جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد
مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۸ شماره ۱ صفحه های ۱۱ تا ۲۱ (۱۳۸۷)

بررسی چگونگی بیان ژن های α-DOX_1 و α-DOX_2 در ریشه سه نژادگان گوجه فرنگی پس از تنش های مختلف[1]

STUDY OF α-DOX_1 AND α-DOX_2 GENES EXPRESSION FOLLOWING SOME STRESSES IN ROOTS OF THREE TOMATO GENOTYPES

اشکبوس دهداری[2]

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 ابسایزیک اسید و اتیلن در چگونگی بیان این ژن ها از دو جهش یافته گوجه فرنگی به نام های Flacca (Flc، جهش یافته اسید ابسایزیک)، 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 آن‌ها 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[3] 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 گلخانه‌ای 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 $\alpha-DOX_1 5'$ 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.

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

۱- تاریخ دریافت: ۸۵/۶/۶ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/۲۳

۲- استادیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، جمهوری اسلامی ایران.

۳- Upregulation

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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)[۱] 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_2، 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 ابسایزیک اسید (۲، ۶، ۲۵) و برخی غیر وابسته به آن می باشد (۱۰).

در آرابیدوپسیس[۲]، غربالگری در شرایط شور منجر به شناسایی سه ژن حساسیت به شوری (SOS)[۳] به نام های SOS_1، SOS_2 و SOS_3 شده است (۲۸). شی و همکاران[٤] (۲۳) نشان دادند که افزایش زیادی در میزان رونوشت SOS_1، در اثر شوری در ریشه آرابیدوپسیس رخ می دهد و تنظیم بیان آن با واسطه گری SOS_2 و SOS_3 رخ می دهد. به طور کلی این مجموعه ژنی حرکت K^+ و Na^+ به درون یاخته را تنظیم می کنند. در توتون ژن تولید کننده PIOX[٥] (آنزیم اکسیژناز که به وسیله بیمارگر انگیزانده می شود)، در اثر تیمارهای مختلف از جمله آلودگی برگ ها به بیمارگر، ایجاد زخم، اسید جازموییک 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[٦] (۲٦) با مقایسه ژنوم گوجه فرنگی در شرایط شور با شرایط غیر شور به روش دی.دی.پی[۷] 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 لینولنیک اسید ۱۸:۳ را به 2-R-hydroperoxide

---

۱- Reactive oxygen species
۲- *Arabidopsis*
۳- Salt overly sensitive
٤- Shi *et al.*
٥- Pathogen induced oxygenase gene
٦- Wei *et al.*
۷- Differential display (ddp)

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تبدیل می کند (۸). این پروتئین به دلیل نقش آنزیمی آن به عنوان α-dioxygenase یا α-DOX نامگذاری گردیده است (۱۷). بررسی های دقیق تر نشان دادند که سه مکان ژنی، α-DOX را در گوجه فرنگی رمز می کنند (۲۵). این مکان ها عبارت از cLEW8G12 یا α-DOX$_1$، cLEW26H11 یا α-DOX$_2$ و cTOD20F16 یا α-DOX$_3$ 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 α-DOX$_1$، فرم کوتاه شده آن 'α-DOX 5 و α-DOX$_2$ 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 (ودر اتاقک 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) وآبکشت (کشت در محلول غذایی ۲/۳ هوگلند و در اتاقک رشد) در دانشگاه سایمون فریزر (SFU)[۱] 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 Ailsa Craig (AC)، 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 اتاقک 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.

۱- Simon Fraser University

پس از تیمارهای یاد شده در هر دو محیط گلخانه و آبکشت ریشه ها از محل طوقه قطع و به سرعت به وسیله نیتروژن مایع منجمد شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس بر اساس روش پرسکات و مارتین[۱] (۱۸) RNA آن ها استخراج شد.

