

## بررسی تأثیر عدم فعالیت آنزیم RONI در گیاهان موتانت *ron1-1* در واکنش به تنش القا شده توسط هورمون‌ها در آراییدوپسیس

سارا رویان<sup>۱</sup>، رضا شیرزادیان خرم‌آباد<sup>۱\*</sup>، عاطفه صبوری<sup>۲</sup> و محسن زواره<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

<sup>۲</sup> رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۹

### چکیده

گیاهان با توجه به نوع تنش میزان بسیاری از هورمون‌ها را تغییر می‌دهند. هورمون‌های گیاهی اسید آبسزیک (ABA)، اکسین (IAA) و اتیلن (Ethylene) بر طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های مهم گیاه مؤثر هستند. از آنجایی که ژن *RON1* بر مسیر بیوستز یا سیگنالینگ هورمون‌های IAA، ABA،  $C_2H_4$  مؤثر می‌باشد، از این رو تأثیر تغییر فعالیت ژن *RON1* در گیاهچه‌های *ron1-1* بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی در واکنش به غلظت‌های مختلف این هورمون‌ها در محیط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت. طول ریشه اصلی، تعداد ریشه جانبی، تعداد برگ و میزان جوانه‌زنی در گیاهچه‌های جهش‌یافته *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف ABA در مقایسه با گیاهچه‌های مادری تفاوت معنی‌داری نشان دادند. همچنین طول ریشه، طول هیپوکوتیل و تعداد ریشه جانبی در گیاهچه‌های جهش‌یافته *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف IAA در مقایسه با گیاهچه‌های مادری دارای تفاوت معنی‌داری بودند. بررسی رگرگ‌ها در کوتیلدون‌ها و برگ سوم گیاهچه‌ها نشان داد که موتانت‌ها دارای شبکه‌های رگرگی ثانویه باز بوده، در حالی‌که ژنوتیپ *Ler-0* دارای شبکه رگرگی پیوسته می‌باشد. گیاهچه‌ها در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC (پیش‌ماده اتیلن) نیز از لحاظ طول ریشه، طول هیپوکوتیل و قطر ریشه تفاوت معنی‌داری را با گیاهچه‌های مادری نشان دادند. بنابراین جهش *ron1-1* و تغییر میزان فعالیت آنزیم *RON1* موجب تغییر خصوصیات گیاهچه‌های موتانت در مقایسه با گیاهان مادری گردید. جهش در ژن *RON1* باعث تجمع آدنوزین ۳ و ۵ بیوفسفات (PAP) و احتمالاً اینوزیتول-۱ و ۴ تری فسفات (IP3) در سلول‌های گیاهان موتانت شده که این تجمع باعث توقف فعالیت *RON1* و تأثیر بر خصوصیات مورفولوژیکی مرتبط در گیاهچه‌های موتانت شده است.

واژه‌های کلیدی: آراییدوپسیس، ACC، ABA، IAA، تنش هورمونی، *RON1/FRY1*

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳-۳۳۶۹۰۴۵۱، پست الکترونیکی: R.shirzadian@gmail.com

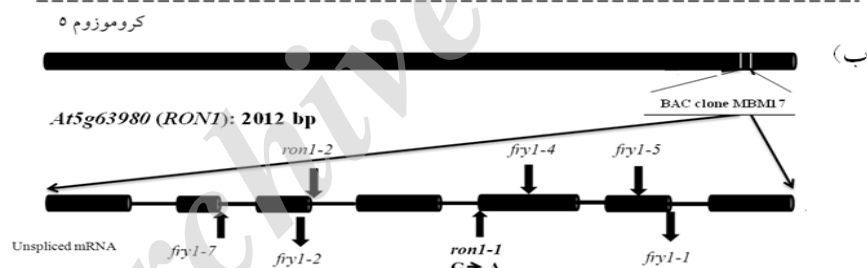
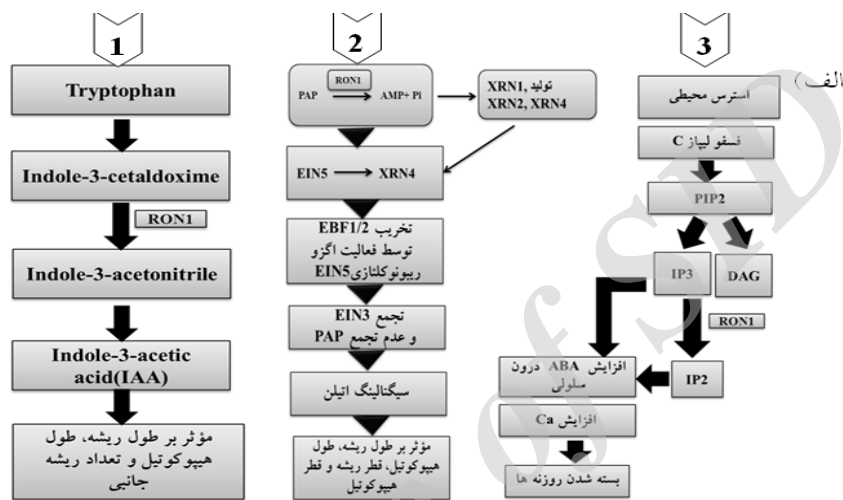
### مقدمه

برای حصول اطمینان از بقای گیاه تولید می‌شود (۱). هورمون گیاهی اسید آبسزیک (ABA) بر طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های مهم در رشد و توسعه گیاه از قبیل خواب بذر، رشد و توسعه ریشه و ساقه، تعرق و تحمل به تنش مؤثر می‌باشد (۶). در گیاه توسعه ریشه جانبی با افزایش میزان ABA مهار می‌شود، این اتفاق بلافاصله بعد از ظهور

گیاهان در طول دوره رشد و نمو خود به کرات در برابر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند (۴). با توجه به نوع تنش و محرک محیطی، مجموعه خاصی از ترکیبات و هورمون‌های گیاهی از قبیل اسید جاسمونیک (Jasmonic acid)، اسید سالیسیلیک (Salicylic acid)، اسید آبسزیک (Abscisic acid)، اتیلن (Ethylene) و اکسین (Auxin) در گیاهان

عنوان تنظیم‌کننده سیگنالینگ تنش‌های غیر زنده عمل می‌کند (۵) و (شکل ۱-الف). پس از تیمار گیاهان موتانت *fry1-1* با ABA نشان داده شد که در گیاهان جهش یافته *fry1-1* میزان IP3 (Inositol 1, 4, 5 triphosphate) نسبت به گیاهان تیپ وحشی افزایش یافته است (۲۳). موتانت‌های *fry1* دارای حساسیت بیشتری به ABA در پاسخ به تنش القا شده می‌باشد (۲۳).

پریموردیای ریشه جانبی و قبل از فعال شدن مریستم ریشه-جانبی رخ می‌دهد (۶). تحت شرایط طبیعی رشد، محتوای ABA در گیاهان بسیار کم است. در واکنش به تنش غیر زیستی مقدار ABA در سلول گیاهی افزایش می‌یابد (۵). ژن *RON1/FRY1* (*ROTUNDA1/FIERY1*) در مسیر پاسخ به تنش‌های وابسته به ABA و غیر وابسته به ABA بعنوان یک تنظیم‌کننده منفی عمل می‌کند (۲۳). همچنین به



شکل ۱-الف: مدل ارائه شده در مورد نقش فعالیت RONI در ارتباط با هورمونهای IAA (۱)، C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (۲) و ABA (۳). جهش *ron1-1* منجر به اختلال در عملکرد سه هورمون ذکر شده می‌شود (۱۴، ۱۷، ۲۰، ۲۱). ب- ساختار ژن *RON1* روی کروموزوم شماره ۵ آرکیدپسیس تالیانا، محل جهش *ron1-1* در ژن *RON1* و برخی دیگر از موتانت‌های آللیک با *ron1-1* نشان داده شده است. جهش *ron1-1* در مرز اکزون ۵ و اینترون مربوطه رخ داده است (۵، ۱۷، ۲۳، ۲۴).

از جمله اکسین نقش مهمی در تعدیل رشد گیاه و همچنین محافظت در برابر تنش‌ها دارند (۳). الگوی رگبرگ‌ها، تشکیل ریشه‌جانبی، ریشه موین، ساقه، ریشه و چیرگی انتهایی فرایندهایی شناخته شده هستند که توسط هورمون IAA تنظیم می‌شوند (۱۷). پیام‌رسانی اکسین توسط گیرنده‌های اکسین همانند گروه TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) ، AUXIN

از دیگر هورمونهای مؤثر بر رشد و نمو گیاهان، اکسین، ایندول-۳-استیک اسید (IAA) می‌باشد (۱۲). ریشه جانبی یا فرعی معمولاً در ناحیه ای بالاتر از ناحیه طویل شدن تارهای کشنده یافت می‌شود و از گروه‌های کوچکی از سلول‌های دایره محیطیه منشأ می‌گیرند. هورمون IAA نقش مهمی در تشکیل و طویل شدن ریشه‌جانبی و سازماندهی و ایجاد ساختار نهایی ریشه دارد (۸ و ۱۵). هورمونهای گیاهی

تبدیل و در مرحله بعد با فعالیت آنزیم ACC oxidase در گیاه به اتیلن تبدیل می‌شود. تغییرات مورفولوژیکی گیاهان تیمار شده با ACC را تغییرات سه‌گانه (Triple Response) می‌نامند (۲۱). علائم واکنش سه‌گانه شامل کوتاهی و ضخیم شدن ریشه، کوتاهی هیپوکوتیل و چرخش رأس هیپوکوتیل می‌باشد (۹). ژن *RON1* به نحوی با مسیر بیوسنتز اتیلن در ارتباط است (شکل ۱-الف). در حضور اتیلن ژن *EIN5* (*ETHYLENE-INSENSITIVE 5*) که یکی از اجزای مسیر سیگنالینگ اتیلن می‌باشد و محصول این ژن اگروریبونوکلئازی به نام *XRN4* می‌باشد و برای بیان ژن‌های مرتبط با اتیلن لازم می‌باشد (۹). با فعالیت اگروریبونوکلئازی خود موجب تخریب *EBF1/EBF2* (*ETHYLENE BINDING F BOX PROTEIN*) شده و در نتیجه علیه فعالیت باز خور منفی *EIN3* عمل کرده و در نهایت موجب تجمع *EIN3* و سیگنالینگ اتیلن می‌شود (۹). در صورتی که جهش در ژن *RON1* مانع سنتز اگروریبونوکلئازها می‌شود و *PAP* در سلول تجمع می‌یابد و سیگنالینگ اتیلن دچار اختلال می‌شود.

