل با تمایل پایین و بالا برای جذب نیترات به ترتیب برای غلظتهای زیاد و کم نیترات در محیط وجود دارد. از طرفی مطالعات مولکولی نشان داده است که خانواده ژنی *NRT2* ناقلین سیستم با تمایل بالا (HATS) High Affinity Transporter Systems نیترات را کد می کنند. در گیاه *Arabidopsis thaliana* با توجه به رابطه قوی بین الگوهای بیان ژن و میزان فعالیت HATS، پیشنهاد شده است که ژن *AtNRT2.1* نقش اصلی را در جذب نیترات از محیط از طریق HATS ایفا می نماید. در میان ژنهای دیگر از خانواده *AtNRT2*، ژنهای *AtNRT2.4* و *AtNRT2.5* الگوی بیان مشابهی را نشان داده اند، هرچند عملکرد شان در جذب نیترات نامشخص است. بنابراین برای درک بهتر نقش ژن *AtNRT2.4* در جذب نیترات از طریق HATS، گیاهان *A. thaliana* جهش یافته در این ژن به همراه گیاهان تیپ وحشی بر روی شن و محلول غذایی کامل دارای ۱۰ میلی مولار نیترات کشت شدند. بعد از ۳۵ روز، گیاهان با محلول غذایی کامل و فاقد نیتروژن آبیاری و در زمانهای صفر، ۱۰ و ۱۷ روز بعد از آغاز محرومیت نیتروژن برداشت شدند. تأثیر محرومیت نیتروژن بر روی بیوماس، میزان نیترات و اسیدهای آمینه بافتی، در صد نیتروژن کل و میزان بیان ژنهای *AtNRT2.1* و *AtNRT2.4* مورد مطالعه قرار گرفت. به طور کلی برای هر دو ژنوتیپ، میزان نیترات بافتی به موازات مدت زمان محرومیت نیتروژن از یک روند کاهشی تبعیت نمود. این شرایط منجر به کاهش درصد نیتروژن کل هم در گیاهان جهش یافته و هم در گیاهان تیپ وحشی گردید. نتایج حاصل از Real-time PCR نشان داد که فقر نیتروژن منجر به افزایش بیان ژن *AtNRT2.4* می گردد، در حالی که میزان بیان *AtNRT2.1* را کاهش می دهد. با توجه به تغییرات مهم و معنی دار در میزان شاخصهای فیزیولوژیکی و مولکولی به نظر می رسد که ۱۰ روز محرومیت نیتروژن به عنوان یک نقطه بحرانی جهت القای مسیرهای علائم درگیر در تشخیص و پاسخ به شرایط کمبود نیترات حائز اهمیت باشد. همچنین تصور می شود که ژن *AtNRT2.4* در مسیر انتقال علائم نقش مهمی را ایفاء نمایند.

واژه های کلیدی: *Arabidopsis thaliana*، ژن *AtNRT2.4*، نیترات، اسید آمینه کل، نیتروژن کل

\* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۷۲، پست الکترونیک: mansour\_shariati@yahoo.com

### مقدمه

طبیعی مواجه با کمبود شدید نیترات هستند. عدم وجود سنگ معدن نیترات در طبیعت، رقابت شدید بین گیاهان جهت جذب این ماده، محلول بودن نمکهای نیتراتی که

رشد و تولیدات گیاهی به ویژه محصولات کشاورزی وابستگی شدیدی به میزان نیترات موجود در محلول خاک دارد. متأسفانه، اغلب خاکهای زراعی و حتی اکوسیستمهای

مطالعات فیزیولوژیکی و مولکولی مرتبط با جذب نیتрат توسط HATS در آن انجام شده است، حضور هفت ژن از خانواده *NRT2* ثابت گردیده است (۱۱ و ۲۸). مطالعات الگوی بیان ژن در *Arabidopsis* با استفاده از تکنیک RT-PCR نشان داده است که به استثنای ژن *AtNRT2.7* دیگر اعضای خانواده ژنی *AtNRT2* بیشترین بیان را در ریشه‌ها نشان می‌دهند که در این میان ژنهای *AtNRT2.1* و *AtNRT2.2* دارای بیشترین سطح بیان می‌باشند (۱۶). در میان خانواده ژنی *AtNRT2* در *Arabidopsis* ژن *AtNRT2.1* در سطح وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است. بررسی جهش یافته (mutant) دوگانه *atnrt2a* که دارای حذف کامل ژن *AtNRT2.1* و حذف ناحیه 3' ژن *AtNRT2.2* است، نشان داد که در این گیاه جذب نیترات توسط iHTAS به شدت کاهش می‌یابد، در حالی که فعالیت LATS تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد (۳ و ۱۲). از طرف دیگر، انتقال ژن *AtNRT2.1* به جهش یافته دوگانه *atnrt2a* باعث احیاء کامل جذب نیترات و رشد در این گیاهان شد. بر اساس این شواهد پیشنهاد شده است که احتمالاً ژن *NRT2.1* نقش غالب تری در قیاس با ژن *NRT2.2* در جذب نیترات توسط iHATS دارد (۱۴). این نتایج به همراه نتایج حاصل از گیاهان جهش یافته در ژن *NRT2.1* و بیان پروتئین مربوط در غشای پلاسمایی سلولهای ریشه (۶) پیشنهاد نموده است که پروتئین *NRT2.1* در گیاهان عالی به عنوان یک ناقل iHATS برای جذب نیترات عمل می‌نماید. به استثنای ژنهای *AtNRT2.1* و *AtNRT2.2*، عملکرد سایر ژنهای خانواده *NRT2* در گیاهان هنوز مشخص نشده است. اخیراً برخی نتایج بیانگر آن است که پروتئین *AtNRT2.7* احتمالاً در بارگیری و تجمع نیترات در واکوئل بذرهای بالغ حائز اهمیت است که این می‌تواند در تسهیل جوانه زنی بذر مؤثر باشد (۵). مطالعات Okamoto و همکاران (۲۰۰۳) بیانگر آنست که ژن *AtNRT2.4* یک ژن القاء شونده توسط نیترات می‌باشد (۱۶). همچنین نتایج دیگر نشان می‌دهد که بیان