RNA نمونه ها به همراه ماده واسرشت کننده فرم آلدئید در ژل آگارز تزریق شدند. سپس طی فرایند لکه‌گذاری RNA به روش سامبروک و همکاران[۲] (۲۱) دورگه گیری با کاوشگر های 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 دورگ گیری با بافر FBS و DNA اسپرم ماهی صورت پذیرفت. در پایان دورگه گیری دستکم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد با کاوشگر های *α-DOX₁*، فرم کوتاه شده آن (α-DOX 5') و *α-DOX₂* انجام شد. نتایج به دست آمده از دورگه گیری با قرار دادن غشاء دستکم به مدت ۲۴ ساعت در کنار فیلم حساس به مواد رادیواکتیویته در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد 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 *α-DOX₂* در ریشه سه رقم مورد مطالعه نشدند (شکل ۱). ولی *α-DOX₁* (با طول کامل) به وسیله شوری ۱۷۰ میلی مولار (به مدت ۲۴ ساعت) و خشکی ۳۶ ساعته در ریشه 'AC' فزایش 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 می توان چنین تفسیر کرد که کمبود ابسایزیک اسید در 'Flc' سبب مقدار بیان بیشتر در مقایسه با 'AC' گردیده است. به عبارت دیگر ابسایزیک اسید دارای تنظیم منفی روی بیان *α-DOX₁* است. تیراجوه و همکاران[۳] (۲۵) نیز این نتیجه را در شرایط آبکشت گزارش کرده اند. ولی به دلیل این که آن ها متوجه تولید مقدار کمی ابسایزیک اسید در 'Flc' شدند، از ماده فلوریدوین[٤] برای کاهش و یا حذف ابسایزیک اسید داخلی به وسیله گیاه استفاده کردند. نتایج آن ها نشان دهنده افزایش بیان *α-DOX₁* در اثر کاهش ABA می باشد. میزان ABA موجود در گیاه رابطه عکس با میزان اتیلن دارد (۱۰). به همین دلیل بود که تیراجوه و همکاران[۵] (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 می شود) بیان داشتند که افزایش اتیلن سبب انگیزش بیان این ژن می شود. 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 تنظیم گر منفی در ریشه نباشد هر چند که در اثر شوری افزایش بیان این ژن دیده شد. با وجود این که افزایش بیان ژن *α-DOX₁* 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

۱- Prescott and Martin ۲- Sambrook *et al.* ۳- Tirajoh *et al.* ٤- Fluridone

رونوشت α-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. بنابر این، این آزمایش ها تاییدی بر نتایج پژوهشگران قبلی (۱، ۲۵) مبنی بر بیان ژن α-DOX_1 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.