ژن *RON1/FRY1* شامل ۷ اگزون بوده و در انتهای بازوی کوچک کروموزوم شماره ۵ آراییدوپسیس قرار دارد. جهش *ron1-1* در این ژن در مرز اگزون ۵ و اینترون ۴ رخ داده که در آن نوکلئوتید G به A تغییر یافته است (شکل ۱-ب) (۱۷). ژن *RON1/FRY1* دارای دو فعالیت آنزیمی شامل اینوزیتول پلی فسفات-۱ فسفاتاز و ۳-۲-۵ بی فسفات اینوزیتول پلی فسفات-۱ فسفاتاز باعث تجزیه مولکول اینوزیتول-۱ و ۴ و ۵ تری فسفات (IP3) می‌شود (۵). تحت تنش محیطی آنزیم فسفولیپاز C فعال می‌شود و موجب افزایش مقدار پیامبر ثانویه IP3 می‌گردد (۲۲) (شکل ۱-ب). گیاهان موتانت *ron1-1* که دارای یک موتاسیون در ژن *RON1/FRY1* هستند نیز دارای تفاوت‌های مورفولوژیکی قابل توجهی با ژنوتیپ مادری خود بوده که می‌توان به طول گل آذین کوتاه‌تر و ایجاد گل آذین‌های

(AFB) SIGNALING F-BOX انجام می‌شود، این گیرنده‌ها هدف پروتئین‌های AUX/IAA هستند (۳). پروتئین‌های *TIR1/AFB* به‌عنوان گیرنده‌های اصلی اکسین عمل می‌کند و در بروز ژن وابسته به اکسین نقش دارند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که این امکان وجود دارد که در برخی از گیاهان موتانت‌ها مانند *fry1-1* و *fry1-4* رونوشت برداری ژن‌های خانواده *TIR1* و *AFB1* و *AFB2* به شدت کاهش یافته باشد. در موتانت‌های *fry1* کاهش حساسیت به اکسین در القای ریشه جانبی بصورت کاهش القا ریشه جانبی دیده می‌شود (۵). کاهش بیان ژن گزارشگر اکسین *DR5-GUS* در موتانت‌های *ron1-1* می‌تواند حاکی از ناتوانی در درک اکسین و غلظت کم اکسین باشد (۱۷). در پژوهشی نشان داده شد که جهش *ron1-1* موجب تغییر در سطح تعداد زیادی از متابولیت گیاهی از جمله مایواینوزیتول و ایندول-۳-استونیتریل بعنوان پیش‌ساز اکسین شده است (۱۷). ژن *RON1/FRY1* توسعه ریشه جانبی را از طریق فعالیت آدنوزین ۳ و ۵ بیوسفات (*PAP*) تنظیم می‌کند که یک مهارکننده قوی اگروریبونوکلئازی (*XRN*) است (۵). در موتانت‌هایی که در سنتز اکسین اختلال دارند اختلاف قابل توجهی در زمینه تشکیل ریشه جانبی، طول ریشه موئی، طول ساقه و عدم اتصال رگ برگ‌ها مشاهده می‌شوند (۱۶).

اتیلن ( $C_2H_4$ ) از جمله هورمون‌های مهم گیاهی محسوب می‌شود که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی در گیاهان دخالت دارد (۲۱). اتیلن توسط فرایندهایی مثل زخم، کمبود اکسیژن و سرما در گیاهان تولید می‌شود (۲۰) و جوانه زنی بذر را در حالت خواب و غیر خواب تحریک می‌کند (۲). در مسیر بیوشیمیایی سنتز اتیلن، ACC (*1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid*) آخرین پیش ماده محسوب می‌شود (۲۱). سنتز این پیش ماده مرحله محدود کننده متابولیسمی تولید اتیلن در بافت گیاهی می‌باشد. در مسیر بیوسنتز اتیلن، متیونین تحت تأثیر آنزیم‌های SAM (S-آدنوزین متیونین) و ACC synthase به ACC

اینکه *ron1-1* در زمینه ژنومی گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* *Ler-0* رخ داده است می‌تواند جالب باشد.

### مواد و روشها

این آزمایش در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. برای استریل کردن بذرهای مادری *آرابیدوپسیس تالیانا Ler-0* و موتانت *ron1-1* (اهدایی از دانشگاه Functional Adelaide Genomics Center استرالیا) از محلول هیپوکلرید سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد، سپس بذرها به مدت ده دقیقه در آب مقطر استریل ۳ بار شسته‌شو داده شدند. برای بررسی تأثیر ABA بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی شامل طول ریشه، تعداد ریشه جانبی، تعداد بذرهای جوانه زده و تعداد برگ از ABA (ساخت شرکت SERVA با وزن ملکولی ۲۶۴/۳) استفاده شد. در این بررسی ابتدا بذرهای هر یک از ژنوتیپ‌ها در محیط غذایی MS حاوی غلظت‌های مختلف ABA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ میکرومول) در سه تکرار کشت و به مدت ۱۴ روز در ژرمیناتور نگهداری شدند. برای بررسی تأثیر IAA برخی خصوصیات مورفولوژیکی شامل طول ریشه، تعداد ریشه جانبی، طول هیپوکوتیل از IAA (ساخت شرکت SIGMA-ALDRICH با وزن مولکولی ۱۷۵/۲) استفاده شد. ابتدا بذرها به مدت چهار روز در محیط کشت MS فاقد هورمون IAA کشت شدند و بعد در روز چهارم گیاهچه‌های هم‌اندازه از هر ژنوتیپ انتخاب و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون IAA (صفر، ۰/۵، ۲، ۱۰ میکرومول) در سه تکرار کشت و خصوصیات مورفولوژیکی فوق در روز هشتم اندازه‌گیری شدند. برای انجام آزمون تغییرات سه‌گانه از ACC (ساخت شرکت SIGMA-ALDRICH با وزن مولکولی ۱۰۱/۱) استفاده شد. بذرها به مدت پنج روز در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون ACC (صفر، ۰/۵، ۱، ۱۰ میکرومول) در سه تکرار و تاریکی مطلق کشت و خصوصیات مورفولوژیکی مورد نظر شامل

ثانویه بیشتر و همچنین تأخیر در گلدهی اشاره کرد (۱۷). موتاسیون نقطه‌ای *ron1-1* منجر به عدم سنتز پروتئین FRY1 شده است. در حالیکه در گیاهان *fry1-1* پروتئین *fry1-1* در سلول شناسایی و گزارش شده است (۵ و ۱۷). همانطور که در مورد موتانت‌های *fry1-1* و *fry1-4* ملاحظه گردید، به دلیل مالته فانکشنال بودن ژن *RON1/FRY1* و با توجه به اینکه در کدام آگزون ژن جهش رخ دهد واکنش به هورمون‌ها در موتانت‌های مختلف این ژن می‌تواند متفاوت باشد، بنابراین در این پژوهش با توجه به جهش ویژه ای که در ژنوتیپ موتانت *ron1-1* به وجود آمده و به دلیل نقشی که ژن *RON1/FRY1* در بیوسنتز هورمون‌های اکسین، اتیلن و اسید آبسزیک دارد تأثیر تغییر فعالیت ژن *RON1* در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی شامل طول ریشه اصلی، تعداد ریشه جانبی، طول هیپوکوتیل و تعداد برگ در ژنوتیپ موتانت و جدید *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف هورمونی ACC, IAA, ABA در محیط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت و با خصوصیات مشابه در گیاه مادری *آرابیدوپسیس تالیانا (Ler-0)* مقایسه شد. آزمایش‌هایی که توسط Chen و همکاران (۲۰۱۰) ارائه شده روی یکی از موتانت‌های ژن *FRY1* بنام *fry1-4* که حاوی یک قطعه T-DNA (SALK\_020882) در والد *Col-0* است انجام شده است که در واقع این موتاسیون هم از نظر مکان جهش و هم از نظر زمینه ژنومی با *ron1-1* متفاوت است. در مقاله Robles و همکاران (۲۰۰۹) فقط این موتاسیون شناسایی و فقط به بررسی تأثیر این موتاسیون بر بعضی خصوصیات مورفولوژیکی در مقایسه با ژنوتیپ مادری در شرایط نرمال پرداخته شده است. در این مطالعه گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* در شرایط هورمونی ACC, IAA, ABA بررسی شده و تغییرات فنوتیپی ناشی از سطوح مختلف این هورمون‌ها گزارش شده است که در نوع خود یک بررسی جدید محسوب می‌شود. نتایج این بررسی با توجه به