باعث شستشوی آنها در اثر بارندگی و آبیاری به اعماق خاک و در نتیجه غیر قابل دسترس شدن آن برای ریشه های گیاهی می‌شود و تغییرات فصلی، زمانی و مکانی از جمله مهمترین عواملی هستند که در کمبود نیترات خاک سهم به سزایی دارند. تحقیقات فیزیولوژیکی روند جذب نیترات در گیاهان نشان داده است که حداقل دو سیستم مجزا برای جذب نیترات بنامهای (Low Affinity LATS (High Affinity HATS, Transporter System) در ریشه‌ها توسعه یافته است (۲، ۷، ۸ و ۱۳)، که به گیاهان اجازه می‌دهد به سرعت خود را با تغییرات میزان نیترات موجود در محیط سازگار نمایند و مطابق با نیاز رشدی، جذب نیترات را از محلول خاک انجام دهند. سیستم ناقل LATS، از تمایل پایینی نسبت به تغییرات برخوردار است و به نظر می‌رسد که وقتی غلظت نیترات در محیط بیش از ۱ میلی مولار باشد این سیستم نقش مهمی را در جذب نیترات ایفاء می‌نماید. سیستم HATS یک سیستم با تمایل بالا نسبت به نیترات است که در غلظتهای بسیار کم نیترات در محیط (در حد میکرومولار) عمل می‌کند و یک روند اشباع‌پذیر را از خود نشان می‌دهد که خود به دو نوع (inducible High iHATS (constitutive cHATS و Affinity Transporter System) (High Affinity Transporter System) تقسیم می‌گردد. سیستم iHATS قویاً در برابر حضور نیترات القایی بوده، در حالی که سیستم cHATS علی‌رغم تمایل بالا نسبت به نیترات به صورت دائمی بیان می‌شود و حتی در غیاب نیترات نیز فعال است. در گیاهان عالی، خانواده ژنی *NRT2* به عنوان کد کننده سیستمهای HATS شناخته شده و از طریق تشابه توالی با ژن *NRTA* در قارچ *Aspergillus nidulans* (۲۵) و ژن *CrNRT2.1* در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* (۱۸) کلون و جدا سازی شده‌اند که می‌توان به گیاهانی نظیر جو (۲۲، ۲۴ و ۲۶)، سویا (۱)، تنباکو (۱۹)، *Arabidopsis* (۱۱، ۲۸) و گندم (۲۷) اشاره نمود. در گیاه *Arabidopsis* که بیشترین

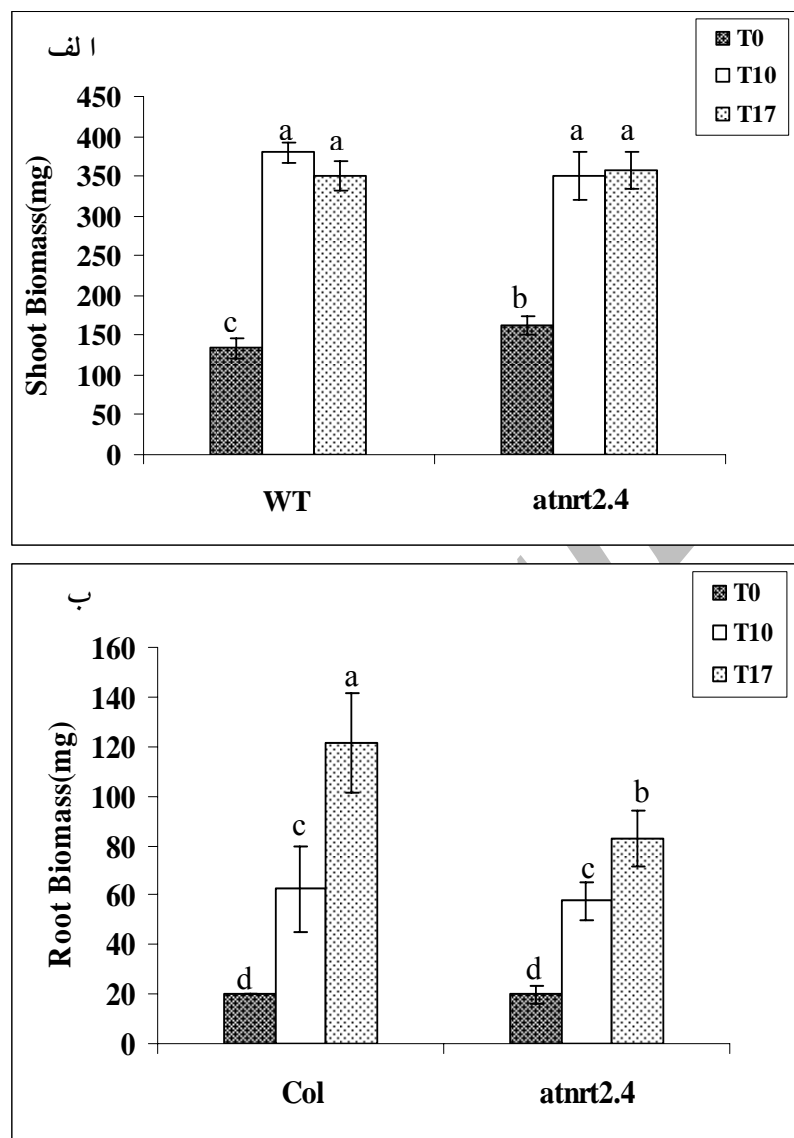
مرکز ورسای واقع در کشور فرانسه تأمین شدند. جهت بررسی اثر اختلال در بیان ژن *AtNRT2.4* بر روی شاخصهای رشدی، فیزیولوژیکی و مولکولی از گیاهان *Arabidopsis thaliana* اکوتیپ Columbia (تیپ وحشی و جهش یافته *atnrt2.4*) استفاده گردید. جهش یافته *atnrt2.4* دارای یک T-DNA insertion در آخرین اگزون مربوط به این ژن می باشد (مکاتبه شخصی با-F. Daniel Vedele). بذرهای متعلق به جهش یافته *atnrt2.4* به همراه تیپ وحشی بعد از ۲ روز سرمادهی در دمای ۴ درجه سانتی گراد، بر روی شن در اتاقک رشد با رژیم نوری ۸ ساعت روشنایی / ۱۶ ساعت تاریکی، دمای ۲۱ درجه سانتی گراد در روشنایی / ۱۷ درجه سانتی گراد در تاریکی، شدت نور ۱۷۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و رطوبت ۷۵ درصد کشت گردیدند. همه گیاهان هر هفته سه مرتبه با محلول غذایی کامل (۱۷) شامل ۱۰ میلی مولار نیترات کلسیم و پتاسیم آبیاری شدند. پس از ۳۵ روز کشت، بخشی از گیاهان به منظور برداشت در زمان صفر (T0) جمع آوری و باقی گیاهان با محلول غذایی کامل اما فاقد نیتروژن سه بار در هفته تا موقع برداشتهای بعدی آبیاری شدند. جمع آوری گیاهان در برداشت T10، ده روز بعد از ایجاد شرایط محرومیت نیتروژن و برداشت T17، هفده روز بعد از ایجاد شرایط محرومیت نیتروژن انجام گرفت. در هر نوبت جمع آوری، ابتدا بخش هوایی و ریشه از محل طوقه قطع و سپس وزن تر هر بخش به طور جداگانه تعیین شد و بلافاصله نمونه‌ها به نیتروژن مایع منتقل و از بافتهای فریز شده پودرتر تهیه گردید تا در اندازه گیری نیترات، اسید آمینه کل، درصد نیتروژن کل و آنالیز کمی بیان ژن مورد استفاده قرار گیرد. کلیه آزمایشها در ۴ تکرار و مقایسه میانگینها از طریق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

ژنهای *AtNRT2.4* و *AtNRT2.5* در جهش یافته دوگانه *atnrt2a* افزایش می یابد بدون آنکه تأثیری در فعالیت HATS داشته باشد (۱۷).