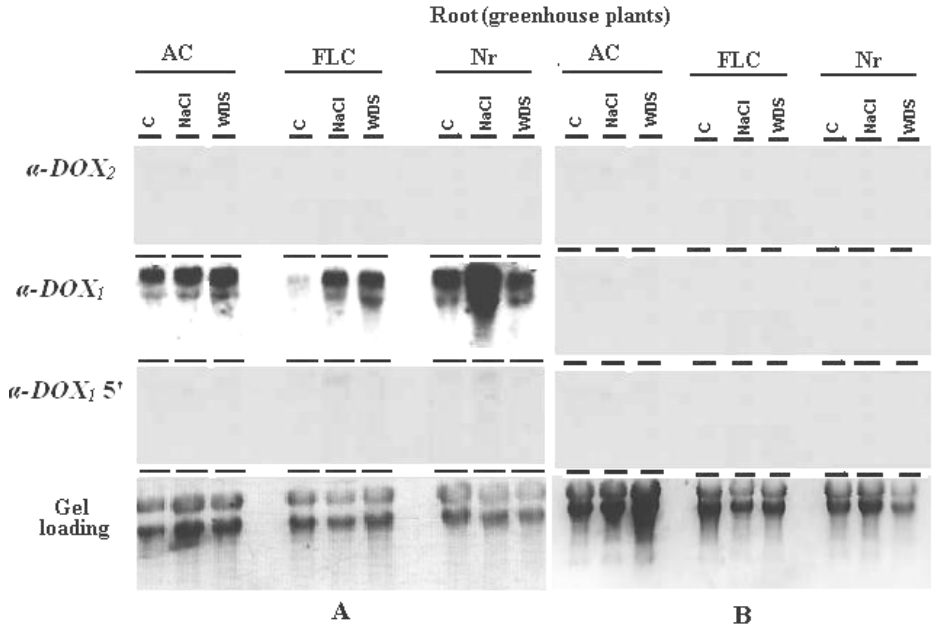

Fig.1. Effect of 170 mM NaCl, water deficient stresses (WDS) and untreated plants with NaCl and WDS (as check, c) on regulation of $\alpha-DOX_1, \alpha-DOX_2$ and $\alpha-DOX_1$ 5' expression in eight-weeks old tomato ('AC', 'Nr' and 'Flc' genotypes) roots under greenhouse conditions. A. RNA- blot analysis after exposure to 24 h NaCl and 36 h WDS. B. RNA-blot analysis after exposure to 75 h NaCl and WDS.

شکل۱- 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 دورگه‌گیری با کاوشگر کوتاه شده α-DOX_1 یعنی α-$DOX_1$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 هـای مختلـف نمـک، آزمـایش دوم در گلخانـه انجام شد. شکل ۲ نتایج به دست آمده از آزمایش دوم در شرایط گلخانه را نشان می دهـد. α-DOX_2 در اثـر ایـن تیمارها هم هیچ گونه بیانی نشان نداد. ولی همان گونه که دیده می شود بر خلاف آزمایش پیشین کـه بوتـه هـای شش هفته ای مورد آزمایش بودند α-DOX_1 در اثر شوری های به کار رفته در ریشه هـای 'AC' و'Nr' افـزایش بیان ژن نشان نداد. در صورتی که همانند آزمایش اول غلظت ۱۷۰ میلـی مـولار نمـک سـبب افـزایش بیـان ژن در 'Flc' گشت که دوباره تاییدی بر وابسته بودن بیان این ژن به ابسایزیک اسید می باشد. شاید دلیلی که برای عـدم افزایش بیان ژن در دو نژادگان دیگر می توان بیان نمود افزایش ۴/۵ ماهـه سـن بوتـه هـا اسـت. همچنـین سـمیت بسیار بالای یونی در غلظت ۳۰۰ میلی مولار نمک سبب پوشانیده شدن بیان این ژن در هـر سـه نژادگـان گردیـده است. هامبرگ و همکاران[۱] (۷) کاهش فعالیت ژن α-DOX_1 را در گیاهان تراریخـت توتـون در اثـر سـطوح بـالای پاراکوات گزارش کردند. چگونگی بیان α-$DOX_1$5′ همانند شکل کامل آن بود با این تفاوت که میزان بیان کمتـری داشت (شکل ۲).