ABA بر تعداد بذره‌های جوانه‌زده نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌ها دارای تفاوت معنی‌داری در این زمینه می‌باشند (جدول ۱). به طوری که میزان جوانه‌زنی بذره‌های موتانت *ron1-1* در مقایسه با بذره‌های ژنوتیپ مادری *Ler-0* در غلظت‌های مختلف ABA از کاهش قابل توجهی برخوردار است (نمودار ۱-الف). میزان جوانه‌زنی بذره‌ها در موتانت *ron1-1* در شرایط نرمال و پس از ۴ روز به ۴۰ درصد رسید، در حالی که ژنوتیپ مادری در شرایط برابر دارای ۸۰ درصد جوانه‌زنی (۲ برابر) بود. با افزایش غلظت ABA به نیم میکرومول در ژنوتیپ مادری درصد جوانه‌زنی به ۷۸ درصد و در ژنوتیپ موتانت به ۳۰ درصد رسید. یعنی با افزایش غلظت ABA از صفر میکرومول به نیم میکرومول در ژنوتیپ *ron1-1* درصد جوانه‌زنی نسبت به شرایط نرمال ۲۵ درصد کاهش یافته، در حالی که این کاهش جوانه‌زنی در ژنوتیپ *Ler-0* فقط در حدود ۲/۵ درصد بود. با افزایش غلظت به ۱ میکرومول، جوانه‌زنی در ژنوتیپ *Ler-0* به میزان ۳۷ درصد و در غلظت ۲ میکرومول به میزان ۶۲ درصد کاهش یافت. در حالی که در ژنوتیپ *ron1-1* این مقدار کاهش برای هر دو غلظت ۵۰ درصد بود. اثر متقابل ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف ABA بر صفت تعداد بذره‌های جوانه‌زده غیر معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین تعداد بذره‌های جوانه‌زده در ژنوتیپ *Ler-0* در غلظت صفر میکرومول (شاهد) و کمترین تعداد در بذره‌های موتانت *ron1-1* در غلظت ۲ میکرومول ABA مشاهده شد. بنابراین وقوع موتاسیون در ژن *RON1* موجب کاهش قابل توجه میزان جوانه‌زنی در بذره‌های موتانت *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف ABA شده است. بر اساس نتایج بدست آمده از بررسی صفت طول ریشه اصلی، تعداد ریشه‌جانبی و تعداد برگ ژنوتیپ‌ها از نظر صفت طول ریشه دارای تفاوت معنی‌داری باهم می‌باشند (جدول ۱). طول ریشه اصلی، تعداد ریشه‌جانبی و تعداد برگ در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف ABA نسبت به گیاهچه‌های مادری *Ler-0*

طول ریشه و طول هیپوکوتیل، قطر ریشه در روز پنجم توسط نرم‌افزار IMAGE J<sub>1,4,3,67</sub> اندازه‌گیری شدند. پتری‌های حاوی بذره‌ها در ژرمیناتور (Growth chamber) ساخت کمپانی WEISS TECHNIK آلمان مدل ZPR-2000 در دمای ۲۲±۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵٪ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. آزمایش‌های فوق به صورت فاکتوریل با فاکتور ژنوتیپ (در دو سطح) و فاکتور تنظیم‌کننده‌های رشد (در سطوح مختلف) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد، و در نهایت تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام و از روش مقایسه میانگین LSD جهت مقایسه میانگین بهره‌گرفته شد و نمودارهای مربوط با استفاده از نرم‌افزار EXCEL 2007 ترسیم شد. برای بررسی وضعیت رگبرگ‌ها از روش چن و همکاران (۱۹۹۹) با کمی تغییرات استفاده شد. در این روش ابتدا نمونه‌های مادری و موتانت‌ها به مدت یک ساعت در اسید استیک و اتانول ۹۵ درصد به نسبت ۱:۳ فیکس می‌شوند. برای حذف رنگدانه‌ها از برگ، نمونه‌ها به ترتیب در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه و بعد در اتانول ۱۰۰ درصد در طول شب نگهداری و سپس در هیدروکسید سدیم ۱۰ درصد به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در ادامه نمونه‌های برگ را در محلول رنگی (Merck) Safranin-o یک درصد به مدت ۱-۲ دقیقه قرار داده تا نمونه‌های برگ رنگ‌آمیزی شوند. سپس برای مشاهده رگبرگ‌ها ضروری است رنگ از دیگر قسمت‌ها حذف شود. برای این کار به ترتیب نمونه‌ها در اتانول ۹۵٪، ۷۰٪ و بعد در آب قرار می‌گیرند. سپس نمونه‌ها روی لام و توسط گلیسرول به آرامی باز شده و توسط روغن امولسیون تیپ A (ساخت شرکت Cangille) روی لام فیکس و زیر میکروسکوب تصویربرداری شدند (۵).

## نتایج

تجزیه داده‌های بدست‌آمده از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف

کاهش معنی‌داری داشته است (جدول ۱، نمودار ۱-ب، ج، د شکل ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی صفات مختلف گیاهچه‌های ژنوتیپ *Ler-0* و *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف ABA

میانگین مربعات				منابع تغییرات	
جوانه‌زنی	طول ریشه اصلی	تعداد ریشه‌جانبی	تعداد برگ	درجه آزادی	
۶۳۳۷/۵ **	۲۲۸/۷۵ **	۱۸۳/۹۸ **	۲۹/۹۲ **	۱	ژنوتیپ
۱۷۴۸/۶ **	۱۷۴۵/۶۳ **	۴۷۸/۶۳ **	۲۳/۲۷ **	۳	تیمار ABA
۳۸۱/۹ <sup>n.s</sup>	۱۷/۱۱ *	۶۱/۲۴ **	۲/۳۷ **	۳	ژنوتیپ* تیمار
۱۴۱/۶	۴/۷۰	۱/۵۱	۰/۱۴	۱۶	خطا
				۲۳	کل
۱۰/۴۹	۱۰/۴۰	۱۸/۵۹	۷/۵۰		CV

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

(شاهد) مشاهده شد و کمترین تعداد ریشه‌جانبی در غلظت ۱ میکرومول ABA در ژنوتیپ *ron1-1* مشاهده شد و در غلظت ۲ میکرومول ABA ریشه‌جانبی در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد (نمودار ۱-ج). بنابراین می‌توان اینگونه استنباط کرد که وقوع موتاسیون در ژن *RON1* موجب کاهش قابل توجه تعداد ریشه‌های جانبی در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* شده است.

اثر متقابل ژنوتیپ در غلظت‌های مختلف ABA بر صفت تعداد برگ نشان داد که با افزایش غلظت ABA در هر دو ژنوتیپ موتانت و مادری تعداد برگ کاهش یافته است. بیشترین تعداد برگ در ژنوتیپ *Ler-0* در غلظت صفر میکرومول (شاهد) مشاهده شد و کمترین تعداد برگ در غلظت ۲ میکرومول ABA در ژنوتیپ *ron1-1* به ترتیب ۸ و ۲ برگ می‌باشند. بنابراین وقوع جهش نقطه‌ای *ron1-1* در ژن *RON1* موجب کاهش قابل توجه تعداد برگ در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* شده است.

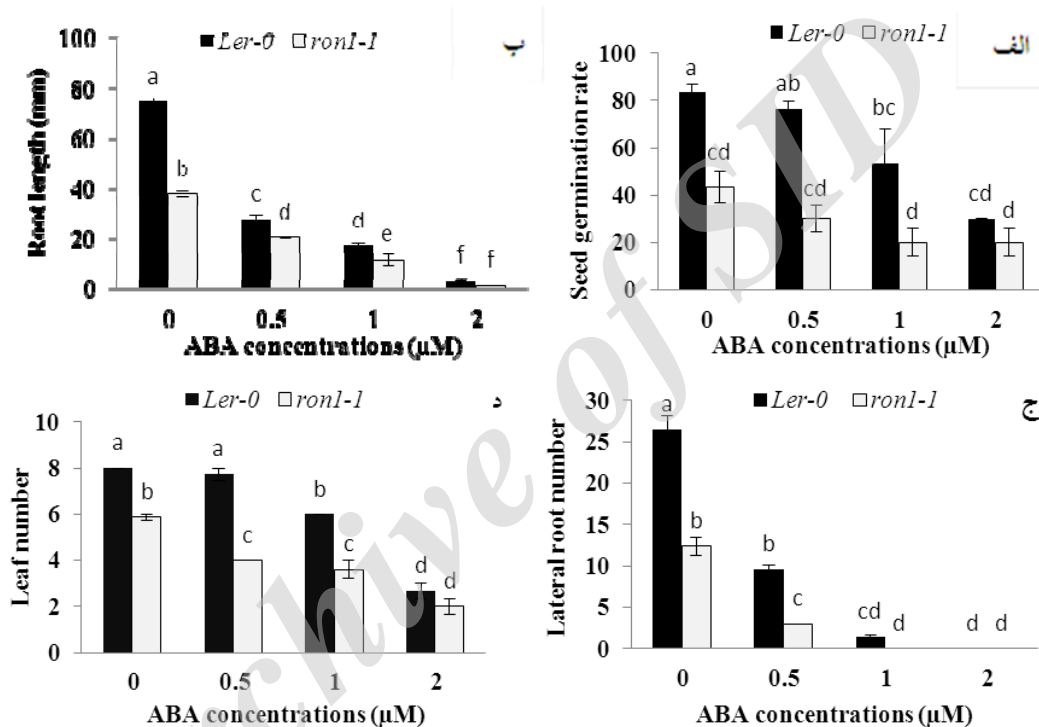
بررسی داده‌ها نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌ها در واکنش به غلظت‌های مختلف IAA از نظر صفت طول ریشه دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشند، به نحوی که بیشترین طول ریشه در ژنوتیپ مادری مشاهده می‌شود (جدول ۲). بررسی نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف IAA بر طول ریشه در گیاهچه‌های مادری و موتانت نشان می‌دهد که طول

