

## بررسی چگونگی بیان ژن های $\alpha-DOX_1$ و $\alpha-DOX_2$ در ریشه سه نژادگان گوجه فرنگی پس از تنش های مختلف<sup>۱</sup>

### STUDY OF $\alpha-DOX_1$ AND $\alpha-DOX_2$ GENES EXPRESSION FOLLOWING SOME STRESSES IN ROOTS OF THREE TOMATO GENOTYPES

اشکبوس دهداری<sup>۲</sup>

#### چکیده

در این پژوهش طی چند آزمایش در شرایط کنترل شده خاک و آبکشت تاثیر تنش های مختلف از جمله خشکی و شوری بر بیان ژن های آلفا-دی اکسیژناز ( $\alpha-DOX_1$  و  $\alpha-DOX_2$ ) در ریشه گوجه فرنگی بررسی شد. برای تعیین نقش اِپسایزیک اسید و اتیلن در چگونگی بیان این ژن ها از دو جهش یافته گوجه فرنگی به نام های Flacca (Flc)، جهش یافته اسید اِپسایزیک، (Never ripe (Nr)، جهش یافته اتیلن) و نوع طبیعی آن ها Ailsa Criag (AC) استفاده شد. پس از تنش ها ریشه بوته ها برداشت شده و به سرعت با نیتروژن مایع منجمد و نگهداری شدند. سپس RNA آن ها استخراج و با روش لکه گذاری RNA، دورگ گیری با انواع  $\alpha-DOX$  های نشاندار انجام شد. نتایج نشان داد که  $\alpha-DOX_2$  در اثر هیچ کدام از تنش ها در محیط خاک یا آبکشت بیان نشد. در گلخانه و در محیط خاک در ریشه های Flc ژن  $\alpha-DOX_1$  به وسیله تیمارهای کلرید سدیم ۱۷۰ میلی مولار (به مدت ۲۴ ساعت) و خشکی (به مدت ۳۶ ساعت) افزایش بیان ژن<sup>۳</sup> نشان داد. چگونگی بیان در AC مشابه Flc بود با این تفاوت که میزان بیان کمتر بود. در ریشه های Nr افزایش بیان ژن تنها به وسیله تیمار شوری رخ داد. در بوته های مسن با تیمار غلظت های مختلف نمک (۰، ۱۰۰، ۱۷۰ و ۳۰۰ میلی مولار)  $\alpha-DOX_1$  تنها در ریشه های Flc و در سطح ۱۷۰ میلی مولار بیان شد و در پایان با تیمار شوری ۲۵۰ میلی مولار بر بوته های شش هفته ای در مدت های مختلف (۶ ساعت، ۱، ۳ و ۶ روز) افزایش بیان ژن در AC پس از تیمار یک روزه دیده شد. در Flc افزون بر تیمار یک روزه در تیمار شش ساعته نیز افزایش بیان ژن آشکار شد. نتایج به دست آمده از آزمایش های گلخانه ای نشان داد که بیان  $\alpha-DOX_1$  در مراحل مختلف رشد متفاوت است که به احتمال به دلیل تغییر در میزان اتیلن می باشد. در شرایط آبکشت افزایش بیان ژن  $\alpha-DOX_1$  در ریشه های Flc در اثر تیمارهای ۱ و ۵ میلی مولار  $H_2O_2$  به مدت ۲۴ ساعت به دست آمد ولی، این روند در AC تنها در سطح ۵ میلی مولار بود. در آخرین آزمایش در شرایط آبکشت  $\alpha-DOX_1$  در اثر تیمارهای زخم و شوری (به مدت ۶ و ۲۴ ساعت) و سطوح ۱ و ۵ میلی مولار  $H_2O_2$  (به مدت ۲۴ ساعت) افزایش بیان ژن دیده شد. در تمام آزمایش های یاد شده چگونگی بیان شکل کوتاه شده  $\alpha-DOX_1$  یعنی  $\alpha-DOX_15'$  همانند  $\alpha-DOX_1$  بود ولی، میزان بیان آن کمتر و گاهی ناچیز بود. در مجموع این آزمایش نقش کلیدی  $\alpha-DOX_1$  را در محافظت بوته های گوجه در برابر انواع تنش های اکسیداتیو تایید نمود.

**واژه های کلیدی:** آلفا-دی اکسیژناز، تنش های اکسیداتیو، تنظیم فوق شاهد، گوجه فرنگی.

## مقدمه

تولید گیاهان متحمل به انواع تنش ها از اهداف بهنژادی، زیست شناسان و فیزیولوژیست های گیاهی است. بسیاری از تنش های زنده و غیر زنده افزون بر مکانیسم های ویژه ای که سبب آسیب می شوند، تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS)<sup>۱</sup> کرده و از این راه گیاهان را به شدت تحت تاثیر خود قرار می دهند. بدیهی است تبدیل اکسیژن به آب انرژی لازم برای ساختار پیچیده موجودات عالی را فراهم می سازد. ولی اگر تبدیل به صورت ناقص انجام شود گونه های اکسیژن فعال به وجود می آیند که می توانند سبب اکسیداسیون مولکول های زنده شوند. ROS ها می توانند با DNA، پروتئین ها و چربی ها واکنش دهند (۱۹). گیاهان سیستم دفاعی پیشرفته ای برای حذف یا کاهش تولید ROS ها دارند (۳). در حالت طبیعی تولید و حذف اکسیژن در تعادل است ولی تنش های اکسیداتیو این تعادل را بر هم می زنند و سبب تولید بیش از حد ROS می شوند که به این ترتیب یاخته های گیاهی آسیب های شدیدی متحمل می شوند (۲). بیشترین تولید ROS در کلروپلاست، میتوکندری، میکوریزا و آپوپلاست می باشد (۵). ثابت شده است که تنش های زیادی سبب افزایش تولید ROS در گیاهان می شوند که می توان به خشکی، شوری، سرما، گرما، اشعه ماوراء بنفش، آلودگی های هوا مثل ازن و SO<sub>2</sub>، تنش های مکانیکی (مثل زخم)، آلودگی ناشی از بیمارگرها و نور شدید را می توان اشاره کرد (۱۳). در این میان خشکی و شوری بیشتر از سایر تنش ها مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته اند.

