

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

Comparison of Induced Gene Response to Stressful Treatment in *Spinacia oleracea* and *Brassica napus*سعید نواب پور^{۱*}، محمد باقر باقریه^۲ و رحیم حداد^۳

چکیده

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

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

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

* نویسنده مسوول

کلزا (*Brassica napus*) به عنوان یکی از گیاهان روغنی مهم در مناطق معتدله دارای طیف وسیعی از سازگاری اقلیمی است. روغن کلزا در مقام مقایسه با روغن حاصله از دانه های روغنی ممتاز آفتابگردان، ذرت و سویا به دلیل حضور اسیدهای چرب اشباع نشده و فاقد کلسترول از کیفیت تغذیه ای بالایی برخوردار است (شریعتی و قاضی، 1379). سبزیجات برگی امروزه در دنیا به صورت گسترده ای کشت می شوند و به سبب ارزش غذایی فراوانی که دارند، جزو محصولات پر اهمیت به شمار می آیند. سبزیجاتی مانند اسفناج (*Spinach*) به لحاظ دارا بودن انواع ویتامین ها، مواد معدنی، مواد پروتئینی و مواد سلولزی نقش بسیار مهمی در تغذیه و سلامتی انسان ایفا می کنند. این دسته از سبزیجات به طور عمده قسمت قابل توجهی از سبد روزانه ی خواربار خانواده را تشکیل می دهند (پیوست، 1381).

نقش مولکول اکسیژن در حیات سلول بر کسی پوشیده نیست. در اغلب واکنش های حیاتی و فعالیت های متابولیک اکسیژن نقش بلامنازعی را ایفا می نماید. با این حال احیای ناقص مولکول اکسیژن می تواند منجر به تولید رادیکال های فعال اکسیژن¹ شود. این رادیکال ها به ویژه در غلظت های بالا پتانسیل اکسیداسیون مولکول های حیاتی سلول نظیر پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی ها را دارا هستند (Golden et al., 2002). در صورتی که غلظت های متعادل این رادیکال ها در القای سازگاری نسبی گیاه برای ایجاد مقاومت در برابر تنش های زنده و غیر زنده حائز اهمیت هستند. از طرفی به عنوان مولکول های سیگنالی در پروسه تنظیم بیان ژن ها ایفای نقش می نمایند (Larkindale et al., 2007). در سلول های گیاهی در خلال واکنش های شدید فتوسنتزی رادیکال های فعال اکسیژن تولید می گردند. اگرچه تعداد این رادیکال ها زیاد است و عموماً طول عمر کوتاهی دارند ولی مهم ترین آن ها شامل اکسیژن اتمی ($1/2 O_2$)، یون سوپر اکسید ($O^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^{\cdot}) هستند. به طور طبیعی توزیع و میزان این رادیکال ها به گونه ای است که نقش مهمی در تنظیم فعالیت های سلول ایفا می نمایند (Pitzshke et al 2006). از آن جمله پراکسید هیدروژن و سوپر اکسید در تشکیل دیواره لیگنینی سلول های گیاهی نقش مهمی دارند (Lewis and Yamamoto, 1990). این رادیکال ها در بیان ژن های مسیر تولید هورمون های اتیلن، اسید جازمونیک و اسید سالسیلیک نقش مهمی ایفا می کنند

مقایسه واکنش بیان ژن های القایی در پاسخ به تیمارهای تنش زا در ...