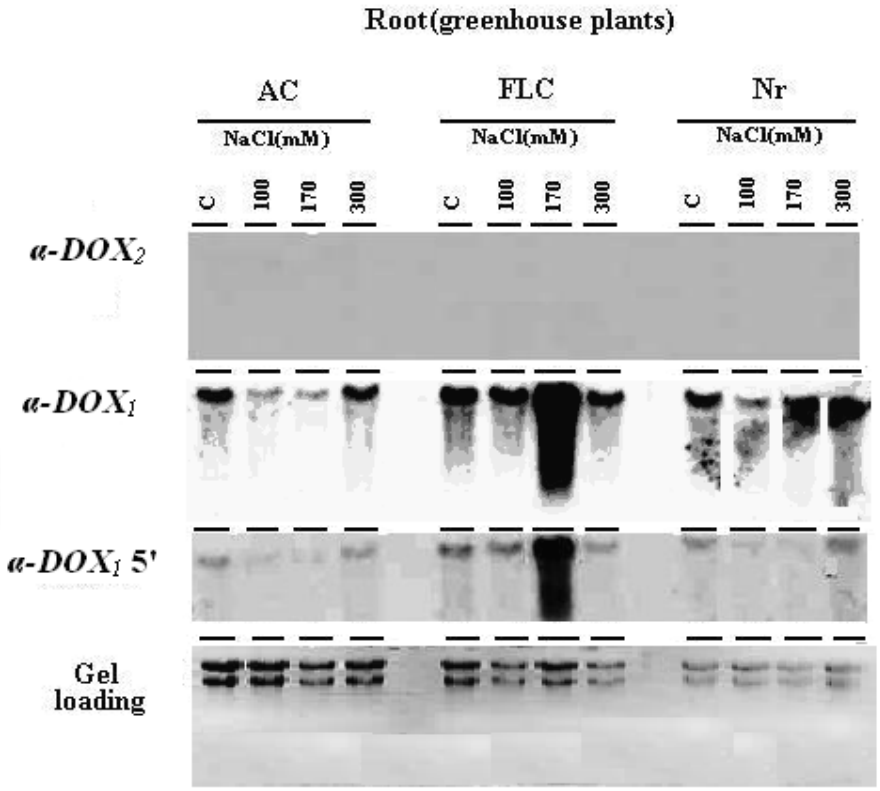

Fig. 2. Effect of different concentrations of NaCl on regulation of $\alpha-DOX_1, \alpha-DOX_2$ and $\alpha-DOX_1$ 5' expression in 4.5 months old tomato ('AC', 'Nr' and 'Flc' genotypes) roots under greenhouse conditions. Untreated plants with NaCl were used as check (c).

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.

۱- Hamberg *et al.*

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 α-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.

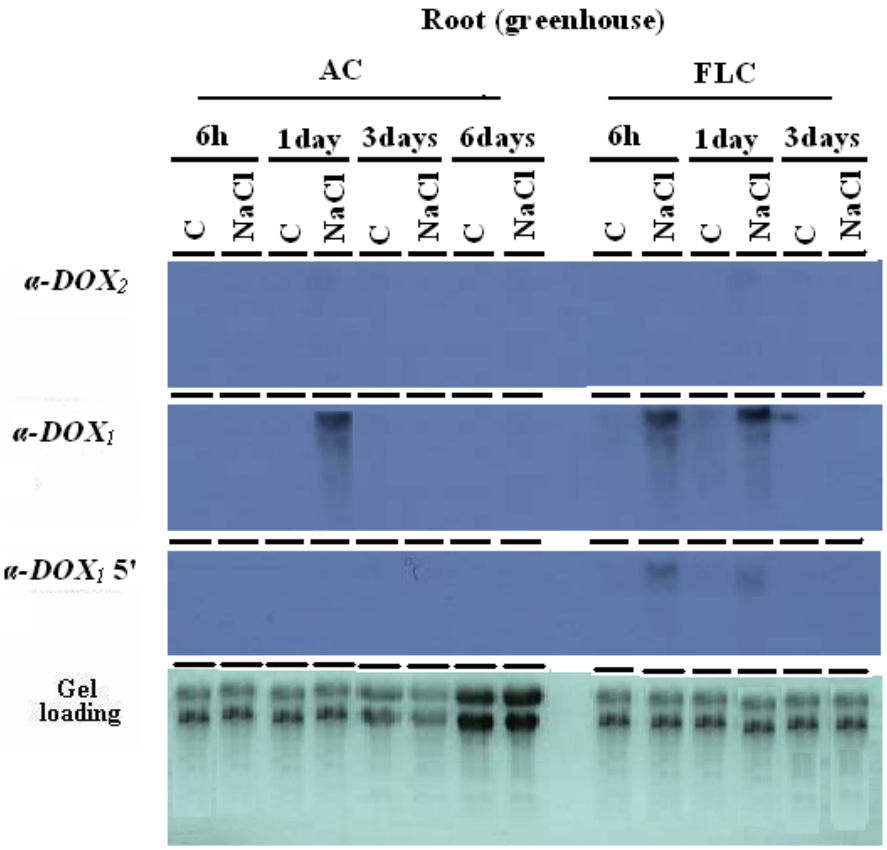

Fig. 3. Effect of exposure durations of 250 mM NaCl on regulation of $\alpha-DOX_1, \alpha-DOX_2$ and $\alpha-DOX_1$ 5' expression in six-weeks old tomato ('AC' and 'Flc' genotypes) roots under greenhouse conditions. Untreated plants with NaCl were used as check (c).