یکی از مشکلات نواحی خشک و نیمه خشک کمبود آب برای تولید محصول گیاهی مناسب است. خشکی در واقع تنشی چند بعدی است که آثار بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلفی روی گیاه دارد. از جمله این ها می توان به کاهش تقسیم یاخته ای، کاهش در فتوسنتز، بسته شدن روزنه و کاهش در مقدار کلروفیل اشاره کرد (۲۴، ۲۶). تغییرهای دیگری مانند کاهش مقدار پروتئین و افزایش فعالیت ریبونوکلئازی نیز در این زمینه گزارش شده است (۱۲). ۷۷ میلیون هکتار از زمین های زیر کشت در دنیا تحت تاثیر آثار سوء ناشی از شوری قرار دارند (۱۴). یکی از هدف های اساسی در تجزیه های مولکولی، سازگاری متابولیکی و فیزیولوژیکی گیاه نسبت به شوری است. این هدف منجر به شناسایی تعداد زیادی ژن پاسخ دهنده به شوری در گیاهان مختلف شده است (۲، ۶، ۱۰، ۲۵). بیان بسیاری از این ژن ها وابسته به اِپسایزیک اسید (۲، ۶، ۲۵) و برخی غیر وابسته به آن می باشد (۱۰).

در آرابیدوپسیس<sup>۲</sup>، غربالگری در شرایط شور منجر به شناسایی سه ژن حساسیت به شوری (SOS)<sup>۳</sup> به نام های SOS<sub>1</sub>، SOS<sub>2</sub> و SOS<sub>3</sub> شده است (۲۸). شی و همکاران<sup>۴</sup> (۲۳) نشان دادند که افزایش زیادی در میزان رونوشت SOS<sub>1</sub> در اثر شوری در ریشه آرابیدوپسیس رخ می دهد و تنظیم بیان آن با واسطه گری SOS<sub>2</sub> و SOS<sub>3</sub> رخ می دهد. به طور کلی این مجموعه ژنی حرکت K<sup>+</sup> و Na<sup>+</sup> به درون یاخته را تنظیم می کنند. در توتون ژن تولید کننده PIOX<sup>۵</sup> (آنزیم اکسیژناز که به وسیله بیمارگر انگیزاننده می شود)، در اثر تیمارهای مختلف از جمله آلودگی برگ ها به بیمارگر، ایجاد زخم، اسید جازموئیک و اسید سالیسیلیک بیان شده است (۹، ۲۲). در آرابیدوپسیس نیز بیان این ژن در اثر بیمارگر، سالیسیلیک اسید و برخی مواد تولید کننده ROS گزارش شده است (۱۷). ویی و همکاران<sup>۶</sup> (۲۶) با مقایسه ژنوم گوجه فرنگی در شرایط شور با شرایط غیر شور به روش دی.دی.پی<sup>۷</sup> چند cDNA مرتبط با شوری را شناسایی کردند. یکی از این cDNA ها (JWS-20) همانند ژن تولید کننده PIOX در توتون عمل می کند. PIOX آنزیمی است که لینولینیک اسید ۱۸:۳ را به 2-R-hydroperoxide

Shi et al. -۴ Salt overly sensitive -۳ Arabidopsis -۲ Reactive oxygen species -۱  
Differential display (ddp) -۷ Wei et al. -۶ Pathogen induced oxygenase gene -۵

تبدیل می کند (۸). این پروتئین به دلیل نقش آنزیمی آن به عنوان  $\alpha$ -dioxygenase یا  $\alpha$ -DOX نامگذاری گردیده است (۱۷). بررسی های دقیق تر نشان دادند که سه مکان ژنی،  $\alpha$ -DOX را در گوجه فرنگی رمز می کنند (۲۵). این مکان ها عبارت از cLEW8G12 یا  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub>، cLEW26H11 یا  $\alpha$ -DOX<sub>2</sub> و cTOD20F16 یا  $\alpha$ -DOX<sub>3</sub> هستند. پس از کشف این مکان ها چگونگی بیان آن ها در گوجه فرنگی در اثر تنش های مختلف بررسی شده است (۱، ۲۵). این بررسی با اهداف: ۱- واکنش  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub>، فرم کوتاه شده آن  $\alpha$ -DOX 5' و  $\alpha$ -DOX<sub>2</sub> نسبت به انواع تنش ها به خصوص شوری، خشکی و  $H_2O_2$ ، ۲- تاثیر غلظت و زمان های مختلف این تنش ها روی بیان ژن های یاد شده و ۳- مقایسه چگونگی بیان این ژن ها در کشت آبکشت (و در اتافک رشد) با کشت در خاک و شرایط گلخانه انجام شد.