در حال حاضر، یکی از مباحث مهم در کشاورزی نوین افزایش تولیدات گیاهی و میزان پروتئینهای بذری با به حداقل رساندن استفاده از کودهای نیتروژنی می باشد که عمدتاً توأم با فشارهای اقتصادی و اکولوژیکی فراوانی هستند. بنابراین به نظر می رسد که مدیریت کارایی استفاده از نیتروژن بتواند برای رسیدن به این هدف مشارکت مهمی داشته باشد. برای نیل به این مهم، تحقیقات بیشتری باید بر روی مسیر تثبیت نیترات از جذب نیترات تا سنتز پروتئین انجام گردد. با توجه به پیچیدگی فرآیند جذب نیترات به علت حضور خانواده‌های چند ژنی کد کننده ناقصین نیترات و نیز وجود عوامل کنترل کننده مختلف در بیان و عملکرد این ناقصین، همواره سئوالات زیادی در رابطه با نقش هر یک از ژنهای موجود در خانواده *NRT2* و نحوه کنترل آنها مطرح بوده است. بررسی گیاهان تراریخت و یا جهش دار از این ژنها تا حدود زیادی می تواند پاسخگوی این سئوالات باشد. مطالعات مقایسه‌ای گیاهان جهش یافته و یا تراریخت با گیاهان تیپ وحشی می تواند در درک بهتر و کسب بینش بیشتر در رابطه با نقش هر یک از اعضای خانواده ژنی *NRT2* در جذب نیترات به واسطه HATS در گیاهان عالی نقش مهمی ایفاء نماید. در این تحقیق، به منظور درک بهتر نقش ناقل *AtNRT2.4*، از گیاه *Arabidopsis* جهش یافته در ژن *AtNRT2.4* استفاده شد تا اثر فیزیولوژیکی و مولکولی ناشی از اختلال در بیان این ژن بر روی متابولیسم نیتروژن، رشد گیاه و بیان ژنهای *AtNRT2.1* و *AtNRT2.4* مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روشها

**مواد گیاهی و شرایط رشد:** کلیه بذرهای مورد استفاده در این تحقیق از بانک بذر مرکز تحقیقات کشاورزی INRA،



شکل ۱- تأثیر محدودیت نیتروژن بر بیوماس (الف) ساقه، (ب) ریشه گیاه *A. thaliana* جهش یافته *atnrt2.4* در قیاس با شاهد (WT) در سه زمان برداشت T0، T10 و T17. کلیه گیاهان بر روی شن کشت و به مدت ۳۵ روز با محلول غذایی کامل حاوی ۱۰ میلی مولار نیترات تغذیه شدند. بعد از آن برخی از گیاهان به عنوان برداشت T0 جمع آوری گردید و بلافاصله شرایط محرومیت نیتروژن برای باقی مانده گیاهان برقرار شد. در زمانهای ۱۰ و ۱۷ روز بعد از برقراری شرایط محرومیت نیتروژن باقی مانده گیاهان به ترتیب تحت عنوان برداشت T10 و T17 جمع آوری و وزن تر ساقه و ریشه محاسبه شد. مقادیر بیانگر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SD می باشد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی دار می باشد.

MF) قرائت و میزان نیترات موجود در نمونه گیاهی به صورت نانومول بر میلی گرم وزن تر ریشه یا ساقه محاسبه شد.

آنالیز میزان نیترات بافتی: برای اندازه گیری میزان نیترات از روش Miranda و همکاران (۲۰۰۱) در طول موج ۵۴۰ نانومتر استفاده شد (۱۵). میزان جذب نمونه ها در دستگاه Microplate reader (مدل Labsystems iEMS Reader

*AtNRT2.1* Forward primer: 5' AGT CGC TTG CAC GTT ACC TG 3'

*AtNRT2.1* Reverse primer: 5' ACC CTC TGA CTT GGC GTT CTC 3'

*AtNRT2.4* Forward primer: 5' CCG TCT TCT CCA TGT CTT TC 3'

*AtNRT2.4* Reverse primer: 5' CTG ACC ATT GAA CAT TGT GC 3'

میزان بیان هر یک از ژنهای ذکر شده نسبت به سطح بیان ژن *AtEF1αA4* (ژن مرجع) محاسبه شد.

آغازگرهای مورد اشاره برای این ژن  
Forward primer: 5'CTG GAG GTT TTG AGG CTG GTA T 3'  
Reverse primer: 5'CCA AGG GTG AAA GCA و  
AGA AGA 3' بودند.