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[۱] 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

۱- H_2O_2

ساعت تیمار پراکسید هیدروژن افزایش بیان ژن α-DOX_1 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 اکسیداتِیو 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_2O_2 بر چگونگی بیان ژن های مختلف کمتر بررسی شده است. فلوکیگر و همکاران[۱] (۴) گزارش کردند که بیان سطوح ATP سولفوریلاز و APS رداکتاز در اثر تیمار دو میلی مولار پر اکسید هیدروژن در ریشه های ذرت به شدت افزایش می یابد. در مجموع مشخص شده که H_2O_2 بیان ژن هایی که مرتبط با واکنش های با حساسیت بالا و دفاعی گیاه هستند نظیم می کند (۱۶). در این آزمایش نیز چگونگی بیان شکل کوتاه شده ژن همانند شکل کامل ولی با میزان بیان کمتر بود.

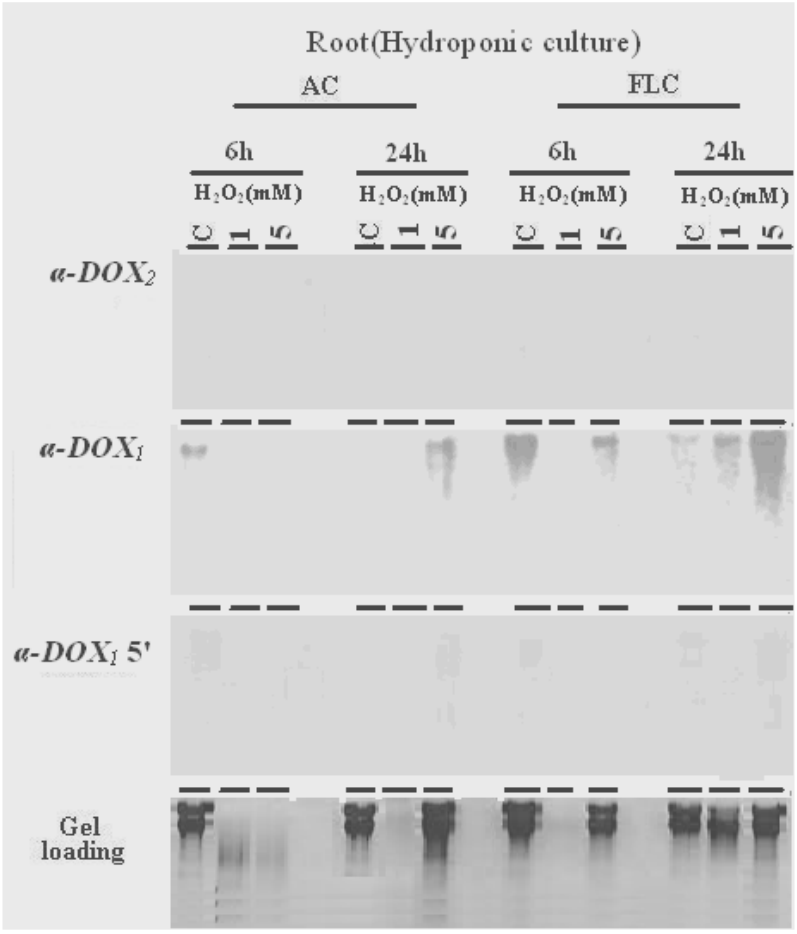

Fig. 4. Effects of 1 and 5 mM H_2O_2 on regulation of $\alpha-DOX_1, \alpha-DOX_2$ and $\alpha-DOX_1$ 5' expression in six-week-old tomato ('AC' and 'Flc'genotypes) roots under hydroponic conditions. Untreated plants with H_2O_2 were used as check (c).

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.

۱- Fluckiger *et al.*

چون بیان در سطح بالای H_2O_2 رخ داد و RNA در برخی تیمارهای آزمایش پیشین تخریب گردید، آخرین آزمایش با افزودن سطح ۱۰ میلی مولار H_2O_2 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 α-DOX_1 در اثر تمامی تیمارها به جز سطح ۱۰ میلی مولار H_2O_2 افزایش بیان ژن نشان داده است که بیان در اثر شوری مقداری زیادتر 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_2O_2 گزارشی در دسترس نیست. در این آزمایش نیز بیان شکل کوتاه شده α-DOX_1 کمتر از شکل کامل آن بود.