## مواد و روش ها

این پژوهش در دو محیط گلخانه (کشت در گلدان های حاوی خاک) و آبکشت (کشت در محلول غذایی ۲/۳ هوگلند و در اتافک رشد) در دانشگاه سایمون فریزر (SFU)<sup>۱</sup> کانادا به اجرا در آمد. در گلخانه سه آزمایش به شرح زیر انجام شد: در آزمایش اول از سه رقم گوجه فرنگی که دو رقم جهش یافته و رقم دیگر نوع طبیعی آن ها بود استفاده شد. نوع طبیعی رقم (AC) Ailsa Craig، یکی از جهش یافته ها، رقم 'Flacca (Flc)' که کمبود ابسایزیک اسید (ABA) داشت و جهش یافته دیگر رقم 'Never Ripe (Nr)' که اتیلن نداشت، بودند. بذر ارقام یاد شده به دقت گندزدایی و در محیط ورمی کولایت مرطوب تندیدند و پس از رشد ریشه به گلدان های حاوی خاک منتقل و با آب و کود (به صورت محلول در آب) آبیاری شدند. ریشه بوته های هشت هفته ای در معرض شوری NaCl ۱۷۰ میلی مولار به مدت ۲۴ و ۷۵ ساعت، خشکی (بدون آبیاری) به مدت ۳۶ و ۷۵ ساعت قرار داده شدند و از بوته هایی که در برابر این تنش ها قرار نگرفتند به عنوان شاهد استفاده گردید. در آزمایش دوم غلظت های مختلف نمک یعنی ۰ (شاهد)، ۱۰۰، ۱۷۰ و ۳۰۰ میلی مولار برای بوته های مسن ۴/۵ ماهه {هر سه نژادگان (ژنوتیپ) بالا} استفاده شد و در پایان در آزمایش سوم تنها دو رقم AC و Flc در برابر مدت های مختلف شوری (۲۵۰ میلی مولار)، شش ساعت، ۱، ۳ و ۶ روزه قرار داده شدند. در شرایط آبکشت نیز دو آزمایش به شرح زیر اجرا شد. در آزمایش اول بذور ارقام 'AC' و 'Flc' پس از گندزدایی روی ورمی کولایت مرطوب تندیدند و سپس به تشتک های ۷ لیتری حاوی ۲/۳ محلول غذایی هوگلند منتقل شدند و توسط پمپ های ویژه، هوا دهی مناسب تامین شد. آزمایش در اتافک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۹۹٪ و چرخه ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، انجام شد. تیمار  $H_2O_2$  در دو سطح ۱ و ۵ میلی مولار و در دو مدت زمان ۶ و ۲۴ ساعت از راه محلول غذایی بالا به بوته های شش هفته ای شد. در آزمایش آخر تنها نوع طبیعی گوجه فرنگی یعنی رقم AC به روش آزمایش پیشین کشت و هنگامی که سن آن ها به شش هفته رسید تیمارهای  $H_2O_2$  در سه سطح ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار، شوری ۱۷۰ میلی مولار به مدت ۶ و ۲۴ ساعت و ایجاد زخم مکانیکی (شبیه سازی نیش آفات) به مدت ۶ و ۲۴ ساعت انجام شد. برای ایجاد زخم، برگ ها و ریشه ها به وسیله پنس ویژه سوراخ شدند.

پس از تیمارهای یاد شده در هر دو محیط گلخانه و آبکشت ریشه‌ها از محل طوقه قطع و به سرعت به وسیله نیتروژن مایع منجمد شدند و در دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس بر اساس روش پرسکات و مارتین<sup>۱</sup> (۱۸) RNA آن‌ها استخراج شد.

RNA نمونه‌ها به همراه ماده واسرشت کننده فرم آلدئید در ژل آگارز تزریق شدند. سپس طی فرایند لکه‌گذاری RNA به روش سامبروک و همکاران<sup>۲</sup> (۲۱) دورگه‌گیری با کاوشگرهای نشاندار شده به وسیله ایزوتوپ  $P^{32}$  انجام شد. بدین صورت که RNA بعد از انتقال به غشاء نایلونی با اشعه ماوراء بنفش تثبیت شده و سپس به مدت ۲ ساعت پیش دورگه‌گیری با بافر FBS و DNA اسپرم ماهی صورت پذیرفت. در پایان دورگه‌گیری دستکم به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد با کاوشگرهای  $\alpha\text{-DOX}_1$  فرم کوتاه شده آن ( $\alpha\text{-DOX } 5'$ ) و  $\alpha\text{-DOX}_2$  انجام شد. نتایج به دست آمده از دورگه‌گیری با قرار دادن غشاء دستکم به مدت ۲۴ ساعت در کنار فیلم حساسی به مواد رادیواکتیویته در دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد تفسیر شد.

### نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از آزمایش اول در شرایط گلخانه نشان داد که هیچ کدام از تیمارهای اعمال شده سبب بیان ژن  $\alpha\text{-DOX}_2$  در ریشه سه رقم مورد مطالعه نشدند (شکل ۱). ولی  $\alpha\text{-DOX}_1$  (با طول کامل) به وسیله شوری ۱۷۰ میلی مولار (به مدت ۲۴ ساعت) و خشکی ۳۶ ساعته در ریشه 'AC' افزایش بیان ژن نشان داد (شکل ۱A). در 'Flc' نیز وضعیت به همین صورت بود ولی با این تفاوت که میزان بیان در تیمار شاهد 'Flc' خیلی کمتر از شاهد AC بود. این ژن در اثر تیمار شوری ۲۴ ساعته در ریشه 'Nr' نیز افزایش بیان ژن نشان داد ولی، میزان بیان آن در شرایط خشکی ۳۶ ساعته کمتر از شاهد بود.

در ابتدا می‌توان چنین تفسیر کرد که کمبود افسایزیک اسید در 'Flc' سبب مقدار بیان بیشتر در مقایسه با 'AC' گردیده است. به عبارت دیگر افسایزیک اسید دارای تنظیم منفی روی بیان  $\alpha\text{-DOX}_1$  است. تیراجوه و همکاران<sup>۳</sup> (۲۵) نیز این نتیجه را در شرایط آبکشت گزارش کرده‌اند. ولی به دلیل این که آن‌ها متوجه تولید مقدار کمی افسایزیک اسید در 'Flc' شدند، از ماده فلوریدونین<sup>۴</sup> برای کاهش و یا حذف افسایزیک اسید داخلی به وسیله گیاه استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان دهنده افزایش بیان  $\alpha\text{-DOX}_1$  در اثر کاهش ABA می‌باشد. میزان ABA موجود در گیاه رابطه عکس با میزان اتیلن دارد (۱۰). به همین دلیل بود که تیراجوه و همکاران<sup>۳</sup> (۲۵) با انجام آزمایش به دو روش ژنتیکی (استفاده از رقم 'Nr') و شیمیایی (استفاده از تیمار تیوسولفات سدیم یا STS که مانع از تولید اتیلن می‌شود) بیان داشتند که افزایش اتیلن سبب انگیزش بیان این ژن می‌شود. ولی در تناقض با این نتایج این آزمایش در بررسی فوستر و همکاران (چاپ نشده) افزایش بیان ژن در اثر تیمار شوری در رقم 'Nr' دیده شد. همچنین در بررسی دیگر، دهداری (۱) افزایش بیان این ژن را در اثر STS در رقم 'بیف استیک' گوجه فرنگی در شرایط گلخانه گزارش کرد. هیچ گزارشی در مورد چگونگی نقش منفی اتیلن در ریشه وجود ندارد. بنابر این ممکن است اتیلن در واقع تنظیم‌گر منفی در ریشه نباشد هر چند که در اثر شوری افزایش بیان این ژن دیده شد. با وجود این که افزایش بیان ژن  $\alpha\text{-DOX}_1$  تا کنون در اثر شوری، زخم، آلودگی بیمارگری، اتافن (۱، ۲۵) و سولفات مس (فوستر و همکاران، چاپ نشده) گزارش شده ولی، این اولین گزارش در مورد افزایش بیان ژن آن در اثر تیمار خشکی در ریشه گوجه فرنگی است (شکل ۱A) هر چند که در جو گزارشی مبنی بر افزایش