(Mackerness, 2000). اهمیت یون سوپر اکسید در فعال نمودن ژن های دفاعی نظیر *PR1* و *PR5* ثابت شده است (Mackerness et al., 2001). از طرفی این یون به عنوان یک مولکول سیگنالی ثانویه با کنترل میزان تولید پراکسید هیدروژن روند بیان برخی ژن های دفاعی و فتوسنتزی را تعدیل می نماید. در این ارتباط پراکسید هیدروژن با افزایش فعالیت مسیر متابولیکی آنزیم *MAP* کیناز الگوی زمان بندی باز و بسته شدن روزنه ها را به عنوان یک واکنش دفاعی نسبت به شرایط تنش تنظیم می نماید (Neill et al., 2001). نتایج برخی مطالعات مبین تشابه نسبی فعالیت رادیکال های آزاد اکسیژن در سلول های جانوری و گیاهی است. دوک و میئورا (Doke and Miura, 1995) با بررسی میزان آنزیم *NADPH* اکسیداز در سیب زمینی گزارش نمودند روند افزایش نسبی میزان این آنزیم همبستگی بالایی با مقادیر ROS دارد و با القای مقاومت، نقش مهمی در حفاظت غشاء سلولی (شبهه آنچه در سلول های جانوری است) دارد. نتایج مشابهی توسط کلوپ و همکاران (Kolupae et al., 2008) در القای مقاومت به تنش گرمایی گزارش شده است. یکی از فعالیت های مهم رادیکال های اکسیژن نقش انکار ناپذیر آن ها در فرایند فیزیولوژیک پیری² است. اهمیت فرایند پیری در سلول های گیاهی عمدتاً به روند تجزیه مولکول های بزرگ و انتقال مواد حاصله به اندام های ذخیره ای و دانه ها بر می گردد. در این راستا ژن های زیادی با طیف وسیعی از فعالیت فعال می شوند. در میان این ژن ها پروتئازها، نوکلئازها و پراکسیدازها اهمیت بیشتری دارند. قابل ذکر است که در روند پیری فعالیت ژن های زیادی نظیر ژن های فتوسنتزی به شدت کاهش می یابد. اساساً توازن بین فرایند فتوسنتز و پیری به ویژه به لحاظ زمانی حائز اهمیت است. در این ارتباط نقش رادیکال های اکسیژن به عنوان فاکتور تنظیمی فوق العاده مهم است (Choi et al., 2007; Larkindale et al., 2005). این اهمیت در زمان اعمال یا بروز تنش های محیطی که با اختلال در پروسه انتقال الکترون در سیستم فتوسنتزی روند تولید رادیکال ها را تشدید می نماید دو چندان خواهد بود (Pitzshke et al., 2006). بر این اساس و با توجه به مطالب ذکر شده این پژوهش به منظور دستیابی به الگوی افتراقی بیان ژن های مختلف دفاعی و القایی با تغییرات نسبی میزان رادیکال های آزاد و هم چنین بررسی میزان خسارت تنش اکسیداتیو و ارتباط آن با بیان ژن های مورد مطالعه تنظیم شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش از دو گیاه اسفناج و کلزا استفاده گردید بذور گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* cv. Vienna) در شرایط اتاقک رشد با دمای 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری 14 ساعت روشنایی و 10 ساعت تاریکی کشت گردید. با توجه به حساسیت این گیاه به میزان رطوبت مقدار رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد ثابت گردید.

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

در ابتدا در هر گلدان بزرگ 15 کیلوگرمی سه بوته و پس از استقرار کامل به یک بوته تنک شد.

تیمارهای تنش‌زا

در یک سری آزمایش‌های مقدماتی طیف وسیعی از محلول‌ها و ترکیبات شیمیایی در غلظت‌های مختلف بر روی برگ گیاه اسفناج و کلزا اعمال گردید. جدول 1 لیست این ترکیبات را به همراه غلظت‌های به کار رفته نشان می‌دهد. کلیه محلول‌ها به صورت اسپری با کپسول هوای فشرده بر روی برگ در زمان حداکثر رشد رویشی اعمال گردید. زمان نمونه برداری برای کلیه تیمارها شامل 6، 12، 24، 48 و 72 ساعت پس از اعمال تیمارها بود. اعمال تیمار-های آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار صورت پذیرفت. نمونه برداری جهت تعیین تاثیر رادیکال‌های فعال اکسیژن بر میزان خسارت اکسیداتیو و در پی آن بیان ژن‌ها صورت گرفت.

جدول 1: مواد و ترکیبات تنش‌زای مورد استفاده در آزمایش

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

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

استخراج RNA

سنجش TBARM (Thiobarbituric) (Acid Reactive Material)

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

نتایج بحث

در این مطالعه به بررسی تاثیر تیماری‌های تنش‌زا بر سطح اکسیداتیو سلول (فعالیت رادیکال‌های اکسیژن) و در پی آن مقایسه بیان ژن‌ها پرداخته شده است. بر اساس نتایج حاصله با اعمال تیمارهای آزمایشی برای هر دو گیاه تنوع زیادی در بیان ژن‌های مورد مطالعه دیده شد در واقع برخی از ژن‌ها در هر دو گیاه نسبت به بعضی ترکیبات واکنش مثبت نشان دادند در حالی‌که سایر ژن‌ها بسته به نوع گیاه و تیمار مورد استفاده روند متفاوتی از فعالیت را نشان دادند. ترکیباتی مثل نترات آهن و فسفات آلومینیوم روند ثابت و قابل اطمینانی از بیان کلون‌های مورد مطالعه را نشان ندادند. اگر چه این مساله در مورد نمک‌های سولفات مس و سولفات کادمیوم به‌طور نسبی کمتر بود ولی با توجه ثبات نسبی نتایج مربوط به تیمارهای متیل واپلوژن، نترات نقره و تری آمینوتریازول نمونه برداری از این تیمارها در زمان‌های 6، 12، 24، 48 و 72 ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی از برگ تیمار شده (3 تکرار تصادفی) انجام شد. همچنین پیش تیمار اسید آسکوربیک با غلظت 30 میلی‌مولار (منتخب بر