ژن α-DOX_2 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[۱] 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[۲] به دست می آیند. مشخص گردید که در بیان ژن α-DOX_1 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_2O_2 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 بوته‌ها 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 مزرعه‌ای نشان دهند. نکته آخر این که در بیشتر موارد شکل کوتاه شده ژن α-DOX_1 میزان بیان کمتری نسبت به شکل کامل آن نشان داد. بنابراین نمی‌توان به جای α-DOX_1 از شکل کوتاه شده آن در فرآیند انتقال ژن استفاده کرد.

۱- Psudogene ۲- Retranscription

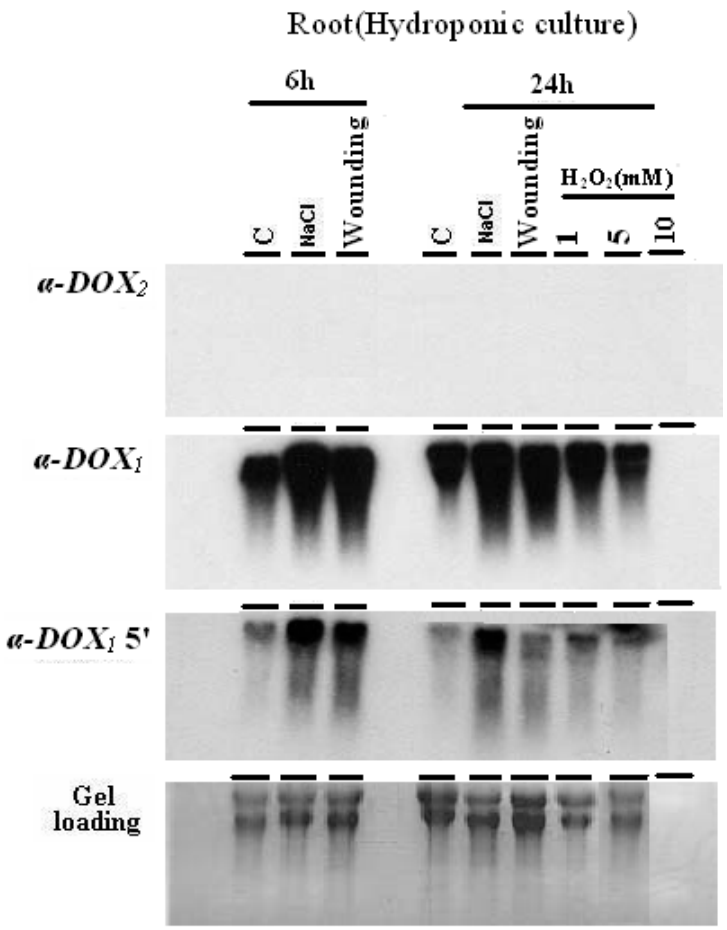

Fig. 5. Effects of 170 mM NaCl, wounding and 1, 5 and 10 mM H_2O_2 on regulation of $\alpha-DOX_1$, $\alpha-DOX_2$ and $\alpha-DOX_1$ 5' expression in six-weeks old tomato ('AC' genotype) roots under hydroponic conditions. Untreated plants with these stresses were used as check (C).

شکل ۵- تاثیر تنش های شوری ۱۷۰ میلی مولار، زخم و سطوح مختلف پر اکسید 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 منـــابع

۱- دهداری، ا. ۱۳۸۵. تاثیر برخی تنشها روی نحوه بیان ژنهـای α-DOX_1، α-DOX_3، 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 congnate 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 α- dioxygenase. Prost. Lipid Med. 68:363-374.
8. Hamberg, M., A. Sanz and C. Castresana. 1999. α- 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. Zhul. 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. Aptotosis-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* $\alpha - DOX_1$ fatty acid dioxygenease 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^+/K^+ antiporter SOS1 controls long-distance Na^+ 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 α-dioxygenease 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.