اثر متقابل ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف ABA بر صفت طول ریشه، تعداد ریشه‌جانبی و تعداد برگ معنی‌دار بود و مطابق نمودار ۱-ب، ج و د این اثر متقابل برای این صفت و سایر صفات به طور مشابه از نوع تغییر در مقدار بود، از این رو نیازی به برش دهی (یعنی بررسی هر یک از ژنوتیپ‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف ABA به صورت جداگانه) نبود. در شرایط نرمال طول ریشه اصلی در ژنوتیپ مادری *Ler-0* تقریباً دو برابر آن در ژنوتیپ موتانت *ron1-1* بود (نمودار ۱-ب). در واقع طول ریشه اصلی در هر دو ژنوتیپ موتانت و مادری در غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومول در مقایسه با حالت شاهد دارای روند کاهشی بودند، این در حالی است که با افزایش غلظت از صفر به ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومول میزان کاهش طول ریشه در گیاهچه‌های *ron1-1* نسبت به طول ریشه اصلی در گیاهچه‌های *Ler-0* به نسبت ۱/۵، ۱/۳ و ۲/۵ برابر کاهش یافت.

اثر متقابل ژنوتیپ‌ها در غلظت‌های مختلف ABA بر صفت تعداد ریشه‌جانبی نشان داد که به ترتیب در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میکرومول تعداد ریشه‌جانبی در ژنوتیپ مادری *Ler-0* در مقایسه با ژنوتیپ موتانت *ron1-1* به نسبت ۲، ۲ و ۴ برابر افزایش نشان داد. بیشترین تعداد ریشه‌جانبی در ژنوتیپ *Ler-0* در غلظت صفر میکرومول

ریشه اصلی در ژنوتیپ موتانت *ron1-1* نسبت به بذره‌های مادری *Ler-0* کاهش معنی داری یافته است (جدول ۲، نمودار ۲-الف، شکل ۳). به طوری که بیشترین طول ریشه در ژنوتیپ *Ler-0* در غلظت صفر میکرومول (شاهد) و کمترین طول ریشه در غلظت ۱۰ میکرومول IAA در ژنوتیپ *ron1-1* مشاهده شد (نمودار ۲). اثر متقابل ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف IAA بر صفت طول ریشه معنی دار بوده (جدول ۲)، به طوری که در شرایط نرمال طول ریشه

اصلی ژنوتیپ *Ler-0* در حدود دو برابر ژنوتیپ موتانت *ron1-1* می‌باشد و همچنین در غلظت‌های ۰/۵، ۲ و ۱۰ میکرومول به ترتیب در حدود ۳، ۳/۵ و ۲ برابر بیشتر از میزان طول ریشه در ژنوتیپ موتانت *ron1-1* می‌باشد. بنابراین تغییر در فعالیت ژن *RON1* موجب کاهش معنی دار طول ریشه اصلی در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* شده است.



نمودار ۱- مقایسه میانگین بررسی داده‌های مربوط به صفات مختلف آرابیدوپسیس شامل جوانه‌زنی (الف)، طول ریشه (ب)، تعداد ریشه جانبی (ج) و تعداد برگ (د) در واکنش به غلظت‌های مختلف ABA در گیاهچه‌های مادری *Ler-0* و موتانت *ron1-1*.

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی صفات مختلف گیاهچه‌های ژنوتیپ *Ler-0* و *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف IAA

میانگین مربعات			منابع تغییرات	
طول ریشه اصلی	تعداد ریشه جانبی	طول هیپوکوتیل	درجه آزادی	
۹۸/۳۸ **	۷۸۴/۸۹ **	۴/۸۲ **	۱	ژنوتیپ
۱۳۹/۲۴ **	۲۴۳/۸۶ **	۳/۰۵۶ **	۳	تیمار IAA
۹۲/۵۷ **	۲۸/۳۲ n.s	۰/۴۷۹ n.s	۳	ژنوتیپ * تیمار
۳/۲۵	۱۸/۶۲	۰/۱۸	۱۶	خطا
			۲۳	کل
۱۴/۵۱	۱۳/۵	۱۱/۷۳		CV

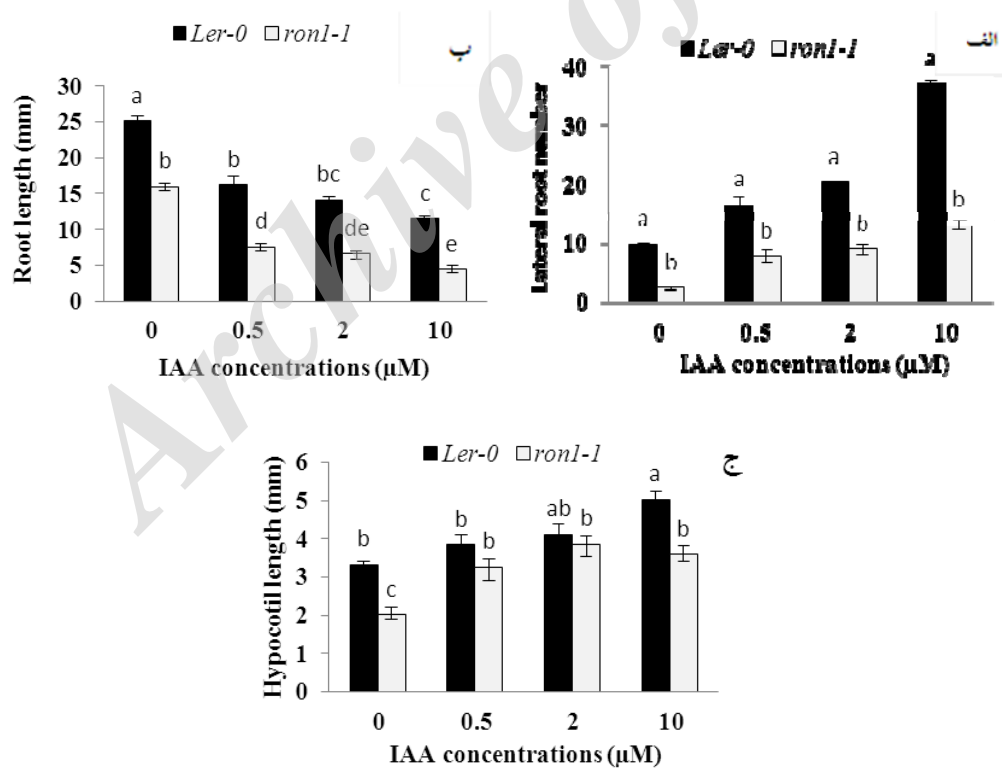
n.s: غیر معنی دار

\*\* : معنی دار در سطح یک درصد

\* : معنی دار در سطح پنج درصد

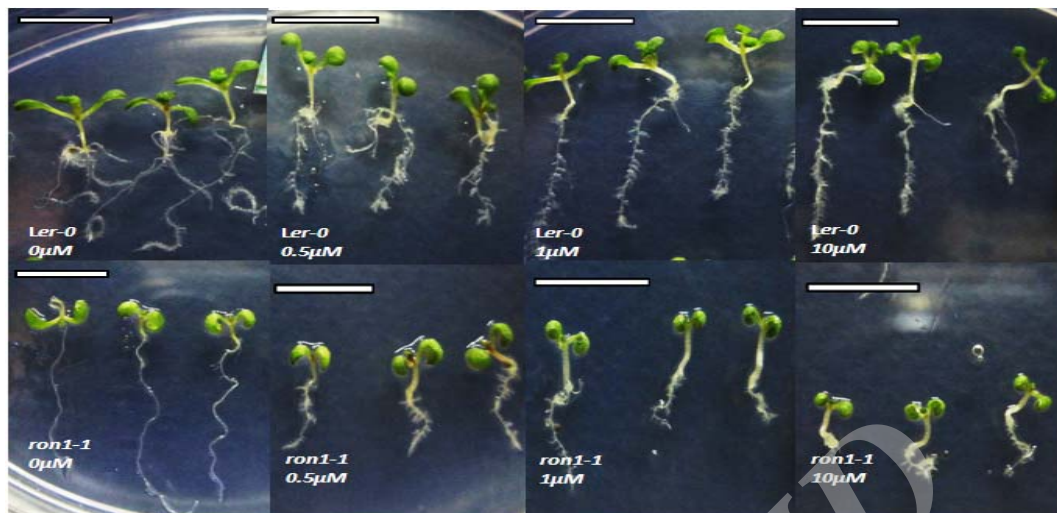


شکل ۲- گیاهچه‌های مادری *Ler-0* و موتانت *ron1-1* رشد کرده در محیط غذایی MS حاوی غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۲ میکرومول) ABA. مقیاس در شکل‌های فوق ۱۰ میلی‌متر می‌باشد.



نمودار ۲- مقایسه میانگین بررسی داده‌های مربوط به صفات مختلف آرابیدوپسیس شامل طول ریشه (الف)، تعداد ریشه جانبی (ب) و طول هیپوکوتیل (ج) در واکنش به غلظت‌های مختلف IAA در گیاهچه‌های مادری *Ler-0* و موتانت *ron1-1*.