به این منظور مقدار 5 گرم نمونه منجمد برگ در ازت مایع هموژنیزه گردید مقدار 10 میلی‌لیتر فنل و 15 میلی‌لیتر بافر (100 mM Tris-HCl pH 9, 200 Mm NaCl, 5 mM EDTA) 1% (w/v) Dithiothietol، 20mM افزوده شد. سپس سانتریفیوژ با دور 3000 در دقیقه به مدت 10 دقیقه انجام شد. مایع بالای لوله به آرامی جمع‌آوری و با افزودن مقدار مساوی کلروفرم عمل سانتریفیوژ 2 تا 3 بار به همین ترتیب تکرار گردید. مقدار 0/33 حجم LiCl 8 مولار افزوده و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار گرفت. استخراج RNA با انجام سانتریفیوژ لوله‌ها با سرعت 10000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. پس از شستشوی RNA استخراجی با اتانول 70 در صد در غلظت $2\mu g/\mu l$ در فریزر -70 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

هیبریداسیون RNA با کاوش‌گر DNA نشان‌دار فسفر رادیو اکتیو (آنالیز نور ترن بلات)

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

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

فوتوپیک ظاهری و میزان سلول های مرده در گیاهان تحت تیمار

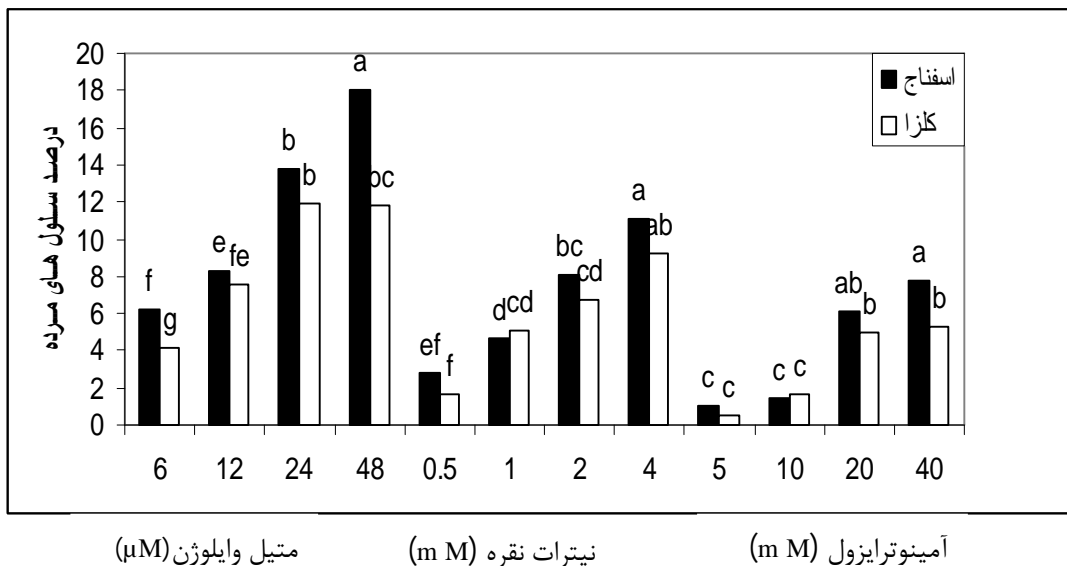
اعمال تیمارهای تنش‌زا به‌ویژه در سطوح بالا در هر دو گیاه (کلزا و اسفناج) موجب افت قابل توجه شادابی برگ‌ها گردید. این مسئله در مورد تیمار متیل وایلوژن با شدت بیشتری دیده شد در حالی‌که فوتوپیک ظاهری در مورد گیاهان تیمار شده با تری آمینوترایزول وضعیت نسبی بهتری داشتند. متوسط میزان سلول‌های مرده که با بررسی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