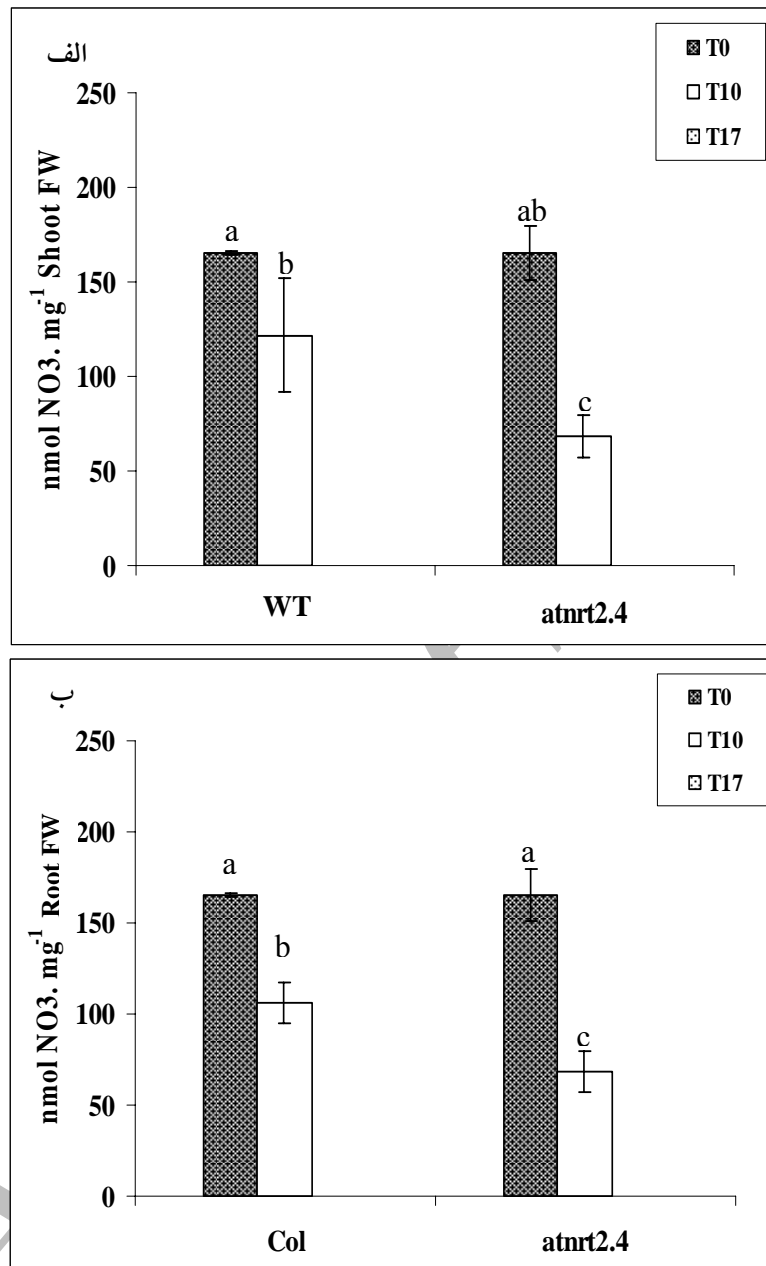
## نتایج

بررسی بیوماس گیاه: همان طور که در شکل ۱-الف مشاهده می گردد علی رغم برقراری شرایط محرومیت نیتروژن در زمان T10، بیوماس بخشهای هوایی گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی نسبت به برداشت T0 از خود افزایش معنی داری نشان می دهد در حالی که رشد ساقه برای هر دو ژنوتیپ در زمان T10 متوقف می گردد به گونه ای که این شاخص در برداشت T17 تفاوت معنی داری با برداشت T10 ندارد. همچنین این شاخص تفاوت معنی داری را بین گیاهان جهش دار *atnrt2.4* با تیپ وحشی در سه زمان برداشت نشان نمی دهد. در عین حال همان طور که در شکل ۱-ب ملاحظه می گردد به طور کلی با برقراری و تداوم شرایط محرومیت نیتروژن بیوماس ریشه ها برای گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی از خود افزایش معنی داری را در برداشتهای T10 و T17 نشان می دهد. در برداشتهای T0 و T10 اختلافی بین این ژنوتیپها به لحاظ بیوماس ریشه ها دیده نمی شود. با این وجود، جهش یافته *atnrt2.4* یک کاهش معنی داری را در بیوماس ریشه نسبت به تیپ وحشی در برداشت T17 نشان می دهد.

آنالیز کمی اسید آمینه کل: بدین منظور در حدود ۳۰ تا ۵۰ میلی گرم از پودر تر گیاهی در شرایط کاملاً سرد وزن و طی چهار مرحله با اتانل-آب عصاره گیری گردید (۱۷). برای اندازه گیری میزان اسید آمینه کل در بافتهای تر ریشه ای و برگ از روش Rosen (۱۹۵۷) استفاده (۲۱) و میزان جذب نمونه ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه Microplate reader (مدل Labsystems iEMS Reader MF) قرائت گردید. میزان اسید آمینه کل برای هر نمونه به صورت نانومول بر میلی گرم بافت تر ریشه یا ساقه محاسبه شد.

اندازه گیری درصد نیتروژن کل: بدین منظور مقداری از پودر تر گیاهی در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. سپس درصد نیتروژن موجود در ۵ تا ۷ میلی گرم از بافت خشک شده بر اساس روش Dumas (۱۰) و با استفاده از دستگاه Fisons Thermoquest, Runcorn, (مدل NA 1700 CN Analyzer Cheshire, UK) تعیین شد.

آنالیز کمی بیان ژن با استفاده از تکنیک **Real-Time PCR** برای استخراج RNA کل، از معرف تریزول (Trizol reagent Invitrogen cat n° 17596-026) و روش به کار رفته توسط Chomczynski و Sacchi (۱۹۸۷) استفاده گردید (۴). بعد از اطمینان از حضور RNA کافی در نمونه ها، جهت بررسی میزان بیان ژنهای *AtNRT2.1* و *AtNRT2.4*، ساخت cDNA از RNA طی واکنش رونویسی معکوس همراه با آغازگرهای الیگو dT، آنزیم M-MLV reverse transcriptase (Gibco-BRL) و طبق روش استفاده شده توسط Daniel-Vedele و Caboche (۱۹۹۳) انجام گردید (۹). برای آنالیز کمی بیان ژن از کیت Real Master Mix Eppendorf SYBR Rox 2.5X-200 Rxns Mastercycler-ep (Eppendorf-realplex) استفاده شد. از مجموعه آغازگرهای زیر برای تکثیر بخشی از ژنهای *AtNRT2.1* و *AtNRT2.4* به ترتیب به طول ۱۸۹bp و ۳۶۰bp استفاده گردید:



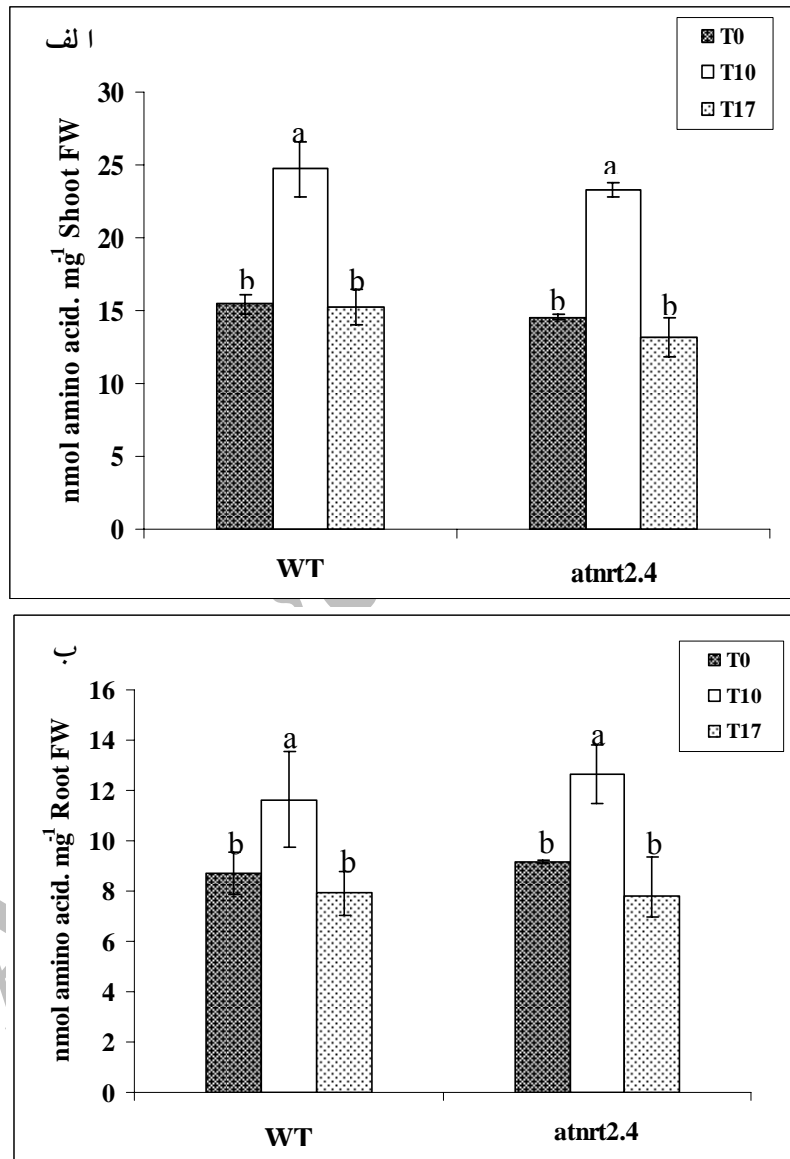
شکل ۲- تأثیر محدودیت نیتروژن بر میزان نیترات الف) ساقه، ب) ریشه گیاه *A. thaliana* جهش یافته *atnrt2.4* در قیاس با شاهد (WT) در سه زمان برداشت T0، T10 و T17. به علت کاهش شدید نیترات درون بافتی در برداشت T17 مقادیر در شکل مشخص نمی باشد. شرایط رشدی مشابه شرایط ذکر شده در شکل ۱ می باشد. مقادیر بیانگر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SD می باشد. مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی دار می باشد.