شکل ۳- گیاهچه‌های مادری *Ler-0* و موتانت *ron1-1* رشد کرده در محیط غذایی MS حاوی غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۱۰ میکرومول) IAA. مقیاس در شکلها ۱۰ میلی‌متر می‌باشد.

افزایش غلظت IAA تعداد ریشه جانبی افزایش یافت، بیشترین تعداد ریشه جانبی در ژنوتیپ *Ler-0* در غلظت ۱۰ میکرومول IAA و کمترین تعداد ریشه جانبی در ژنوتیپ موتانت *ron1-1* در غلظت صفر میکرومول (شاهد) مشاهده شد (نمودار ۲-ب).

تأثیر غلظت‌های مختلف IAA بر طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های مادری و موتانت نشان می‌دهد که طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ موتانت *ron1-1* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف IAA نسبت به ژنوتیپ مادری *Ler-0* تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد. طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ مادری *Ler-0* در شرایط نرمال در حدود ۱/۵ برابر طول هیپوکوتیل ژنوتیپ موتانت *ron1-1* می‌باشد (جدول ۲، نمودار ۲-ج، شکل ۳). اثر متقابل ژنوتیپ در غلظت‌های مختلف IAA بر صفت طول هیپوکوتیل معنی دار نبود، به طوری که بیشترین طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ *Ler-0* در غلظت ۱۰ میکرومول مشاهده شد و کمترین طول هیپوکوتیل در غلظت صفر میکرومول IAA در ژنوتیپ *ron1-1* مشاهده شد (جدول ۲، نمودار ۲-ج، تصویر ۵). پاسخ گیاهان موتانت به IAA کاهش یافته است و در غلظت‌های ۰/۵، ۲ و ۱۰ میکرومول تفاوت معنی داری در

ژنوتیپ‌ها از نظر صفت تعداد ریشه جانبی و طول هیپوکوتیل نیز دارای تفاوت معنی‌داری در واکنش به غلظت‌های مختلف IAA می‌باشند، به نحوی که بیشترین تعداد ریشه جانبی و طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ مادری مشاهده می‌شود (جدول ۲، نمودار ۲-ب، ج، شکل ۳). تأثیر غلظت‌های مختلف IAA بر تعداد ریشه جانبی در گیاهچه‌های مادری و موتانت نشان می‌دهد که تعداد ریشه جانبی در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف IAA نسبت به بذرهاي مادری *Ler-0* کاهش معنی داری داشته‌است (جدول ۲، نمودار ۲، شکل ۳). در شرایط نرمال تعداد ریشه جانبی ژنوتیپ *Ler-0* بیش از سه برابر ژنوتیپ موتانت *ron1-1* می‌باشد. با افزایش غلظت IAA تعداد ریشه جانبی در هر دو ژنوتیپ موتانت و مادری افزایش می‌یابد، اما شدت افزایش تعداد ریشه جانبی در ژنوتیپ *Ler-0* بسیار بیشتر از ژنوتیپ موتانت *ron1-1* می‌باشد. به نحوی که تعداد میانگین ریشه جانبی ژنوتیپ *Ler-0* از غلظت صفر تا ۱۰ میکرومول در حدود ۲۷ عدد افزایش یافته، این در حالی است که در ژنوتیپ موتانت میانگین افزایش ۱۲ عدد می‌باشد (جدول ۱، نمودار ۲-ب، شکل ۳). بنابراین در گیاهچه‌های موتانت و مادری با

طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ مادری و کمترین در ژنوتیپ موتانت مشاهده می‌شود. همچنین غلظت‌های مختلف ACC نیز دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشند. اثر متقابل ژنوتیپ در غلظت‌های مختلف ACC بر صفت طول ریشه و طول هیپوکوتیل نیز معنی‌دار است (جدول ۳). بیشترین طول ریشه و طول هیپوکوتیل در ژنوتیپ *Ler-0* در غلظت صفر میکرومول (شاهد) مشاهده شد. جالب اینکه طول ریشه و طول هیپوکوتیل در تمام غلظت‌های ACC در هر دو ژنوتیپ *Ler*, *ron1-1* به کمترین میزان خود رسید (جدول ۳، نمودار ۳-الف و ۳-ب). در شرایط نرمال اندازه طول ریشه ژنوتیپ مادری دو برابر و طول هیپوکوتیل ژنوتیپ مادری سه برابر ژنوتیپ موتانت می‌باشد (نمودار ۳-الف و ۳-ب). از این‌رو با افزایش غلظت ACC، ژنوتیپ *Ler-0* واکنش بیشتری در مقایسه با ژنوتیپ *ron1-1* نشان می‌دهد. جالب اینکه با افزایش غلظت ACC تفاوت قابل توجهی در زمینه طول ریشه و طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* مشاهده نشد. بنابراین تغییر در فعالیت ژن *RON1* موجب کاهش معنی‌دار طول ریشه اصلی و طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* نشده است و حتی در گیاهچه‌های *Ler-0* واکنش این گیاهان به ACC کاهش یافته است.

طول هیپوکوتیل در پاسخ به IAA در موتانت *ron1-1* مشاهده نشد. بنابراین تغییر در فعالیت ژن *RON1* موجب کاهش معنی‌دار طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* شده است.

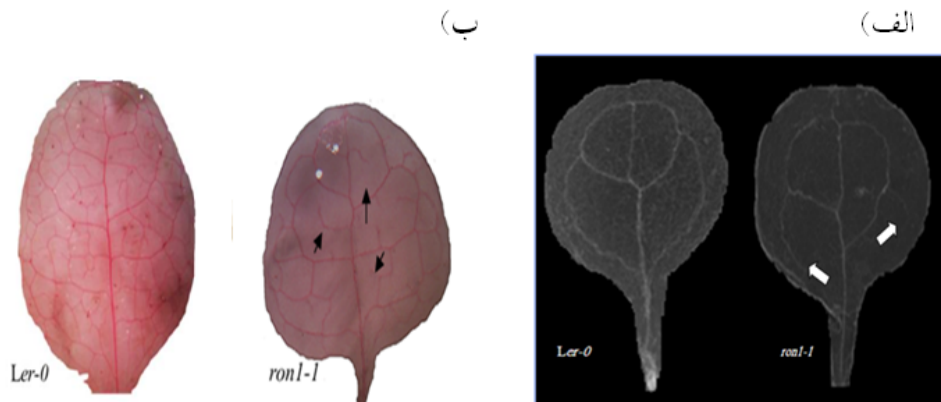
در آزمایش فوق بررسی وضعیت رگبرگی گیاهچه موتانت *ron1-1* در مقایسه با ژنوتیپ مادری در سن ۳۰ روزه‌گی نیز مورد بررسی قرار گرفت. بررسی رگبرگ‌ها در کوتیلدون‌های گیاهچه‌های *ron1-1* نشان داد که رگبرگ در این گیاهچه‌ها باز است. در حالی که در ژنوتیپ *Ler-0* هیچ رگبرگ بازی مشاهده نمی‌شود. از بررسی برگ‌های سوم نیز مشخص شد که گیاهان موتانت *ron1-1* دارای شبکه‌های رگبرگی ثانویه باز و ساختار رگبرگی ضعیفی می‌باشند، در حالی که در ژنوتیپ *Ler-0* بیشترین شبکه رگبرگی مشاهده می‌شود و این رگبرگ‌ها دارای بیشترین پیوستگی می‌باشد (شکل ۴) و با افزایش سن گیاه تفاوت قابل توجهی در زمینه پیوستگی رگبرگ‌ها در ژنوتیپ موتانت در مقایسه با پژوهش روبلز و همکاران (۲۰۱۰) که در سن ۲۲ روزه‌گی انجام شده بود، مشاهده نشد.

آنالیز داده‌های بدست‌آمده از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف ACC بر طول ریشه و طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های مادری و موتانت نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌ها در زمینه صفت طول ریشه و طول هیپوکوتیل دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشند (جدول ۳). بیشترین طول ریشه و

جدول ۳- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی صفات مختلف در گیاهچه‌های ژنوتیپ *Ler-0* و *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف

ACC			منابع تغییرات	درجه آزادی
میانگین مربعات				
طول ریشه	طول هیپوکوتیل	قطر ریشه		
۶/۴۱ **	۲۲/۰۲ **	۰/۰۰۷ **	ژنوتیپ	۱
۱۵/۰۵ **	۹/۲۱ **	۰/۰۳ **	تیمار ACC	۴
۷/۰۱ **	۴/۰۸ **	۰/۰۰۱ n.s	ژنوتیپ* تیمار	۴
۰/۲۲	۰/۱۱	۰/۰۰۰۸	خطا	۲۰
			کل	۲۹
۱۵/۵۷	۱۰/۵۱	۹/۷۶	CV	

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



شکل ۴- بررسی تأثیر جهش‌های *ron1-1* در ژن *RONI* بر وضعیت رگبرگ‌های گیاهچه‌های ۳۰ روزه آراییدوپسیس تالیانا، الف: کوتیلدون‌ها ب: برگ سوم. فلش‌ها نشان‌دهنده باز بودن شبکه رگبرگی در گیاهچه‌های موتانت است.

بر واکنش موتانت *ron1-1* نداشته و به نظر می‌رسد سیگنالینگ اتیلن در گیاه موتانت *ron1-1* مختل شده است.