رونوشت  $\alpha$ -DOX در ریشه در اثر خشکی وجود دارد (۱۱). ایجاد تنش اسمزی وجه مشترک دو تنش شوری و خشکی در گیاهان است. این دو تنش از راه تولید اکسیژن فعال (ROS) به گیاهان آسیب می رسانند. بنابراین، این آزمایش ها تاییدی بر نتایج پژوهشگران قبلی (۱، ۲۵) مبنی بر بیان ژن  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> در اثر تنش های اکسیداتیو است. دلیل بیان ژن در تیمار شاهد این است که این توالی ها در ژنوم گیاه موجود می باشد و ممکن است در اثر عوامل دیگری غیر از عوامل مورد بررسی بیان شود (۲۵). به همین دلیل است که در این گونه بررسی ها باید تیمار شاهد همراه با سایر تیمارها در شرایط به طور کامل یکسان (به جز از نظر عوامل مورد بررسی) مقایسه شوند.

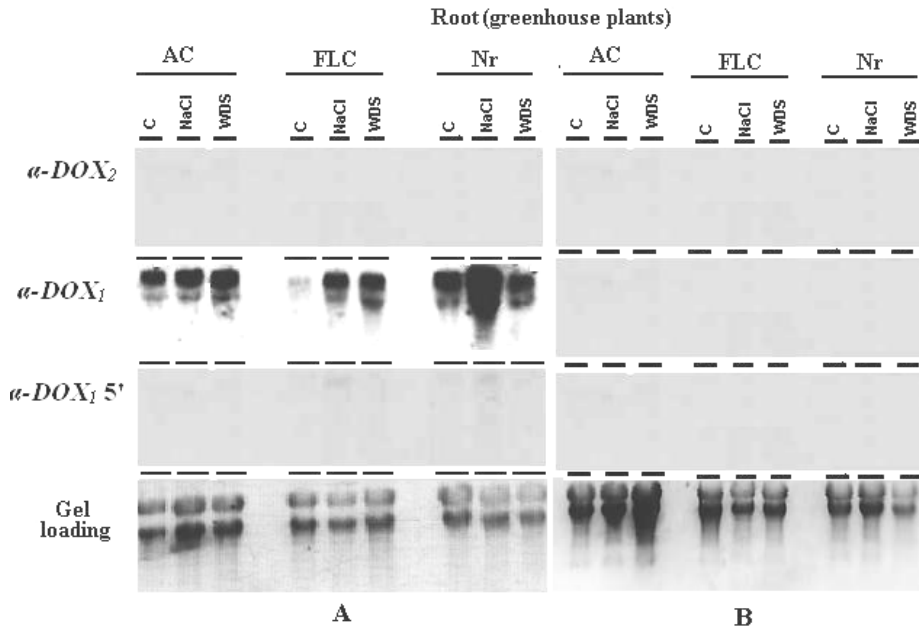


Fig.1. Effect of 170 mM NaCl, water deficient stresses (WDS) and untreated plants with NaCl and WDS (as check, c) on regulation of  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub>,  $\alpha$ -DOX<sub>2</sub> and  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> 5' expression in eight-weeks old tomato ('AC', 'Nr' and 'Flc' genotypes) roots under greenhouse conditions. A. RNA- blot analysis after exposure to 24 h NaCl and 36 h WDS. B. RNA-blot analysis after exposure to 75 h NaCl and WDS.

شکل ۱- تاثیر تنش های شوری NaCl ۱۷۰ میلی مولار و خشکی (WDS) بر بیان ژن های مورد بررسی در ریشه بوته های هشت هفته ای سه رقم 'AC'، 'Flc' و 'Nr' در شرایط گلخانه. تیمار بدون شوری و یا خشکی به عنوان شاهد (c) به کار رفت. قسمت A: دورگ گیری پس از ۲۴ ساعت شوری و ۳۶ ساعت خشکی و قسمت B: ۷۵ ساعت شوری و خشکی را نشان می دهند.

مهمترین کاربرد این گونه بررسی ها انتقال ژن های دخیل در تحمل به انواع تنش ها به گیاهان است. در این فرآیند مشکلات زیادی وجود دارد، هر چقدر ژن کوتاه تر و تعداد نوکلئوتیدهای کمتری داشته باشد انتقال راحت تر است (۲۷). از این رو دورگه گیری با کاوشگر کوتاه شده  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> یعنی  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> 5' نیز صورت گرفت. نتایج نشان دهنده بیان بسیار ناچیز و آن هم در اثر تیمار شوری در 'AC' و 'Nr' بود. بنابراین قطعه کوتاه شده به اندازه قطعه کامل در واکنش به تنش های یاد شده دخالت ندارد. با افزایش مدت زمان انجام تنش های خشکی و شوری به ۷۵ ساعت هیچ گونه بیانی در ژن های یاد شده در ریشه سه نژادگان مورد بررسی دیده نشد (شکل ۱B).