با اسپری پیش تیمار اسید اسکوربیک (30 میلی-مولار) 3 ساعت قبل از اعمال تیمارهای تنش‌زا وضعیت ظاهری گیاهان بهبود چشم‌گیری نشان داد این موضوع در کاهش معنی‌دار میزان سلول‌های مرده نیز ملاحظه گردید (شکل 2). در اینجا نیز اگرچه متوسط سلول‌های مرده در سطوح تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک و متیل وایلوژن نسبت به سایر تیمارهای ترکیبی بیشتر بود ولی میزان کاهش نسبی آن در مقایسه با اعمال تیمارهای تنش‌زای مربوطه کاهش نسبی بیشتری را در میزان سلول‌های مرده نشان داد. از آن‌جا که اسید اسکوربیک به‌عنوان یک پاک کننده عمومی رادیکال‌های فعال اکسیژن نقش مهمی ایفا می‌کند

(Larkindale et al., 2005; Sturgeon et al., 1998) و از طرفی شواهدی در تاثیر تیمارهای تنش‌زا از طریق افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن و در پی آن تنش اکسیداتیو در دست است (Navabpour et al., 2003). به‌نظر می‌رسد اعمال پیش تیمار اسید اسکوربیک با کنترل میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن و ایجاد تعادل مناسب، شرایط بهتری را در راستای ایجاد مقاومت نسبی سلول‌ها و پائین آوردن قابل توجه درصد سلول‌های مرده فراهم آورده است (شکل 2). نتایج مشابهی توسط سایر پژوهش‌گران نیز گزارش شده است (Navabpour et al., 2003).

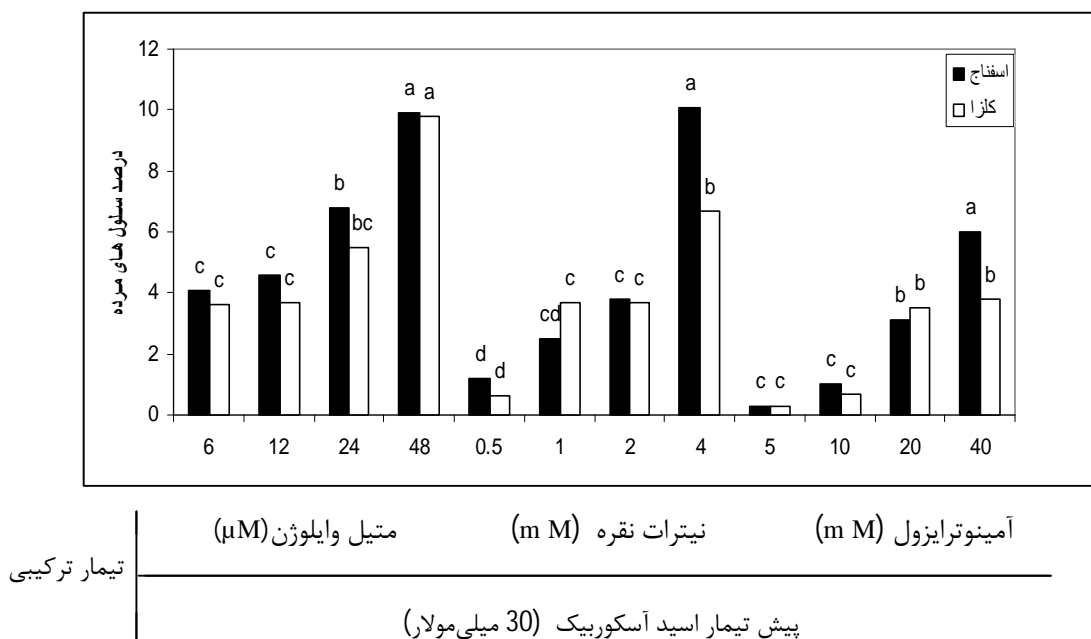
ارزیابی میزان اکسیداتیو سلولی (سنجش TBARM)