### بحث

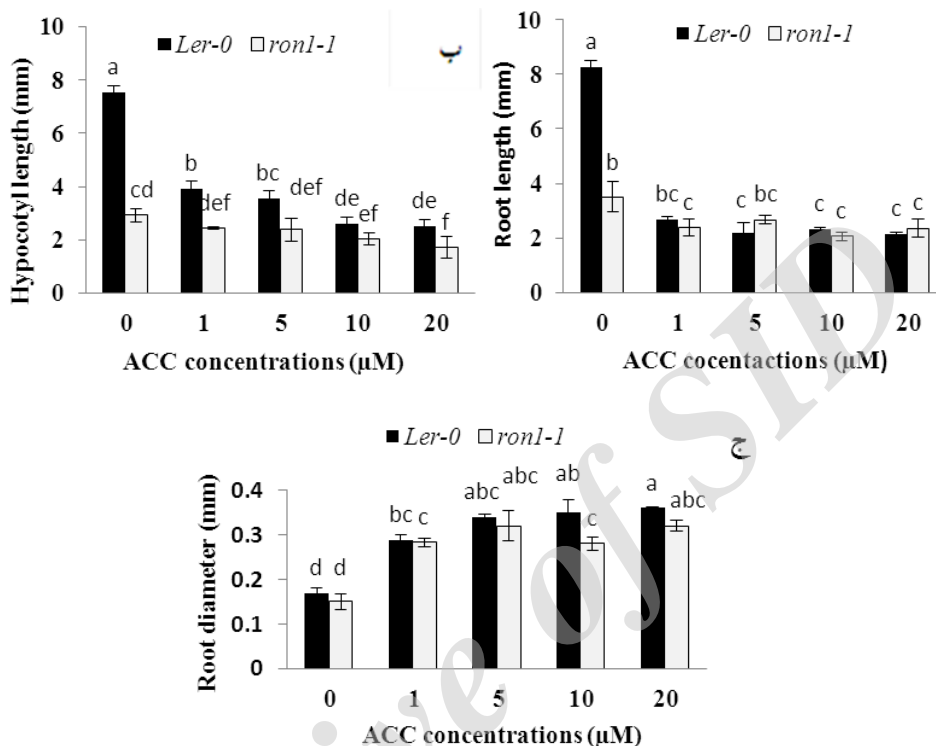
گیاهان موتانت *ron1-1* دارای یک موتاسیون جدید در ژن *FRY1* در والد *Ler-0* بوده که از دیگر موتانت‌های گزارش شده در این ژن متمایز می‌باشند. با تغییر والد بخش زیادی از محتوای ژنومی تغییر می‌کند و وجود فاکتورهایی مانند مدیفایرها در ژنوم (Genome Modifiers) می‌تواند تأثیر موتاسیون بر خصوصیات گیاه میزبان را تغییر دهد. این عوامل می‌توانند اثرات حتی یک موتاسیون مشابه را در والدین مختلف به نحو قابل توجهی تغییر دهند (۱۸). در این پژوهش یک موتاسیون مشابه در ۲ والد مختلف *Ler-0* و *Col-0* بدلیل عوامل تغییر دهنده فوق منجر به بروز فنوتیپ‌های مختلفی در شرایط آزمایش مشابه شد. در گزارش دیگری عوامل تغییر دهنده فوق شناسایی شدند (۱۱). ژن *FRY1* دارای عملکردهای متعددی بوده و موتاسیونهای مختلفی در آن در زمینه‌های ژنومی متفاوت تا کنون شناسایی شده است که با توجه به اینکه موتاسیون در کدام آگزون این ژن و در چه زمینه ژنتیکی رخ داده شاهد واکنش‌های مختلفی در گزارش‌های علمی (۵) بوده ایم. از آنجائیکه ژن *RONI/FRY1* دارای فعالیت‌هایی در ارتباط با بیوستز، سیگنالینگ و انتقال سه

بنابراین تغییر در فعالیت ژن *RONI* موجب کاهش معنی دار طول هیپوکوتیل و طول ریشه در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* نشده است، همچنین واکنش این گیاهان به *ACC* کاهش یافته است.

آنالیز داده‌های بدست‌آمده از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف *ACC* بر قطر ریشه در گیاهچه‌های مادری و موتانت نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌ها در صفت قطر ریشه دارای تفاوت معنی داری می‌باشند، بیشترین قطر ریشه در ژنوتیپ مادری و کمترین قطر ریشه در ژنوتیپ موتانت مشاهده می‌شود. همچنین غلظت‌های مختلف *ACC* نیز دارای تفاوت معنی داری می‌باشند. آنالیز داده‌های بدست‌آمده نشان می‌دهد که اثر متقابل ژنوتیپ در غلظت‌های مختلف *ACC* بر صفت قطر ریشه معنی دار نبوده است. لازم به ذکر است که با افزایش غلظت *ACC* از صفر به ۲۰ میکرومول قطر ریشه در هر دو ژنوتیپ موتانت و مادری ۷ برابر شده است. بیشترین قطر ریشه در ژنوتیپ *Ler-0* در غلظت ۲۰ میکرومول مشاهده شد و کمترین قطر ریشه در غلظت - صفر میکرومول در ژنوتیپ *ron1-1* مشاهده شد (جدول ۳، نمودار ۳-ج). آزمون تغییرات سه‌گانه با هدف سنجش و بررسی سالم بودن مسیر سیگنالینگ اتیلن در موتانت *ron1-1* انجام شد. هورمون خارجی پیش ساز اتیلن تأثیری

*Ler-0* است ضروریست. این موتاسیون نقطه‌ای منجر به از عدم تولید پروتئین RON1 در گیاهچه‌های موتانت شده است.

هورمون اتیلن، اسید آسبیزیک و اکسین می‌باشد، از این رو بررسی گیاهچه‌های *ron1-1* که دارای یک موتاسیون منحصر بفرد در مرز اگزون و اینترون شماره ۲ و در والد



نمودار ۳- مقایسه میانگین بررسی داده‌های مربوط به صفات مختلف آرابیدوپسیس شامل طول ریشه (الف)، طول هیپوکوتیل (ب) و قطر ریشه (ج) در *ron1-1* و موتانت *Ler-0* در گیاهچه‌های مادری ACC در گیاهچه‌های مادری *Ler-0* و موتانت *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف ACC در گیاهچه‌های مادری *Ler-0* و موتانت *ron1-1*

موتانت شده است، که این تجمع باعث کاهش عملکرد ژن *fry1* شده و می‌تواند موجب کاهش تعداد ریشه جانبی، طول ریشه اصلی و طول هیپوکوتیل شود (۵). اختلال در بیان ژن *FRY1/RON1* در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* در عدم حضور ABA موجب کاهش تعداد ریشه جانبی شده که این روند با افزایش غلظت‌های ABA تشدید می‌شود. موتانت‌هایی که بر سنتز اکسین تأثیر می‌گذارند تأثیر قابل توجهی بر خصوصیات گیاهچه‌ها در زمینه تشکیل ریشه جانبی، طول ریشه موئی، طول ساقه و کاهش تعداد برگ نشان می‌دهند (۱۷). از جمله دلایل کاهش طول ریشه در موتانت‌های *fry1* می‌تواند به دلیل افزایش خاموشی برخی ژن‌ها مثل *NAC1* باشد. این ژن واسطه رشد ریشه

وقوع موتاسیون در ژن *RON1* موجب کاهش قابل توجه میزان جوانه زنی در بذره‌های موتانت *ron1-1* در واکنش به غلظت‌های مختلف ABA شد. کاهش قابل توجه میزان جوانه زنی فوق در بذره‌های موتانت *ron1-1* و همچنین کاهش تعداد ریشه جانبی با افزایش غلظت ABA در گیاهچه‌های موتانت و مادری می‌تواند به این دلیل باشد که در حضور ABA میزان جوانه زنی کاهش و توسعه ریشه جانبی مهار می‌شود، این اتفاق بلافاصله بعد از ظهور پریموردیای ریشه جانبی و قبل از فعال شدن مریستم ریشه جانبی رخ می‌دهد (۴). بنابراین با افزایش غلظت ABA میزان مهار ریشه جانبی نیز افزایش خواهد یافت. جهش در ژن *FRY1/RON1* باعث تجمع PAP در سلول‌های گیاهان