برای بررسی بیان ژن ها در بوته های مسن تحت تاثیر غلظت های مختلف نمک، آزمایش دوم در گلخانه انجام شد. شکل ۲ نتایج به دست آمده از آزمایش دوم در شرایط گلخانه را نشان می دهد.  $\alpha-DOX_2$  در اثر این تیمارها هم هیچ گونه بیانی نشان نداد. ولی همان گونه که دیده می شود بر خلاف آزمایش پیشین که بوته های شش هفته ای مورد آزمایش بودند  $\alpha-DOX_1$  در اثر شوری های به کار رفته در ریشه های 'AC' و 'Nr' افزایش بیان ژن نشان نداد. در صورتی که همانند آزمایش اول غلظت ۱۷۰ میلی مولار نمک سبب افزایش بیان ژن در 'Flc' گشت که دوباره تاییدی بر وابسته بودن بیان این ژن به اِپسایزیک اسید می باشد. شاید دلیلی که برای عدم افزایش بیان ژن در دو نژادگان دیگر می توان بیان نمود افزایش ۴/۵ ماهه سن بوته ها است. همچنین سمیت بسیار بالای یونی در غلظت ۳۰۰ میلی مولار نمک سبب پوشانیده شدن بیان این ژن در هر سه نژادگان گردیده است. هامبرگ و همکاران<sup>۱</sup> (۷) کاهش فعالیت ژن  $\alpha-DOX_1$  را در گیاهان تراریخت توتون در اثر سطوح بالای پاراکوات گزارش کردند. چگونگی بیان  $\alpha-DOX_1 5'$  همانند شکل کامل آن بود با این تفاوت که میزان بیان کمتری داشت (شکل ۲).

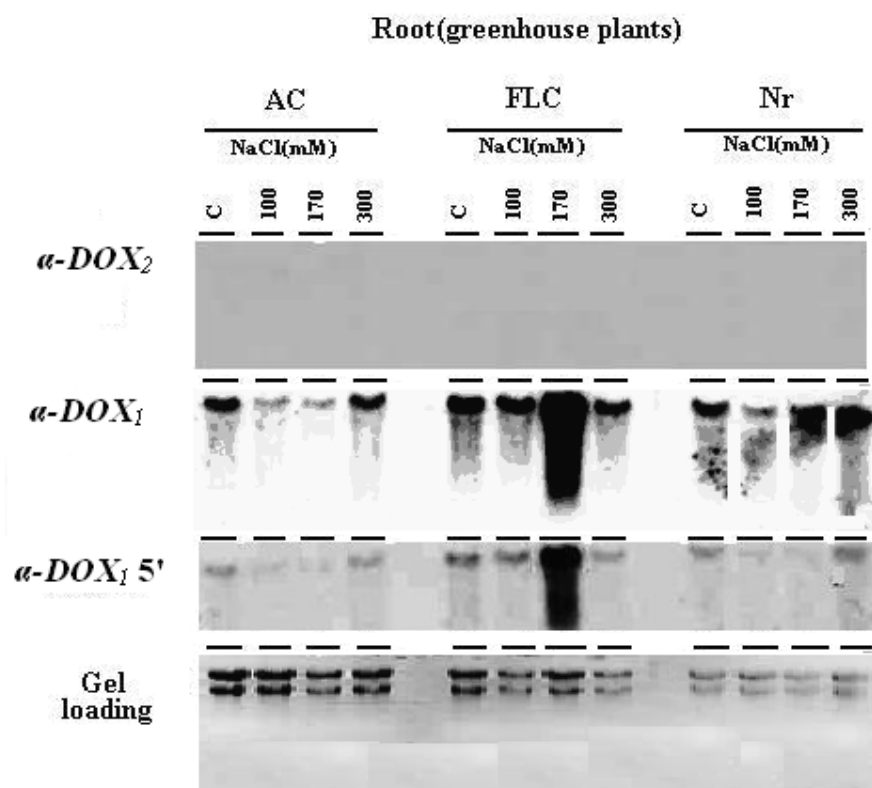


Fig. 2. Effect of different concentrations of NaCl on regulation of  $\alpha-DOX_1$ ,  $\alpha-DOX_2$  and  $\alpha-DOX_1 5'$  expression in 4.5 months old tomato ('AC', 'Nr' and 'Flc' genotypes) roots under greenhouse conditions. Untreated plants with NaCl were used as check (c).

شکل ۲- تاثیر غلظت های مختلف شوری (NaCl) بر بیان ژن های مورد بررسی در ریشه بوته های ۴/۵ ماهه سه رقم 'AC'، 'Flc' و 'Nr' در شرایط گلخانه. c تیمار بدون شوری به عنوان شاهد می باشد.

در سومین آزمایش گلخانه ای که نتایج آن در شکل ۳ آمده است، تاثیر مدت های مختلف شوری ۲۵۰ میلی مولار بر بیان ژن های مورد بررسی در ریشه بوته های شش هفته ای 'AC' و 'Flc' بررسی شد. بیان  $\alpha-DOX_1$  در ریشه 'Flc' در مدت های ۶ ساعته و یک روزه شوری بیشتر از شاهد بود در حالی که در نژادگان نوع وحشی ('AC') تنها در تیمار یک روزه افزایش بیان ژن دیده شد. با افزایش مدت اعمال تنش شوری هیچ گونه بیانی در ژن های این دو نژادگان دیده نشد.