به‌منظور ارزیابی تاثیر تیمارهای آزمایشی (اعم از تیمارهای تنش‌زا و ترکیبی) در سطح سلولی با انجام سنجش TBARM، میزان مالون دی آلدئید محصول نهایی اکسیداسیون سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد در اینجا نیز بیش‌ترین و کم‌ترین میزان متوسط TBARM (شاخص میزان اکسیداسیون سلولی) به‌ترتیب مربوط به تیمارهای متیل وایلوژن و تری آمینوترایزول بود که با تغییرات درصد سلول‌های مرده در مورد این تیمارها کاملاً هم‌خوانی داشت (شکل 1 و 3)، در عین حال بر خلاف روند ملاحظه شده در مورد درصد سلول‌های مرده (شکل 1)، میزان TBARM در بیشتر موارد در کلزا بیشتر از اسفناج بود (شکل 3). به‌نظر می‌رسد این عدم تطابق که عمدتاً در تیمارهای متیل وایلوژن و آمینوترایزول ملاحظه شد به‌دلیل تاثیر سریع و شدید تیمارهای مربوطه و مکانیزم عمل آن‌ها بوده است به‌گونه‌ای که سلول فرصت چندانی برای فعال نمودن سیستم دفاعی نداشته است و پیش از ایجاد تعادل هموستاتیک مرگ سلولی رخ داده است. این موضوع در برخی مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Amory et al., 1992; Choi et al., 2007). کاربرد پیش تیمار اسید اسکوربیک نیز تاثیر معنی‌داری در کاهش میزان TBARM در کلیه تیمارهای آزمایشی به‌ویژه در مورد گیاه کلزا داشت (شکل 4). به‌طور کلی انطباق نسبی قابل توجهی بین نتایج به‌دست آمده برای صفات درصد سلول‌های مرده و میزان TBARM تحت تاثیر تیمارهای مورد مطالعه حاصل گردید با این حال تنوع نسبی موجود در نتایج حاصله برای صفات مزبور در بین تیمارهای آزمایشی در گیاه امکان انجام مطالعات با جزییات بیشتر را فراهم می‌آورد.



شکل 1: متوسط درصد سلول‌های مرده از 3 نمونه تصادفی برگ 48 ساعت پس از اعمال تیمار در اسفناج و کلزا مقایسه میانگین برای تمام تیمارها به وسیله آزمون دانکن انجام شده است ($\alpha=5\%$) در مورد هر تیمار میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی‌دار ندارند.

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

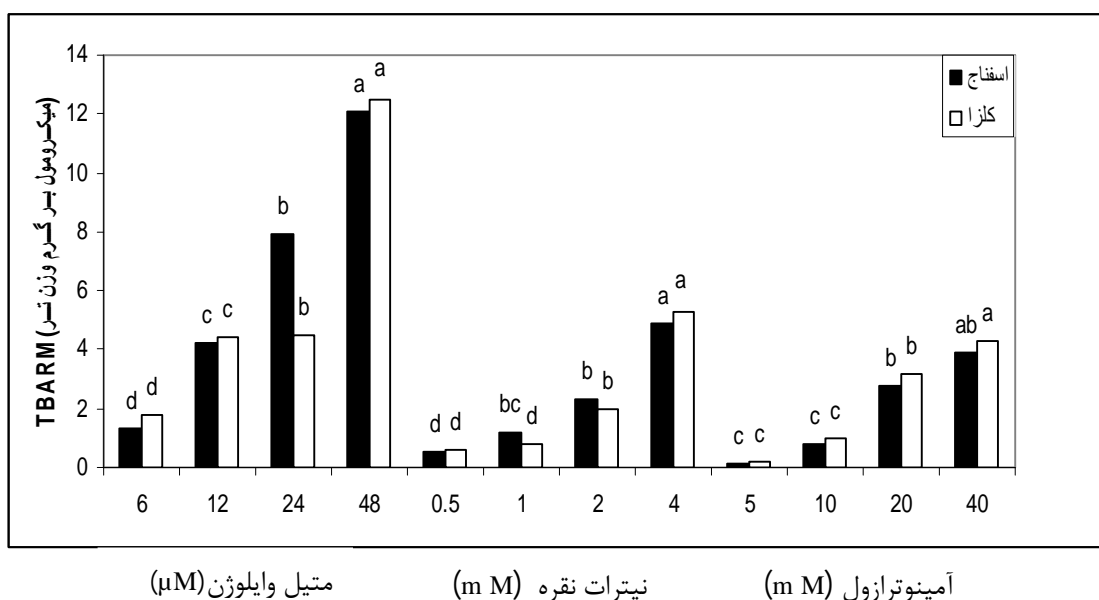


شکل 2: متوسط درصد سلول‌های مرده از 3 نمونه تصادفی برگ 48 ساعت پس از اعمال تیمار ترکیبی (ابتدا اسپری اسید آسکوربیک 30 میلی‌مولار و پس از 3 ساعت اسپری تیمارهای تنش‌زا در اسفناج و کلزا).

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

Fig 2: Average of cell death by 3 random samples 48h after sprayed last treatment in combined treatment (Ascorbic acid spray followed by oxidative treatment sprayed after 3h) on Brassica and spinach, leaves.