محرومیت نیتروژن (T10)، این شاخص در هر دو ژنوتیپ کاهش قابل توجهی را نسبت به برداشت T0 از خود نشان می دهد و این کاهش در برداشت T17 به حداقل میزان خود و نزدیک به صفر می رسد به طوری که مقادیر در

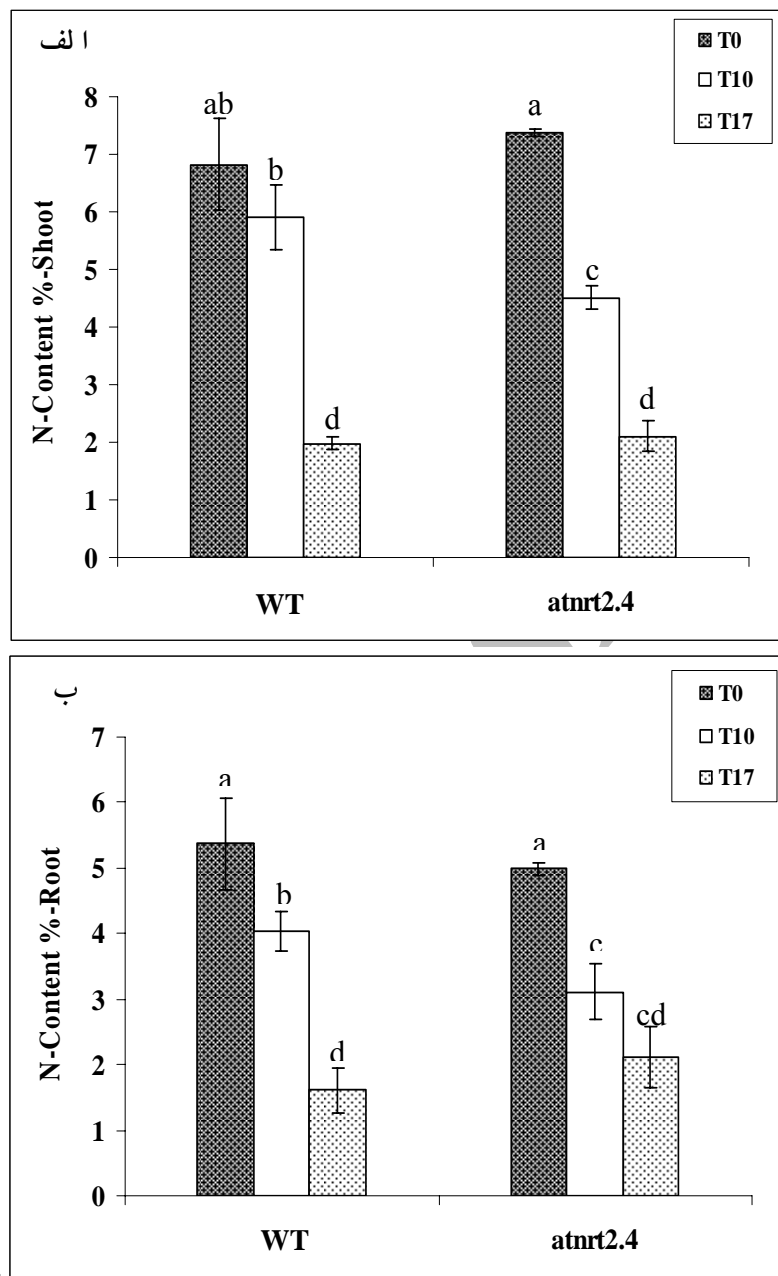
میزان نیترات بخش هوایی و ریشه: همان طور که در شکل ۲-الف مشاهده می شود تفاوتی در میزان نیترات بخش هوایی بین گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی در برداشت T0 وجود ندارد اما ۱۰ روز پس از ایجاد

T17 به شدت کاهش می یابد و تقریباً نزدیک به صفر می رسد. در برداشت T10 تجمع نیترات در ریشه گیاهان جهش یافته *atnrt2.4* کمتر از تیپ وحشی در این زمان می باشد.

شکل-۳ مشخص نمی باشد. همچنین میزان نیترات ساقه در زمان T10، در جهش یافته *atnrt2.4* کاهش معنی داری نسبت به تیپ وحشی می یابد. همان طور که در شکل ۲-ب ملاحظه می گردد، مقدار نیترات موجود در ریشه گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی در برداشتهای T10 و



شکل ۳- تأثیر محدودیت نیتروژن بر میزان اسیدآمینو کل الف) ساقه، ب) ریشه گیاه *A. thaliana* جهش یافته *atnrt2.4* در قیاس با شاهد (WT) در سه زمان برداشت T0، T10 و T17. شرایط رشدی مشابه شرایط ذکر شده در شکل ۱ می باشد. مقادیر بیانگر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SD می باشد. مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی دار می باشد.