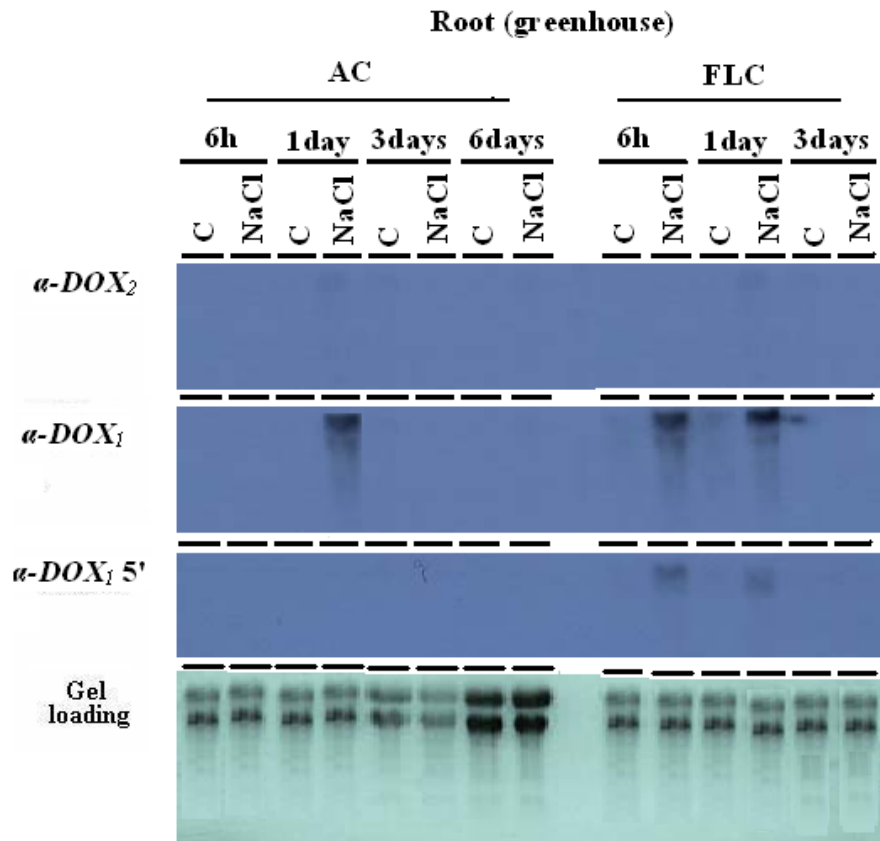


Fig. 3. Effect of exposure durations of 250 mM NaCl on regulation of  $\alpha-DOX_1$ ,  $\alpha-DOX_2$  and  $\alpha-DOX_1 5'$  expression in six-weeks old tomato ('AC' and 'Flc' genotypes) roots under greenhouse conditions. Untreated plants with NaCl were used as check (c).

شکل ۳- چگونگی بیان ژن های مورد بررسی در ریشه بوته های شش هفته ای دو رقم 'AC' و 'Flc' در شرایط گلخانه در اثر مدت زمان های مختلف تیمار شوری ۲۵۰ میلی مولار. C تیمار بدون شوری به عنوان شاهد می باشد.

به کار بردن برخی تیمارها در شرایط گلخانه مشکل است. به همین دلیل و برای مقایسه نتایج یاد شده با شرایط آبکشت دو آزمایش دیگر با دو سطح ۱ و ۵ میلی مولار تنش پراکسید هیدروژن<sup>۱</sup> که نشانگر خوبی برای تنش های اکسیداتیو است اجرا شد. شکل ۴ نتایج به دست آمده از آزمایش چهارم را نشان می دهد. در مدت شش

ساعت تیمار پراکسید هیدروژن افزایش بیان ژن  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> در دو نژادگان 'AC' و 'Flc' دیده نشد. ولی، همان گونه که انتظار می رفت بعد از ۲۴ ساعت میزان بیان در هر دو نژادگان در سطح ۵ میلی مولار بیشتر از شاهد شد. این نتیجه که اولین بار گزارش می شود نقش این ژن را در واکنش به تنش های اکسیداتیو به خوبی نشان می دهد. باید بیان نمود که به علت تخریب RNA در تیمار یک میلی مولار (به جز در مدت ۲۴ ساعت 'Flc') تاثیر این سطح قابل بررسی نبود. تاثیر H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> بر چگونگی بیان ژن های مختلف کمتر بررسی شده است. فلوکیگر و همکاران<sup>۴</sup> گزارش کردند که بیان سطوح ATP سولفوریلاز و APS رداکتاز در اثر تیمار دو میلی مولار پراکسید هیدروژن در ریشه های ذرت به شدت افزایش می یابد. در مجموع مشخص شده که H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> بیان ژن هایی که مرتبط با واکنش های با حساسیت بالا و دفاعی گیاه هستند تنظیم می کند (۱۶). در این آزمایش نیز چگونگی بیان شکل کوتاه شده ژن همانند شکل کامل ولی با میزان بیان کمتر بود.

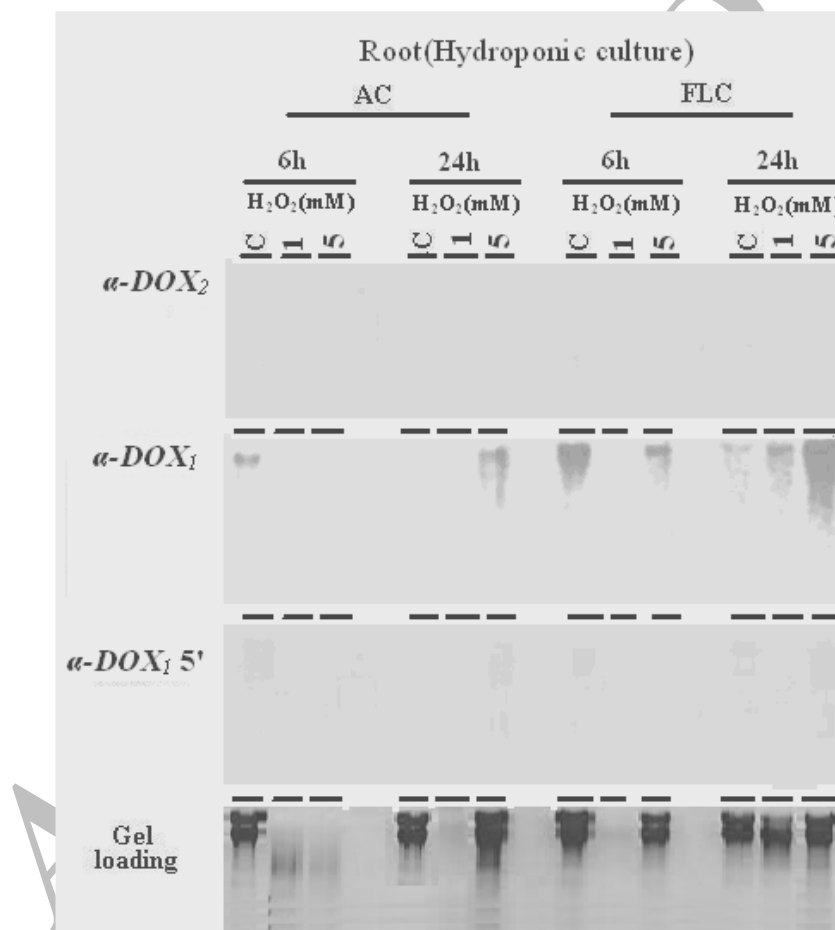


Fig. 4. Effects of 1 and 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on regulation of  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub>,  $\alpha$ -DOX<sub>2</sub> and  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> 5' expression in six-week-old tomato ('AC' and 'Flc' genotypes) roots under hydroponic conditions. Untreated plants with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were used as check (c).