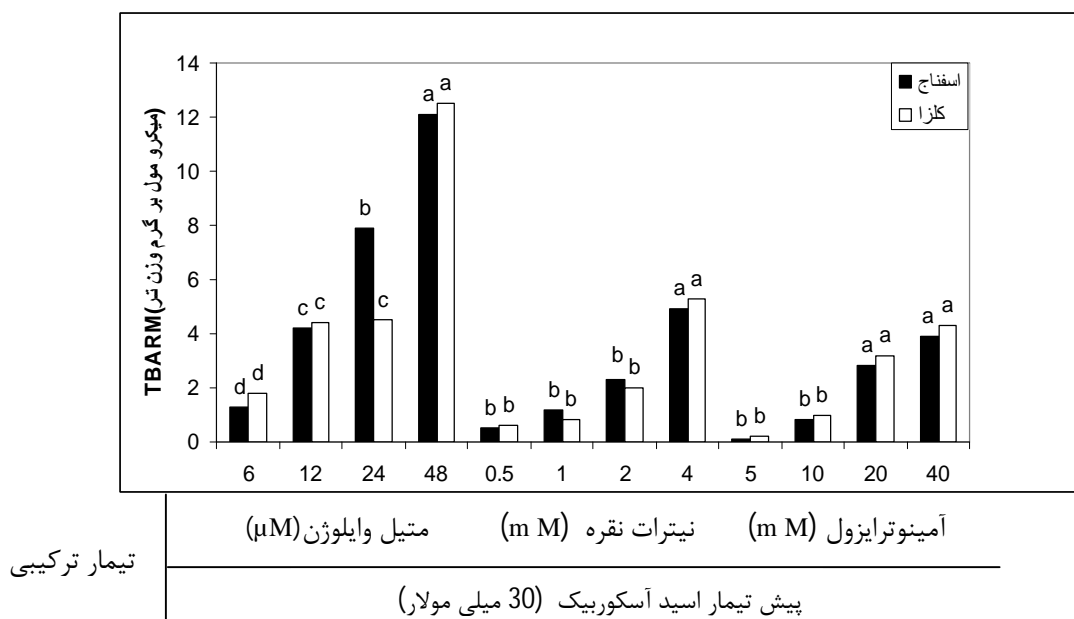
The mean comparing has been done by Duncan method ($\alpha= 5\%$) in each treatment the means that have at least one common letter have no significant difference.



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

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

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



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

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

Fig 4: TBARM measurement result 48h after sprayed last treatment in combined treatment (Ascorbic acid spray followed by oxidative treatment sprayed after 3h) on Brassica and spinach, leaves.

The mean comparing has been done by Duncan method ($\alpha=5\%$) in each treatment the means that have at least one common letter have no significant difference.

تغییرات بیان ژن‌ها

بیان ژن فتوسنتزی RBCS به شدت تحت تاثیر تیمارهای تنش‌زا کاهش یافت. میزان این کاهش در هر سه تیمار تنش‌زا و در مورد هر دو گیاه تشابه زیادی داشت. به طوری که در مورد کلیه تیمارها به جز تری آمینو ایزول میزان کاهش بیان ژن با افزایش غلظت تیمارها با شیب ملایمی کاهش یافت. در مورد تیمار تری آمینو تریازول در گیاه اسفناج میزان بیان ژن RBCS به طور نسبی تا مرز غلظت 20 میلی مولار تقریباً ثابت و قابل توجه بود و پس از آن در تیمار 40 میلی مولار به طور ناگهانی کاهش یافت (شکل 5). تری آمینو ایزول ترکیبی است که از فعالیت آنزیم کاتالاز ممانعت می‌کند. کاتالاز از دسته آنزیم‌های تعدیل کننده میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن است. این آنزیم تقریباً در تمام موجودات یوکاریوت وجود دارد و وظیفه اصلی آن تبدیل پر اکسید هیدروژن به آب و اکسیژن است (Sanchez-Casas and 1994; Maning *et al.*, 2009). با اعمال تیمار تری آمینو تریازول و کاهش فعالیت کاتالاز بروز تنش اکسیداتیو افت فنوتیپ ظاهری، افزایش درصد سلول‌های مرده و بالا رفتن سطح TBARM در بافت تیمار شده حاصل گردید. میزان بیان این ژن در شرایط تیمار ترکیبی (اسپری اسید اسکوربیک (30 میلی مولار قبل از اعمال هریک از تیمارهای متیل و ایلوژن 24 میلی مولار، نیترا 2 میلی مولار و یا تری آمینو تریازول 20 میلی مولار) به طرز قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش نسبی بیان ژن RBCS شد. با توجه به نقش اسید اسکوربیک به عنوان پاک کننده عمومی رادیکال‌های آزاد این موضوع قابل انتظار بود. نتایج مشابهی در سایر گزارش‌ها ارائه شده است (Navabpour *et al.*, 2003; Mackerness *et al.*, 1999).