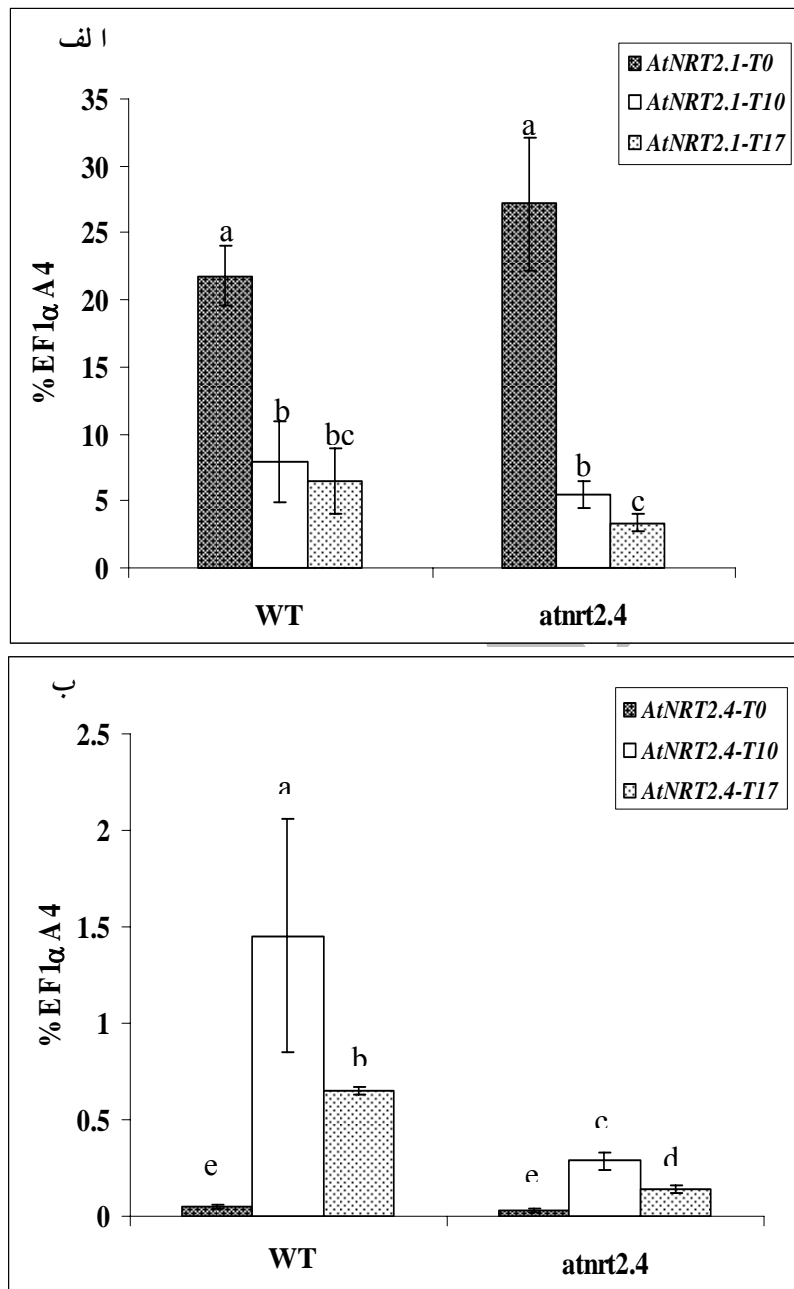


شکل ۴- تأثیر محدودیت نیتروژن بر میزان نیتروژن کل الف) ساقه، ب) ریشه گیاه *A. thaliana* جهش یافته *atnrt2.4* در قیاس با شاهد (WT) در سه زمان برداشت T0، T10 و T17. شرایط رشدی مشابه شرایط ذکر شده در شکل ۱ می باشد. مقادیر بیانگر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SD می باشد. مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی داز می باشد.

میزان اسید آمینه کل در ریشه گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی یک افزایش معنی داری در ۱۰ روز پس از برقراری شرایط محرومیت نیتروژن نشان می دهد که با کاهش در برداشت T17 مواجه می گردد. میزان این شاخص تفاوتی را بین این دو ژنوتیپ در سه زمان مختلف برداشت نشان نمی دهد.

میزان اسید آمینه کل: بر اساس شکل ۳-الف، گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی یک کاهش در میزان اسید آمینه کل در برداشت T17 به دنبال افزایش در میزان این شاخص در برداشت T10 را نشان می دهند. اختلاف معنی داری بین این دو ژنوتیپ در برداشتهای مختلف از این لحاظ مشاهده نمی گردد. در حالی که بر اساس شکل ۳-ب،





شکل ۵- میزان بیان نسبی ژن الف (*AtNRT2.1*) ب (*AtNRT2.4*) در گیاه *A. thaliana* جهش یافته *atnrt2.4* در قیاس با شاهد (WT) در سه زمان برداشت T0، T10 و T17. مقادیر بیانگر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SD می باشد. مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی دار می باشد.

اشاره در زمان T0 و T17 مشاهده نمی گردد. مطابق با شکل ۴-ب، میزان نیتروژن کل در بافتهای ریشه ای گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی با تداوم شرایط محرومیت نیتروژن یک الگوی کاهشی را دنبال می کند. این شاخص در جهش یافته *atnrt2.4* نسبت به تیپ وحشی در برداشت T10 کاهش معنی داری می یابد. با این وجود اختلاف

میزان نیتروژن کل: همان طور که در شکل ۴-الف مشاهده می شود، با تداوم محرومیت نیتروژن، میزان نیتروژن کل در بخشهای هوایی گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی کاهش می یابد. این شاخص کاهش معنی داری برای جهش یافته *atnrt2.4* نسبت به تیپ وحشی در برداشت T10 نشان می دهد. با این وجود تفاوت معنی داری بین ژنوتیپهای مورد

بذرهای خشک و در نتیجه تسهیل در جوانه زنی آنها بسیار مهم و ضروری است (۵). در رابطه با نقش و عملکرد سایر اعضای خانواده ژنی *AtNRT2* اطلاعاتی وجود ندارد.

عدم حضور یک ژن می‌تواند توسط ژنهای دیگر موجود در یک خانواده ژنی جبران شود و این ممکن است باعث بروز انعطاف پذیری فنوتیپی در گیاهان در پاسخ به شرایط مختلف محیطی گردد که این امر تعیین نقش دقیق آن ژنها را با اشکال مواجه می‌سازد (۱۷). برخی مطالعات اولیه نشان می‌دهند که بیان ژنهای *AtNRT2.4* و *AtNRT2.5* در جهش یافته *atnrt2a* تحت شرایط محدودیت نیتروژن در مقایسه با تیپ وحشی تشدید می‌شود اما ورود نیترات از طریق HATS را افزایش نمی‌دهد (۱۷). همچنین تحقیقات دیگری در شرایط آب کشتی بیانگر آن است که بیان ژنهای فوق به دنبال اعمال محرومیت طولانی مدت نیتروژن افزایش می‌یابد و هر دو ژن از الگوی بیان مشابهی تبعیت می‌نمایند (مکاتبه شخصی با M. Orsel). بنابراین به نظر می‌رسد که ژنهای خانواده *NRT2* دارای نقش متمایز و متفاوتی نسبت به یکدیگر باشند. با توجه به این نتایج اولیه، ابهاماتی در رابطه با نقش و عملکرد ژن *AtNRT2.4* در گیاهان عالی وجود دارد که آیا این ژنها در جذب مستقیم غلظتهای پایین نیترات از محیط به واسطه HATS مشارکت دارند یا خیر؟ بنابراین، یک مطالعه مقدماتی با هدف درک نقش ژن *AtNRT2.4* در گیاهان ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از گیاهان جهش یافته یا تراریخت در این ژن و مقایسه این گیاهان با تیپ وحشی از لحاظ رشد و متابولیسم می‌تواند در درک بهتر و به دست آوردن بینش وسیع‌تر در رابطه با نقش ژن فوق مؤثر باشد.

در گیاهان، ارتباط معکوس و معنی‌داری بین میزان نیترات موجود در بخشهای هوایی با رشد ریشه‌ها گزارش شده است (۲۳). بنابراین به نظر می‌رسد با برقراری و تداوم شرایط محرومیت نیتروژن و کاهش میزان نیترات موجود در بخش هوایی گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی

معنی‌داری بین گیاهان جهش یافته با تیپ وحشی در برداشتهای T0 و T17 از لحاظ این شاخص مشاهده نمی‌شود.