افزایش یافته است. در حالی که این افزایش در گیاهچه های موتانت قابل توجه نیست. تفاوت فوق در میزان افزایش تعداد ریشه های جانبی بین گیاهچه های مادری و موتانت می‌تواند به این دلیل باشد که از آنجائیکه *FRY1/RON1* توسعه ریشه جانبی را از طریق فعالیت بر آدنوزین ۳ و ۵ بیوفسفات (PAP) که یک مهارکننده قوی آگزوریونوکلئازی (XRN) است، تنظیم می‌کند (۵). از این رو جهش در این ژن می‌تواند منجر به نقص در توسعه ریشه جانبی شود. اینگونه استنباط می‌شود که موتانت *ron1-1* نیز مانند موتانت‌هایی که بر سنتز اکسین تأثیر می‌گذارد، تأثیر قابل توجهی بر تشکیل ریشه جانبی، طول ریشه موئی و طول هیپوکوتیل دارند (۱۷). یکی از علل نقص ریشه جانبی در موتانت‌های *fry1* افزایش خاموشی ژن *NAC1* در انواع خاصی از سلول‌ها می‌باشد. این ژن واسطه رشد ریشه جانبی می‌باشد و پایین دست ژن *TIR1* قرار دارد و توسط *miRNA164* سرکوب می‌شود و رشد ریشه جانبی را کاهش می‌دهد (۵). جهش در ژن *RON1* در گیاهچه‌های موتانت در عدم حضور IAA موجب کاهش تعداد ریشه-جانبی شده که این روند با افزایش غلظت‌های IAA تا حدودی تغییر یافته و افزایش تعداد ریشه جانبی را نشان می‌دهد. از آنجایی که فعالیت ژن *FRY1/RON1* بر میزان اکسین تولید شده در گیاه مؤثر است، جهش در این ژن موجب کاهش سطوح بیان برخی از پیش‌سازهای اکسین از جمله ایندول-۳-استونیتریل می‌شود (۱۷). از این رو به نظر می‌رسد موتاسیون *ron1-1* می‌تواند بر میزان بیان ژن-های مرتبط مؤثر بوده و میزان تولید هورمون اکسین و IAA را تغییر دهد. گیاهان موتانت *fry1* در ژن *FRY1/RON1* دارای موتاسیون می‌باشند، بیان این ژن در شرایط تنش در گیاهان نرمال زیاد می‌شود تا گیاه از طریق محصولات این ژن به شرایط تنش (افزایش غلظت هورمون) پاسخ دهد، اما در شرایط تنش عملکرد این ژن دچار اختلال شده و گیاهان موتانت قادر نخواهند بود مانند گیاهان مادری به تنش پاسخ دهند (۳). آنزیم PAP یک محصول از ژن

بوده و در پایین دست *TIR1* قرار دارد (۵). ژن *FRY1/RON1* توسعه ریشه جانبی را از طریق فعالیت بر آدنوزین ۳ و ۵ بیوفسفات (PAP) تنظیم می‌کند که یک مهارکننده قوی آگزوریونوکلئازی (XRN) است (۵). بیشترین میزان طول ریشه در ژنوتیپ مادری و کمترین طول ریشه در ژنوتیپ *ron1-1* مشاهده شد. ژن *FRY1/RON1* که روی شکل‌گیری ساختار ریشه و همچنین شرایط تنش نقش دارد (۵ و ۱۷) در ژنوتیپ موتانت *ron1-1* حاوی یک موتاسیون نقطه‌ای می‌باشد. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ *ron1-1* دارای طول ریشه، تعداد برگ و تعداد ریشه جانبی کمتری نسبت به ژنوتیپ مادری خود می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد جهش *ron1-1* با اختلالی که در عملکرد ژن *FRY1/RON1* ایجاد می‌کند، باعث تجمع IP3 در بذرهای موتانت در حال جوانه‌زنی شده و بذرهای موتانت با تولید ABA به تجمع IP3 پاسخ می‌دهند و این امر منجر به کاهش و تأخیر در جوانه‌زنی بذرهای موتانت نسبت به بذرهای مادری می‌باشد. از آنجایی که گیاهان موتانت بدلیل جهشی که در ژن *FRY1/RON1* دارند دارای مقدار بیشتری ABA درون سلولی در شرایط نرمال در مقایسه با ژنوتیپ‌های مادری هستند. احتمالاً مقدار ABA در شرایط تنش در ژنوتیپ موتانت افزایش می‌یابد (۲۳). یکی از عملکردهای ژن *FRY1/RON1* در سیگنالینگ ABA می‌باشد و به دلیل اینکه برخی از موتانت‌های دیگر این ژن مانند *fry1-1* در سیگنالینگ و درک ABA اختلال دارند، بنابراین به نظر می‌رسد احتمالاً موتانت *ron1-1* نیز در سیگنالینگ ABA دارای اختلال است. به همین دلیل در غلظت‌های مختلف این هورمون علاوه بر جوانه زنی برخی دیگر از خصوصیات مورفولوژیکی نیز بررسی شد تا اثر این هورمون در برخی دیگر از صفات مورفولوژیکی نیز بررسی شود.

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد با افزایش غلظت IAA تعداد ریشه جانبی در گیاهچه های مادری به نحو قابل توجهی

ژنوتیپ موتانت در مقایسه با پژوهش رویلز و همکاران (۲۰۱۰) که در سن ۲۲ روزه‌گی انجام شده بود، مشاهده نشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که چون ژن *RON1/FRY1* کد کننده آنزیم اینوزیتول پلی فسفات-۱-فسفاتاز و  $3'/5'$  و  $2'/5'$  بیس فسفات نوکلئوتیداز می‌باشد، و تعیین‌کننده الگوی قرار گیری رگبرگ‌ها نیز می‌باشد. جهش *fry1/ron1-1* و جهش‌هایی که بر سنتز اکسین تأثیر می‌گذارد، در الگوی قرار گرفتن رگبرگ اختلال و تغییر ایجاد می‌کنند (۱۷). ژن *RON1* بر سنتز اکسین مؤثر است، موتانت‌های *ron1-1* در سطح بیان ۳۸ متابولیت از جمله مایواینوزیتول و ایندول-۳-استونیتیل (پیش ساز اکسین) دارای اختلال می‌باشند (۷ و ۱۷). بنابراین برخی از موتانت‌های این ژن (مانند *ron1-1*)، به دلیل اختلال در بیان ژن *RON1/FRY1* که مؤثر بر سنتز پیش سازهای اکسین و بیان ژن‌های پایین دست از جمله *CVP2* (*COTYLEDON VASCULAR PATTERN5*) که مؤثر بر شکل‌گیری رگبرگ می‌باشند، دچار اختلال می‌باشد. بنابراین شبکه رگبرگی باز در برخی از موتانت‌های *ron1-1* مشاهده می‌گردد.

با توجه به نتایج بدست‌آمده در این پژوهش، با افزایش غلظت ACC تغییرات چندانی در کاهش طول ریشه و هیپوکوتیل ژنوتیپ موتانت *ron1-1* مشاهده نمی‌شود، از این‌رو شاهد کاهش پاسخ اتیلن در این ژنوتیپ می‌باشیم. لازم به ذکر است که با افزایش غلظت ACC در گیاهان موتانت *ron1-1* بر خلاف ژنوتیپ مادری پیچیدگی رأسی را مشاهده نمی‌کنیم که احتمالاً ناشی از عدم درک اتیلن می‌باشد. مطابق نمودار ۳- الف و ۳- ب ژنوتیپ *ron1-1* از نظر دو صفت ذکر شده دارای تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ مادری می‌باشد. از آنجایی که ژنوتیپ مادری *Ler-0* از مسیر بیوستتر، درک و سیگنالینگ اتیلن نرمالی برخوردار است، بنابراین ژنوتیپ *ron1-1* بدلیل داشتن تفاوت معنی‌دار از لحاظ صفات بررسی شده در مقایسه با ژنوتیپ مادری احتمالاً دچار اختلال در مسیر بیوستتر،

می‌باشد که یک مهارکننده قوی آنزیم‌های ساخت RNA می‌باشد. مطالعات انجام شده در موتانت *fry1-1* نشان می‌دهد که کاهش تولید ریشه جانبی به دلیل از دست رفتن فعالیت PAP در موتانت‌های های ژن *FRY1/RON1* می‌باشد. موتانت‌های *FRY1/RON1* ویژگی موتانت‌های مقاوم به اکسین را مثل کاهش رشد، کوتاه شدن هیپوکوتیل و کاهش چشمگیر رشد ریشه‌جانبی نشان می‌دهد (۵). لازم به ذکر است که اکسین (IAA) در غلظت‌های بالاتر از  $10^{-8}$  مولار بر طولی شدن ریشه‌های اولیه اثر بازدارندگی دارد، ولی تشکیل ریشه جانبی به وسیله مقادیر زیاد اکسین تحریک می‌شوند (۱). افزایش تعداد ریشه‌جانبی در گیاهان موتانت *ron1-1* بدلیل جهش در ژن *RON1* بسیار کمتر می‌باشد. بنابراین جهش *ron1-1* موجب تغییر در تعداد ریشه جانبی و طول ریشه اصلی و طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های موتانت می‌شود (۱۷). به دلیل اینکه موتانت *ron1-1* در سنتز برخی از پیش سازهای اکسین اختلال دارد، بنابراین به نظر می‌رسد احتمالاً در درک هورمون IAA نیز دچار اختلال باشد. از این رو این گیاهان موتانت تحت تیمار غلظت‌های مختلف هورمون IAA بررسی شدند تا میزان درک این هورمون در ژنوتیپ موتانت در مقایسه با ژنوتیپ مادری مقایسه گردد. نتایج نشان دادند که مقدار افزایش طول هیپوکوتیل و تعداد ریشه در این موتانت با افزایش غلظت IAA نسبت به ژنوتیپ مادری بسیار کمتر می‌باشد.

در آزمایش بررسی وضعیت رگبرگ گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* در مقایسه با ژنوتیپ مادری مشاهده شد که رگبرگ‌ها در گیاهچه موتانت *ron1-1* باز است، در حالی که در ژنوتیپ *Ler-0* هیچ رگبرگ بازی مشاهده نمی‌شود. از بررسی برگ‌های سوم مشخص شد که گیاهان موتانت *ron1-1* دارای شبکه‌های رگبرگی ثانویه باز و ساختار رگبرگی ضعیفی می‌باشند (شکل ۴)، و با افزایش سن گیاه تفاوت قابل توجهی در زمینه پیوستگی رگبرگ‌ها در

مقاومت به خشکی، احساس و سیگنالینگ هورمون، الگوی تشکیل رگبرگ، حساسیت به نور غیر نرمالی را از خود بروز می‌دهد (۱۰). از ژن‌هایی که در مسیر درک اتیلن مؤثر می‌باشند می‌توان به *XRN4* اشاره کرد. از آنجایی که در گیاهان موتانت *ron1/fry1* بیان این ژن دچار اختلال شده می‌توان درک پایین اتیلن توسط گیاهان موتانت را به عدم بیان *XRN4* در گیاهان موتانت مرتبط دانست. *XRN4* به عنوان جزء جدایی‌ناپذیر در سیگنالینگ اتیلن می‌باشد. تخریب RNA توسط *XRN4* به عنوان یکی فرایندهای پس از رونویسی می‌باشد که در درک این هورمون گیاهی مؤثر می‌باشد (۱۶).