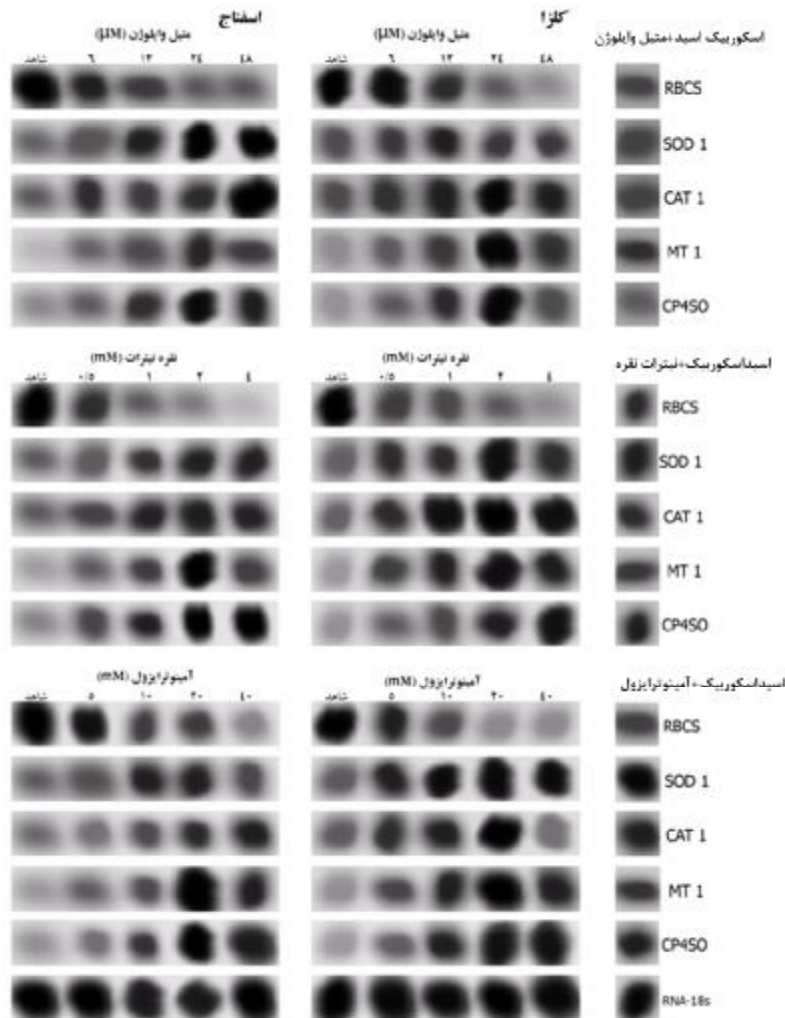
ژن سوپر اکسید دیسموتاز (*SOD I*) کد کننده گروه پروتئین‌های متالوآنزیم است. محصول آنزیمی این ژن توانایی پاک‌سازی یون سوپر اکسید را داراست. یون سوپر اکسید قابلیت تبدیل به پر اکسید هیدروژن را با شدت بالایی دارد (Bowler *et al.*, 1992). اعمال تیمارهای تنش‌زا می‌تواند منجر به افزایش غلظت یون سوپر اکسید به عنوان اولین حلقه زنجیره رادیکال‌های آزاد شود. از طرفی سلول‌های گیاهی در یک واکنش دفاعی با افزایش بیان ژن *SOD1* در کاهش فراوانی یون سوپر اکسید وارد عمل می‌گردند. این موضوع در تعدیل مقادیر رادیکال‌های ثانویه و از آن جمله پر اکسید هیدروژن و مهم‌تر از آن یون هیدروکسیل موثر خواهد بود (Orozco-Cardenas *et al.*, 2001).

فعال بوده و ضمن واکنش با DNA خسارات بیشتری نسبت به سایر رادیکال‌ها وارد می‌نماید (Bowler *et al.*, 1992). در این پژوهش تفاوت نسبی قابل توجهی در الگوی بیان ژن *SOD* در دو گیاه کلزا و اسفناج در مورد تیمارهای آزمایشی (متیل و ایلوژن و تری آمینو تریازول) مشاهده شد. در گیاه کلزا در تیمار متیل و ایلوژن بیان ژن با افزایش غلظت تیمار تغییر چندانی نشان نداد. در حالی که در اسفناج با افزایش غلظت متیل و ایلوژن میزان بیان ژن افزایش خطی نشان داد. در مورد تیمار تری آمینو تریازول عکس‌العمل ژن *SOD* در اسفناج چندان تفاوتی نداشت ولی در کلزا میزان افزایش بیان در غلظت 5 میلی مولار شروع و در غلظت‌های بالاتر بعدی تقریباً ثابت باقی ماند. به طور کلی عکس‌العمل متفاوت گیاهان در بیان ژن‌ها نسبت به تیمارهای مشترک با توجه به ساختار ژنتیکی و حساسیت بیان ژن‌ها نسبت به تغییرات مولکولی در سطح سلول قابل انتظار است. گزارش‌های مشابهی در این خصوص ارائه شده است (Choi *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 1993).