**بررسی کمی بیان ژنهای *AtNRT2.1* و *AtNRT2.4*:** با وجود انجام آنالیزهای کمی و کیفی، واکنش رونویس معکوس (RT) و تکثیر cDNA تولیدی برای همه نمونه‌های مرتبط با ساقه یا ریشه به علت آنکه بیان ژنهای خانواده *NRT2* در ریشه‌ها (به استثنای ژن *AtNRT2.7*) بسیار بیشتر از بخشهای هوایی گزارش شده است (۱۸)، بنابراین تنها نمونه‌های مربوط به ریشه جهت آنالیز کمی بیان ژن با کمک روش Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

با بررسی میزان بیان ژن *AtNRT2.1* در ریشه گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی مشخص شد که مطابق با شکل ۵-الف، بیان ژن *AtNRT2.1* کاهش معنی‌داری را در هر دو ژنوتیپ در برداشتهای T10 و T17 نسبت به زمان T0 نشان می‌دهد. این در حالی است که بیان ژن *AtNRT2.4* یک افزایش معنی‌داری را در تیپ وحشی در برداشت T10 نشان می‌دهد (شکل ۵-ب) ولی در جهش یافته *atnrt2.4* بیان این ژن بسیار ناچیز است. اگرچه بیان ژن *AtNRT2.4* در برداشت T17 در ژنوتیپ وحشی کاهش می‌یابد اما همچنان نسبت به برداشت T0 افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

## بحث

جهش یافته *atnrt2a* اولین جهش یافته جدا شده از خانواده ژنی *AtNRT2* در گیاهان عالی است (۱۲) که کاهش جذب نیترات به واسطه HATS در آن نشان داد که ژن *AtNRT2.1* به همراه ژن *AtNRT2.2* نقش مهمی را در جذب نیترات از طریق iHATS ایفاء می‌نماید (۳). علاوه بر این برخی مطالعاتی که اخیراً انجام شده است بیانگر آن است که احتمالاً ژن *AtNRT2.7* در تجمع نیترات در

یافته و تیپ وحشی در زمان T10 تایید کننده این موضوع می‌باشد. به نظر می‌رسد کاهش سطح نیترات و افزایش میزان اسیدآمین‌ها می‌تواند به عنوان اولین مرحله از پاسخ گیاه به شرایط محرومیت نیتروژن محسوب گردد که به عنوان یک سیگنال، رشد بخشهای هوایی را در برداشت T10 متوقف و رشد ریشه‌ها را تحریک می‌کند. همچنین نتایج حاصل از ارزیابی کمی بیان ژن *AtNRT2.4* (شکل ۵-۵) (ب) نشان می‌دهد که با کاهش مخازن نیترات سلولی بیان ژن فوق‌تشدید می‌گردد. با این وجود مطالعات مربوط به جذب  $^{15}\text{NO}_3$  در گیاهان جهش یافته *atnrt2a* تراریخت شده با ژن *AtNRT2.4* باعث احیاء جذب نیترات به واسطه HATS در این گیاهان نگردیده است (نتایج نشان داده نشده است). بنابراین، با توجه عدم مشارکت مستقیم ژن *AtNRT2.4* در جذب نیترات از محیط و با توجه به کاهش سطح نیترات آزاد در بافتهای بخش هوایی و ریشه‌ای جهش یافته *atnrt2.4* در مقایسه با تیپ وحشی به نظر می‌رسد که این ژن تحت شرایط محرومیت نیتروژن، در انتقال نیترات از مخازن ذخیره‌ای (واکوئله‌ها) به سیتوپلاسم نقش مهمی را ایفاء می‌نماید. تعیین جایگاه زیر سلولی پروتئینهای حاصل از بیان این ژن با استفاده از Green Fluorescent Protein (GFP) می‌تواند در تأیید یا رد این فرضیه حائز اهمیت باشد. بر اساس فرضیه ذکر شده، آنچه که قابل انتظار است آن است که حضور نیترات در محیط باید بیان ژن *AtNRT2.4* را کاهش دهد که نتایج این تحقیق در شرایط غنی از نیترات (برداشت T0) بیانگر کاهش بیان این ژن (شکل ۵-۵) و افزایش بیان ژن *AtNRT2.1* (شکل ۵-۵) می‌باشد. این نتایج با مطالعات انجام شده توسط Okamoto و همکارانش (۲۰۰۳) در تضاد است (۱۶). آنها نشان دادند که ژن *AtNRT2.4* یک ژن القایی توسط نیترات می‌باشد، در حالی که نتایج حاصل از تحقیق کنونی بیانگر آن است که بیان این ژن در نبود نیترات تحریک و در حضور آن ممانعت می‌گردد. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق تصور می‌شود که

(شکل ۲-الف) رشد ریشه‌ها افزایش می‌یابد (شکل ۱-ب) تا قابلیت دسترسی به نیتروژن را در محیط افزایش دهد در حالی که منجر به توقف رشد ساقه‌ها می‌گردد (شکل ۲-الف). همچنین تحت شرایط محدودیت نیتروژن، بخشهای هوایی هر دو ژنوتیپ میزان نیترات بیشتری (شکل ۲-الف) در قیاس با ریشه‌ها (شکل ۲-ب) از خود نشان می‌دهند. بنابراین تصور می‌شود که در شرایط محرومیت نیتروژن، ریشه‌ها با هزینه نیترات بخشهای هوایی به رشد خود ادامه می‌دهند. این فرضیه در گزارش ارائه شده توسط Reynolds و D'Antonio (۱۹۹۶) نیز تأیید شده است (۲۰). علی‌رغم تجمع نیترات کمتر در بافتهای برگ‌ی جهش یافته *atnrt2.4* نسبت به تیپ وحشی در برداشتهای T10 و T17 (شکل ۲-الف)، با این وجود اختلاف معنی‌داری در بیوماس بخش هوایی بین جهش یافته *atnrt2.4* با تیپ وحشی مشاهده نمی‌گردد (شکل ۱-الف). اما حضور نیترات کمتر در ریشه گیاه جهش یافته (شکل ۲-ب)، با کاهش رشد ریشه‌ها برای جهش یافته *atnrt2.4* نسبت به تیپ وحشی در برداشت T17 همراه می‌شود (شکل ۱-ب). در رابطه با کنترل سطح نیترات آزاد سیتوزولی در گیاهان سه مسیر مجزا پیشنهاد شده است (۶): الف- خروج نیترات به درون آپوپلاسم ب- احیای نیترات به نیتريت در داخل سیتوزول ج- ذخیره نیترات در داخل واکوئله‌ها. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، سطح اسید آمینه‌های کل در بافتهای هوایی و ریشه‌ای گیاهان جهش یافته و تیپ وحشی در زمان T10 یک افزایش ناگهانی نشان می‌دهد. تصور می‌شود که به دنبال برقراری شرایط محدودیت نیتروژن و کاهش سطح نیترات بافتی، بخش مهمی از نیترات انتقال یافته به بخشهای هوایی در واکوئله‌ها ذخیره نمی‌شود بلکه وارد مسیر سنتز اسیدهای آمینه می‌گردد تا از یک طرف باعث حفظ رشد ساقه‌ها و از طرف دیگر افزایش رشد ریشه‌ها در چنین شرایطی شود. افزایش میزان اسیدآمینه‌های کل در بافتهای برگ‌ی (شکل ۳-الف) و ریشه‌ای (شکل ۳-ب) ژنوتیپهای متعلق به گیاهان جهش

نظر می رسد که ژن *AtNRT2.4* نقش مهمی را در مسیر انتقال علائم ناشی از کمبود نیتروژن ایفاء می کند، ضمن اینکه با توجه به کاهش سطح نیترات آزاد سلولی در جهش یافته *atnrt2.4* در مقایسه با تیپ وحشی در برداشت T10، تصور می گردد که ژن مذکور در انتقال نیترات از واکوئل به سیتوپلاسم تحت شرایط محرومیت نیتروژن نقش مهمی ایفاء نماید.