شکل ۴- تاثیر سطوح مختلف پراکسید هیدروژن در دو مدت زمان ۶ و ۲۴ ساعت بر بیان ژن های مورد بررسی در ریشه بوته های شش هفته ای 'AC' و 'Flc' در شرایط آبکشت. c تیمار بدون پراکسید هیدروژن و شاهد می باشد.



چون بیان در سطح بالای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> رخ داد و RNA در برخی تیمارهای آزمایش پیشین تخریب گردید، آخرین آزمایش با افزودن سطح ۱۰ میلی مولار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و با به کار بردن تیمارهای زخم (در دو مدت زمان ۶ و ۲۴ ساعت) و شوری ۱۷۰ میلی مولار (به مدت ۶ و ۲۴ ساعت) در رقم 'AC' انجام شد که نتایج آن در شکل ۵ آورده شده است. دیده می شود که  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> در اثر تمامی تیمارها به جز سطح ۱۰ میلی مولار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> افزایش بیان ژن نشان داده است که بیان در اثر شوری مقداری زیادتیر از سایر تیمارها می باشد. دلیل بیان نشدن در سطح ۱۰ میلی مولار پر اکسید هیدروژن تخریب RNA استخراج شده بود. این آزمایش چند بار تکرار شد ولی، در هر بار دیده شد که در این سطح RNA تخریب می گردد. تیراجوه و همکاران (۲۵) و فوستر و همکاران (چاپ نشده) نیز نتایج مشابهی در مورد تیمارهای شوری و زخم به دست آوردند ولی در مورد H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> گزارشی در دسترس نیست. در این آزمایش نیز بیان شکل کوتاه شده  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> کمتر از شکل کامل آن بود.

ژن  $\alpha$ -DOX<sub>2</sub> در اثر هیچ کدام از تیمارهای اعمال شده در این آزمایش و آزمایش های تیراجوه و همکاران (۲۵) بیان نشد. به همین دلیل احتمال می رود که این یک ژن کاذب<sup>۱</sup> باشد. ژن های کاذب توالی های غیر فعالی از DNA ژنومی هستند که دارای توالی مشابه با ژن های وظیفه ای می باشند. این توالی ها در طی تکامل موجود و در اثر دوبارگی و یا به دلیل نسخه برداری معکوس<sup>۲</sup> به دست می آیند. مشخص گردید که در بیان ژن  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> مدت اعمال تیمار مهم است. یعنی بیشترین بیان در زمان ویژه ای پس از تنش رخ می دهد. این روند به وسیله پژوهشگران دیگر (۱۷، ۲۰) نیز برای ژن های دیگر و در گیاهان مختلف گزارش شده است. به گونه ای که ابتدا بیان کم، بعد در بیشترین میزان و سپس کاهش می یابد و در پایان قطع می شود. نکته دیگر این که بیان وابسته به مرحله رشد است. همان گونه که دیده شد چگونگی بیان در بوته های جوان به ویژه در نوع طبیعی متفاوت از بوته های مسن بود. به احتمال دلیل این مورد تغییر در مقدار ترکیبات مهمی مثل اتیلن و ابسایزیک اسید در مراحل مختلف رشد است. همچنین، بیان ژن به سطح تنش نیز وابستگی کامل دارد به گونه ای که شوری ۳۰۰ میلی مولار، خشکی ۷۵ ساعته و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۱۰ میلی مولار هیچ گونه بیانی را در ریشه گوجه فرنگی به همراه نداشت. همان گونه که اشاره شد دلیل اصلی این مورد غیر فعال شدن ژن در اثر تنش زیاد است. در صورتی که سن بوته ها یکسان باشد نتایج آزمایش های گلخانه ای با شرایط آبکشت یکسان است. این مورد از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا نتایج آزمایشگاهی زمانی اهمیت دارند که همبستگی بالایی با نتایج گلخانه ای و مزرعه ای نشان دهند. نکته آخر این که در بیشتر موارد شکل کوتاه شده ژن  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> میزان بیان کمتری نسبت به شکل کامل آن نشان داد. بنابراین نمی توان به جای  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> از شکل کوتاه شده آن در فرآیند انتقال ژن استفاده کرد.

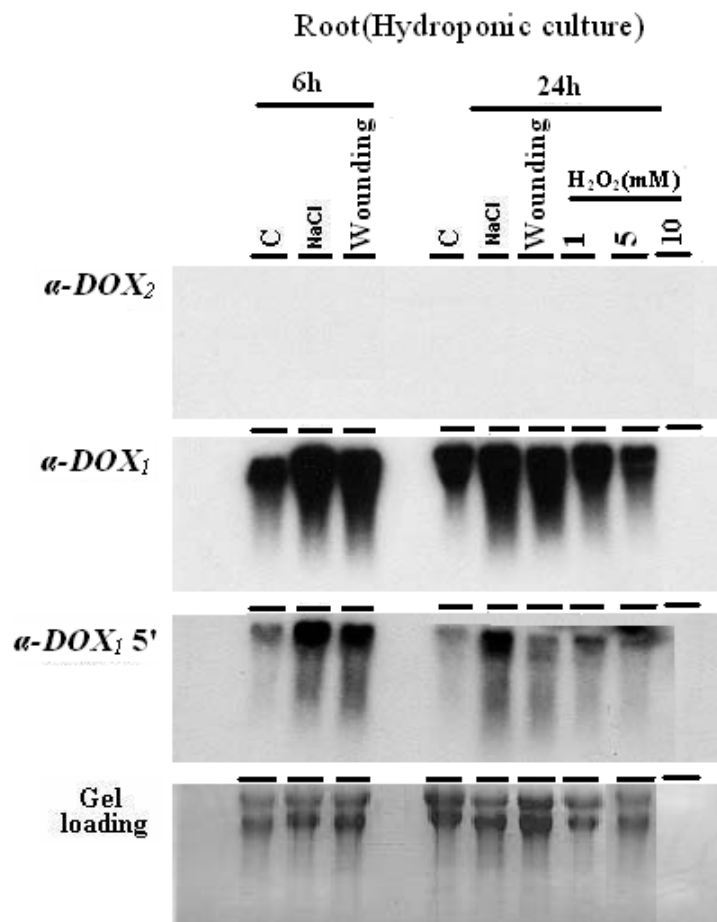


Fig. 5. Effects of 170 mM NaCl, wounding and 1, 5 and 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on regulation of *α-DOX<sub>1</sub>*, *α-DOX<sub>2</sub>* and *α-DOX<sub>1</sub> 5'* expression in six-weeks old tomato ('AC' genotype) roots under hydroponic conditions. Untreated plants with these stresses were used as check (C).