ژن *CAT1* کد کننده آنزیم کاتالاز واجد نقش آنتی اکسیدانی می‌باشد. این ژن با پاک‌سازی رادیکال پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نقش مهمی در تنظیم غلظت H_2O_2 دارد. اگرچه غلظت بالای پر اکسید هیدروژن منجر به بروز تنش اکسیداتیو و خسارت‌های سلولی می‌گردد ولی بر اساس نتایج برخی مطالعه‌ها تاثیر غلظت‌های متعادل H_2O_2 به عنوان یک فاکتور سیگنالی در بیان ژن‌ها گزارش شده است (Mackerness *et al.*, 2001; Navabpour *et al.*, 2003). این رو بررسی میزان فعالیت *CAT1* و در پی آن میزان H_2O_2 که بر فعالیت گروهی از ژن‌ها تاثیر گذار است اهمیت زیادی دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که الگوی بیان این ژن در هر دو گیاه نسبت به تیمارهای اعمال شده شباهت زیادی داشت (شکل 5). به طور کلی دو الگوی تقریباً متمایز برای بیان این ژن ملاحظه گردید. در گیاه اسفناج برای تیمارهای متیل و ایلوژن و تری آمینو تریازول روند افزایشی بیان *CAT1* تا آخرین غلظت تیمار اتفاق افتاد. در حالی که در مورد سایر تیمارها میزان بیان به طور خطی افزایش یافته در غلظت ما قبل آخر به حداکثر رسیده و پس از آن در آخرین غلظت کاهش نسبی ژن ملاحظه شد (شکل 5). این مسئله که چندان دور از انتظار نیست توسط برخی پژوهش‌گران دیگر نیز گزارش شده است (Qi-Lin *et al.*, 2009). به طور کلی میزان بیان این ژن در گیاه کلزا بیشتر بود هم‌چنین در بین کلیه تیمارهای اعمال شده متوسط بیان *CAT1* تحت تاثیر

تحریک تنش فلزات سنگین و در پی آن افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن بوده است. شباهت الگوی بیان ژن‌ها در تحقیق حاضر با گزارش‌های مورد اشاره و کاهش معنی‌دار میزان TBARM در تیمار ترکیبی (پیش تیمار اسیداسکوربیک + تیمار نیترات نقره) موید این مسئله می‌باشد.

تیمار نیترات نقره بالاتر بود (شکل 5). نیترات نقره در برخی تحقیقات به‌عنوان جایگزینی برای مطالعه واکنش‌های دفاعی و بررسی بیان ژن‌های حساس به‌عوامل بیماری‌زا استفاده شده است (Epple *et al.*, 1995). همچنین پژوهش‌های گلیج استرز (Clijsters *et al.*, 1999) مبین تاثیر نیترات نقره در



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

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

مقایسه واکنش بیان ژن‌های القایی در پاسخ به تیمارهای تنش‌زا در ...

بیان ژن رخ داد. در حالی که در سایر موارد عموماً روند افزایشی بیان ژن و تقریباً ثابت آن در دو مرحله پایانی سطوح تیمارها ملاحظه شد (شکل 5).

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

سیاسگزاری

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

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

کلون *CP450* کد کننده پروتئین سیتوکروم P450 است. این پروتئین در فرایند سوخت و ساز ترکیباتی چون استروئیدها، اسیدهای چرب و لیکوتریئن‌ها ایفای نقش می‌نماید. همچنین این پروتئین واجد خواصی است که در مهار اثرات سوء ترکیبات سرطازا و موتاژن‌ها بسیار موثر است (Navabpour et al., 2007). الگوی بیان ژن *CP450* تحت تاثیر تیمار متیل و ایلوژن شباهت زیادی به وضعیت بیان ژن *MT1* داشت. در اینجا نیز افزایش خطی میزان بیان ژن تا سطح ما قبل آخر دیده شد و در آخرین مرحله تنش کاهش

منابع:

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