۱۰ روز محرومیت نیتروژن می تواند به عنوان یک نقطه بحرانی برای القای مسیر انتقال علائم ناشی از کمبود نیترات در *Arabidopsis* مطرح باشد زیرا شاخصهای مربوط به متابولیسم نیتروژن نظیر میزان نیترات، میزان اسیدآمینو کل و درصد نیتروژن کل و همچنین بیان ژنهای *AtNRT2.1* و *AtNRT2.4* تغییرات مهم و معنی داری را در این زمان نشان می دهند. همچنین با تکیه بر این نتایج به

## منابع

- Amarasinghe, B. H., de Bruxelles, G. L., Braddon, M., Onyeocha, I., Forde, B. G. and Udvardi, M. K. (1998). Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in the roots soybean (*Glycine max*). *Planta* 206, 44-52.
- Aslam, M., Travis, R. L. and Huffaker, R. C. (1992). Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrate uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 99, 1124-1173.
- Cerezo, M., Tillard, P., Filleur, S., Munos, S., Daniel-Vedele, F. and Gojon, A. (2001). Major alterations of the regulation of root  $\text{NO}_3^-$  uptake are associated with the mutation of *NRT2.1* and *NRT2.2* genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 262-271.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-161
- Chopin, F., Orsel, M., Dorbe, M. F., Chardon, F., Truong, H. N., Miller, A., Krapp, A. and Daniel-Vedele, F. (2007a). The *Arabidopsis AtNRT2.7* nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* 19, 1790-1702.
- Chopin, F., Wirth, J., Dorbe, M. F., Lejay, L., Krapp, A., Gojon, A. and Daniel-Vedele, F. (2007b). The *Arabidopsis* nitrate transporter *AtNRT2.1* is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 630-635.
- Crawford, N. M. (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7, 859-868.
- Crawford, N. M., and Glass, A. D. M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 3, 389-395.
- Daniel-Vedele, F. and Caboche, M. (1993). A tobacco cDNA clone encoding a GATA-1 zinc finger protein homologous to regulators of nitrogen metabolism in fungi. *Mol. Gen. Genet.* 240, 365-373
- Dumas, J. B. A. (1831). Procédes de l'analyse organique. *Ann. Chem. Phys.* 198, 213-302
- Filleur, S. and Daniel-Vedele, F. (1999). Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* 207, 461-469.
- Filleur, S., Dorbe, M. F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A. and Daniel-Vedele, F. (2001). An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *NRT2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett.* 489, 220-224.
- Forde, B. G. and Clarkson, D. T. (1999). Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. *Adv. Bot. Res.* 30, 1-90.
- Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N. M., Siddiqi, M. Y. and Glass, A. D. M. (2007). Dissection of the *AtNRT2.1: AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol.* 173, 425-433.
- Miranda, K. M. Espay, M. G. and Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62-71.
- Okamoto, M., Vidmar, J. J. and Glass, A. D. M. (2003). Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol.* 44, 304-317.
- Orsel, M., Eulenburg, K., Krapp, A. and Daniel-Vedele, F. (2004). Disruption nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* 219, 717-721.

18. Quesada, A., Galvan, A. and Fernandez, E. (1994). Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 5, 407-419.
19. Quesada, A., Krapp, A., Trueman, L. J., Daniel-Vedele, F., Fernandez, E., Forde, B. G. and Caboche, M. (1997). PCR-identification of *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologues of the high-affinity nitrate transporters of the crnA family. *Plant Mol. Biol.* 34, 265-274.
20. Reynolds, H. L. and D'antonio, C. (1996). The ecological significance of plasticity in root weight ration in response to nitrogen. *Plant Soil* 185, 75-97.
21. Rosen, H. (1975). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch Biochem. Biophys.* 67, 10-15
22. Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J. and Rufty, T. (1990). Studies of the uptake of nitrate in barley: I. Kinetics of  $^{13}\text{NO}_3$  influx. *Plant Physiol.* 93, 1726-1732.
23. Scheible, W. R., Lauerer, M., Schulze, E. D., Caboche, M. and Stitt, M. (1997). Accumulation of nitrate in the shoots acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J.* 11, 671-691.
24. Trueman, L. J., Richardson, A. and Forde, B. G. (1996). Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene* 175, 223-231.
25. Unkles, S. E., Hawker, K. L., Grieve, C., Campbell, E. I., Montague, P. and Kinghorn, J. R. (1991). *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 204-208.
26. Vidmar, J. J., Zhou, D., Siddiqi, M., Glass, A. D. M. (2000a). Isolation and characterization of *HvNRT2.3* and *HvNRT2.4* cDNA encoding high-affinity nitrate transporters from roots of barley. *Plant Physiol.* 122, 783-792.
27. Yin, L. P., Li, P., Wen, B., Taylor, D. and Berry, J. O. (2007). Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (*TaNRT2.1*) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other *NRT2* genes. *Plant Sci.* 172, 621-631.
28. Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J. J. and Glass, A. D. M. (1999). Regulation of putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2:1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17, 563-568.

## Physiological and molecular responses of *NRT2.4* transporter under N-starvation conditions in *Arabidopsis thaliana*

Zoufan P.<sup>1,2</sup>, Shariati M.<sup>1\*</sup>, and Daniel-Vedele F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of IRAN

<sup>2</sup> Biology Dept., Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R. of IRAN

<sup>3</sup> Unite de la Nutrition Azotee des Plantes, INRA, Route de St. Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

### Abstract

Nitrate is one of the most important inorganic nitrogen sources for many plants. Many physiological investigations have led to the conclusion that plants have developed at least two nitrate uptake systems including low- and high-affinity transporter systems to cope with large variations in nitrate concentrations in soils. Molecular studies revealed gene family of *NRT2* encode nitrate transporters involved in high-affinity transport systems (HATS). Based on strong correlation between *NRT2.1* expression and HATS activity in *Arabidopsis thaliana* has been proposed *AtNRT2.1* has a key role in nitrate uptake by HATS. Among the other *AtNRT2* genes, *AtNRT2.4* and *AtNRT2.5* genes have been followed similar expression pattern but their function remains to be revealed. For better understanding of the role of *AtNRT2.4* gene in nitrate uptake, *A. thaliana* wild type genotype and T-DNA mutant affected in the expression of this gene were cultivated on the sand with complete nutrient solution containing 10 mM nitrate for 35 days. Plants were subsequently starved for nitrogen and harvested 0, 10 and 17 days after N-starvation. The effect of *AtNRT2.4* gene deregulation on biomass, nitrate and amino acid content and the expression of *AtNRT2.1* and *AtNRT2* genes was studied. For each two genotypes, shoot/root ratio and nitrate content displayed a decreasing pattern with N- starvation time. These conditions reduced plant total N%. Quantity of total amino acids showed a drastically increased level 10 days after N-starvation. Quantitative PCR analysis illustrated that starved N-conditions up-regulate the expression of *AtNRT2.4* gene, while, down-regulate the expression of *AtNRT2.1* gene. Results showed that apparently, 10 days N-starvation should be critical point to induce nitrate deficiency signaling pathways. Moreover, it seems that *AtNRT2.4* gene has important role in this signal pathway.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *AtNRT2.4* gene, nitrate, total amino acid, total nitrogen