بنابر نتایج بدست آمده از این پژوهش، جهش در ژن *FRY1/RON1* منجر به اختلال در درک و پاسخ به تنش ایجاد شده توسط سه هورمون ACC, ABA, IAA در گیاهچه‌های موتانت شده است و این موتانت در پاسخ به هورمون‌ها کاملاً متفاوت از ژنوتیپ مادری بوده و مسیر سیگنالینگ IAA, ABA, آن به شدت تضعیف شده و سیگنالینگ اتیلن آن به طور کامل از کار افتاده و گیاهچه‌های ۵ روزه قادر به درک اتیلن نیستند.

درک و سیگنالینگ اتیلن می‌باشد. بنابراین براساس بررسی‌های انجام شده جهش *ron1-1* در گیاهچه‌های موتانت *ron1-1* عامل اصلی تفاوت معنی‌دار با گیاهچه‌های مادری *Ler-0* در دو صفت طول هیپوکوتیل و طول ریشه است. شواهد نشان می‌دهد که مسیرهای سیگنالینگ اکسین و اتیلن در هم تنیده است. در واقع، بسیاری از موتانت‌های اکسین، مانند *aux1, axr1, axr2, axr3, eir, wei* دارای پاسخ‌های متفاوتی به اتیلن هستند (۵). بنابراین کاهش القا و تولید IAA در موتانت *ron1-1* می‌تواند با اختلال در پاسخ به اتیلن در این گیاه موتانت در ارتباط باشد. از وظایف ژن *FRY1/RON1* می‌توان به تجزیه PAP به Amp و  $P_i$  اشاره کرد، که این امر منجر به بیان ژن‌های *XRN2, XRN3, XRN4* در گیاه شده و طی این روند ما شاهد ساختار ریشه مناسب، مقاومت به خشکی، ساختار مناسب برگ، احساس و سیگنالینگ هورمون، الگوی تشکیل رگبرگ، حساسیت به نور و... می‌باشیم. اما در صورت بروز جهش در ژن، PAP بدلیل عدم تجزیه توسط ژن *ron1/fry1* در سلول تجمع می‌یابد و منجر به عدم بیان ژن‌های *XRN2, XRN3, XRN4* شده و ساختار ریشه،

## منابع

- ۱- تاینز، ل. زایگر، الف. (۱۳۸۸). فیزیولوژی گیاهی. ترجمه کافی، م. زند، الف. کامکار، ب. عباسی، ف و مهدوی دامغانی، ع. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- ۲- عمواقایی، ریحانه. ۱۳۹۲. تأثیر برخی هورمون‌ها و ترکیبات ازته روی ظرفیت، سرعت و هماهنگی جوانه زنی بذرهای قیچ تحت تنش شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی. جلد ۲۶، شماره ۴. صفحه ۴۶۶
- ۳- نجفی، فرزانه. محمدی، ف. ۱۳۹۴. تأثیر ایندول استیک اسید بر میزان رشد، پروتئین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در تحت تنش آلومینیوم کلراید (*Glycine max(L) Merr*) گیاه سویا. مجله پژوهش‌های گیاهی. جلد ۲۸، شماره ۱. صفحه ۱۸۷
- 4- Boyer, J.S. (1982) Plant productivity and environment. Science. 218: 443-448.
- 5- Chen, H. and Xing, L. (2010) The bifunctional abiotic stress signaling regulator and endogenous RNA silencing suppressor *FIERY1* is required for lateral root formation. Plant Cell Environment. 33: 2180-90.
- 6- De Smet, I., Signora, L. Beekman, T. Inze, D. Foyer, C.H. and Zhang, H. (2003) An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. The Plant Journal. 33:543-555.
- 7- Francine, M. C. and Nelson, T. (2004). *COTYLEDON VASCULAR PATTERN2*-Mediated Inositol (1,4,5) Triphosphate Signal Transduction Is Essential for Closed Venation Patterns of *Arabidopsis* Foliar Organs. The Plant Cell. 16:1263-1275

- 8- Fukaki, H. and Tasaka, M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*. 69: 437–449.
- 9- Guzman, P. and Ecker, J. R. (1990) Exploiting the Triple Response of *Arabidopsis* To Identify Ethylene-Related Mutants. *The Plant Cell*. 2: 513-523.
- 10- Hirsch, J., J. Misson, P. A. Crisp, P. David, V. Bayle, G. M. Estavillo, H. Javot, S. Chiarenza, A. C. Mallory, and A. Maizel. (2011) A novel *fry1* allele reveals the existence of a mutant phenotype unrelated to 5' -> 3' exoribonuclease (XRN) activities in *Arabidopsis thaliana* roots. *PloS one* (6)2: 1672.
- 11- Jibrán, R., Hunter, D. A. and Dijkwel, P.P.(2013). Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Molecular Biology* 82, 547–561.
- 12- Levitt, J. (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press.
- 13- Ljung, K., Bhalerao, R. P. and Sandberg, G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant journal*. 29: 325–332.
- 14- Mahajan, S., and N. Tuteja. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*. 444:139-158.
- 15- Overvoorde, P., Fukaki, H. and Beeckman, T. (2010) Auxin Control of Root Development. *Cold spring harb perspect biology*, 2:1537.
- 16- Potuschak T., Vansiri, A. Binder, B.M., Lechner, E., Vierstra, R.D. and Genschik, P. (2006) The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 18: 3047–3057.
- 17- Robles, P., Fleury, D. Candela, H. Cnops, G., Alonso Peral, M. M. and Anami, S. (2010) The *RON1/FRY1/SAL1* gene is required for leaf morphogenesis and venation patterning in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 152:1357-72.
- 18- Shirzadian-Khorramabad R, Jing H. C, Everts G. E, Schippers J. H. M, Hille J, Dijkwel, P. P. (2010) A mutation in the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase induces a genome-dependent early leaf death phenotype in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*10:80.
- 19- Stepanova, A., Ecker, J. (2000) Ethylene signaling. From mutants to molecules. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 353-360.
- 20- Speed, C.J., Little, P. J., Hayman, J.A. and Mitchell, C.A. (1996) Underexpression of the 43 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase associated with cellular transformation. *EMBO Journal*. 15: 4852–4861.
- 21- Wang, K., Li, H. and Ecker, J. (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *Plant cell*. 14(Suppl1): S131-S151.
- 22- Wilson, P. B., Estavillo, G. M. Field, K. J. Pornsiriwong, W. Carroll, A. J. Howell, K. A. Woo, N. S. Lake, J. A. Smith, S. M. Harvey Millar, A. von Caemmerer S. and B. J. Pogson. (2009). The nucleotidase/phosphatase *SAL1* is a negative regulator of drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 58 :299-317.
- 23- Xiong, L., Lee, B. H., Ishitani, M., Lee H., Zhang C., Zhu, J.K. (2001) *FIERY1* encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Development*. 15: 1971-1984.
- 24- Xiong, L., Schumaker, K. S., and Zhu, J. K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*. 14 (suppl 1):S165-S183.
- 25- Zakarias, L. and Reid, M.S. (1990) Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiologia Plantarum*. 80:549-554.



## Effects of unfunctional RON1 enzyme in mutant plants *ron1-1* in response to hormonal-induced stress in *Arabidopsis*

Royan S.<sup>1</sup>, Shirzadian-Khoramabad R.<sup>1</sup>, Sabouri A.<sup>2</sup> and Zavareh M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Agricultural Biotechnology Dept., Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

### Abstract

Plants normally change their hormone levels in response to biotic and abiotic stresses. Since RON1 affects either signaling or biosynthesis of hormones abscisic acid (ABA), Indol Acetic Acid (IAA) and Ethylene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), therefore, The effect of change in RON1 activity on several morphological characteristics including vein pattern, lateral root formation, hairy root, stem, root and apical has been investigated. Hereby, morphological and molecular characteristics of *ron1-1* mutant was evaluated and compared with the Ler-0 wild type plants in response to different concentrations of hormone IAA, ABA and ACC *in vitro* conditions. Based on the obtained results, there is a significant difference between primary root length, lateral root number, leaf number and rate of germination in mutant seedlings *ron1-1* when compared with the wild type seedlings in response to Different concentrations of ABA, ACC, and IAA. Moreover, Investigation of cotyledon and leaf veins in *ron1-1* mutant showed that secondary veins give open networks in *ron1-1*, while genotype *Ler-0* has joined the network of veins. Overall, the results here indicate that a considerable increase in sensitivity of *ron1-1* and *old101* mutant plants to hormonal -induced stress has been observed in mutant seedlings comparison with the *Ler-0* plants. RON1 enzyme activity has gone in *ron1-1* plants, which causes PAP accumulation and possibly IP3 in mutant, changing the morphological characteristics associated with the mutant seedlings.

**Key words:** *Arabidopsis*, ACC, ABA, IAA, hormones Stress, *RON1/FRY1*