شکل ۵- تاثیر تنش های شوری ۱۷۰ میلی مولار، زخم و سطوح مختلف پراکسید هیدروژن بر بیان ژن های مورد بررسی در ریشه بوته های شش، هفته ای 'AC' در شرایط هیدروپونیک. C تیمار بدون شوری، زخم و یا پراکسید هیدروژن به عنوان شاهد می باشد.

### سپاسگزاری

از خانم دکتر Aine Plant عضو هیئت علمی دانشگاه سایمن فریزر کانادا که امکانات انجام این پژوهش را فراهم ساختند، و خانم دکتر Theingi S.T. Aung برای کمک در انجام فنون آزمایش ها، نهایت تشکر و قدردانی به عمل می آید.

## REFERENCES

## منابع

- ۱- دهداری، ا. ۱۳۸۵. تاثیر برخی تنشها روی نحوه بیان ژنهای  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub>،  $\alpha$ -DOX<sub>2</sub> و cLEC11D15 و Le 16 در ریشه و برگهای گوجه فرنگی. اولین همایش بیوتکنولوژی کشاورزی ایران. دانشگاه رازی کرمانشاه.
2. Alscher, R.G., N. Erturk and L.S. Heath. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plant. J. Exp. Bot. 53:1331-1341.
  3. Desikan, R., S.J. Neill and J.T. Hancock. 2000. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Free Radic. Biol. Med. 28:773-778.
  4. Fluckiger, H., S. Jecklin, P.V. Ballmoos, M. Suter and C. Brunold. 2000. Effect of hydrogen peroxide induced oxidative stress in maize roots. In: C. Brunold (ed.). Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants. Paul Haupt, Bern, Switzerland. 401-403.
  5. Grant, J.J. and G.J. Loake. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiol. 124:21-29.
  6. Gulick, P.J. and J. Dvorak. 1992. Coordinate gene response to salt stress in *Lophopyrum elongatum*. Plant Physiol. 100:1384-1388.
  7. Hamberg, M., I.P. Leon, A. Sanz and C. Castresana. 2002. Fatty acid  $\alpha$ - dioxygenase. Prost. Lipid Med. 68:363-374.
  8. Hamberg, M., A. Sanz and C. Castresana. 1999.  $\alpha$ - Oxidation of fatty acids in higher plants. J. Biol. Chem. 274:24503-24513.
  9. Hermsmeier, D., U. Schittko and I.T. Baldwin. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* and its natural host *Nicotiana attenuate*. I. and large-scale changes in the accumulation of growth and defense-related plant mRNAs. Plant Physiol. 125:683-700.
  10. Ishitani, M., L. Xiong, B. Stevenson and J. Zhu. 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. The Plant Cell 9:1935-1949.
  11. Katsuhara, M. 1997. Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. Plant Cell Physiol. 38:1091-1093.
  12. Levitt, J. 1980. Response of Plants to Environmental Stresses. Vol. 2 Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press. New York, U.S.A.
  13. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 9:405-410.
  14. Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ. 25: 239-250.
  15. Orcutt, D.M. and E.T. Nilsen. 2000. Physiology of Plants Under Stress: Soil and Biotic Factors. John Wiley and Sons, Inc. New York, U.S.A. 192 p.
  16. Orozco-Cardenas, M.L., J. Narvaez-Vasquez and C.A. Ryan. 2001. Hydrogen peroxide acts as second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemine and methyl jasmonate. The Plant Cell 13:179-191.
  17. Ponc de Leon, I., A. Sanz, M. Hamberg and C. Castresana. 2002. Involvement of the *Arabidopsis*  $\alpha$ -DOX<sub>1</sub> fatty acid dioxygenase protein in protection against oxidative stress and cell death. Plant J. 29:61-72.
  18. Prescott, A. and C. Martin. 1987. A rapid method for the quantitative assessment of levels of specific mRNAs in plants. Plant Mol. Biol. Rep. 4:219-224.
  19. Richter, C. and M. Schweizer. 1997. Oxidative stress in mitochondria. In: J.G. Scandalios (ed.), Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York, U.S.A. 169-200.
  20. Robinson, N.L., C.K. Tanaka and W.J. Hurkman. 1990. Time dependent change in polypeptide and translatable mRNA levels caused by NaCl in barely roots. Phsiol. Plant. 78:128-134.
  21. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.

22. Sanz, A., J.L. Moreno and C. Castresana. 1998. PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cylooxygenase. *Plant Cell* 10:1523-1537.
23. Shi, H., F.J. Qintero, J.M. Pardo and J.K. Zhu. 2002. The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *Plant Cell* 14:465-477.
24. Tabaeizadeh, Z. 1998. Drought-induced responses in plants. *Inc. Rev. Cytol.* 182: 193-242.
25. Tirajoh, A., T.S.T. Aung, A.B. McKay and A.L. Plant. 2005. Stress- responsive  $\alpha$ -dioxygenase expression in tomato roots. *J. Exp. Botany* 56:713-723.
26. Turner, N.C. 1986. Adaptation to water deficits: A changing perspective. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:175-190.
27. Wei, J.Z., A. Tirajoh, J. Effendy and A.L. Plant. 2000. Characterization of salt-induced changes in gene expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and role played by abscisic acid. *Plant Sci.* 159:135-148.
28. Wu, S.J., D. Lei and J.K. Zhu. 1996. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8:617-627.

Archive of SID