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

زیست‌شناسی گیاهی، سال دوم، شماره پنجم، پاییز ۱۳۸۹، صفحه ۲۵ - ۳۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۷/۰۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۹/۱۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۰۹/۳۰

بررسی تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات بر روی جذب نیترات توسط HATS، در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

پرژک ذوفن[1*] و منصور شریعتی [2]
[1*] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
[2] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

چکیده

تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات بین ۰ تا ۱۰۰ میکرومولار به عنوان یک ماده آنالوگ نیترات، بر روی فعالیت سیستم با تمایل بالای نیترات در شرایط بدون نیترات در دو اسیدیته ۶ و ۶/۵ یا همراه با سه غلظت نیترات شامل ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در اسیدیته ۶ در طی دو بخش تحقیقی و با استفاده از لاین‌های آرابیدوپسیس تالیانای (*Arabidopsis thaliana*) جهش‌یافته *atnrt2.1*، *atnrt2.4* و *chl1-5* و جهش‌یافته *atnrt2.1* تراریخت شده با ژن *NRT2.1* مطالعه گردید. به دنبال کشت بذرهای متعلق به این ژنوتیپ‌ها بر روی محیط کشت جامد حاوی مواد غذایی و انتقال آنها به شرایط رشدی کنترل شده، برای درک بهتر نقش سیستم با تمایل بالا در جذب نیترات، پس از هفت روز درصد برگچه‌های کاملاً باز به عنوان شاخص عملکرد این سیستم بررسی گردید. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، بالاترین میزان مقاومت در برابر غلظت‌های بالای کلرات هم در محیط فاقد و هم در محیط دارای نیترات در جهش‌یافته atnrt2.1 مشاهده شد. اختلال در بیان ژن‌های *AtNRT2.4* و *AtCHL1* به افزایش مقاومت گیاهچه‌ها در برابر کلرات منجر نگردید. از طرف دیگر، تشدید بیان ژن *NRT2.1* در جهش‌یافته *atnrt2.1* به کاهش معنی‌دار درصد برگچه‌های کاملاً باز در این ژنوتیپ منجر شد. با تکیه بر این نتایج، به نظر می‌رسد که ژن *AtNRT2.1* نقش اصلی و کلیدی را در جذب نیترات از محیط توسط سیستم با تمایل بالا دارد و این نتایج، تحقیقات فیزیولوژیک و مولکولی قبلی در رابطه با عملکرد این ژن را تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آرابیدوپسیس، سیستم با تمایل بالا، کلرات، نیترات

مقدمه

نیترات یکی از مهمترین منابع نیتروژن معدنی برای رشد و نمو گیاهان است. جذب نیترات در گیاهان از طریق غشای پلاسمایی سلول‌های اپیدرمی و پوست ریشه انجام می‌شود (Glass *et al*., 1992). به نظر می‌رسد که انتقال نیترات حتی در غلظت‌های بالا نیز به شیب الکتروشیمیایی یون‌های پروتون و عملکرد پمپ H^+-ATPase غشای پلاسمایی وابسته است (Miller and Smith, 1992). این

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: parzhakzoufan@yahoo.com، شماره تماس: ۰۶۱۱۳۳۳۱۰۴۵

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

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

انتقال همراه با دو پروتون انجام می‌شود. تحقیقات فیزیولوژیک روند جذب نیترات در گیاهان (Crawford and Glass, 1998; Forde and Clarkson, 1999) نشان داده است که حداقل سه سیستم مجزا برای جذب نیترات در ریشه‌ها توسعه یافته است: یک سیستم که تمایل بالایی نسبت به نیترات دارد، در غلظت‌های بسیار کم نیترات در محیط (در حد میکرومولار) عمل می‌کند و روندی اشباع‌پذیر را از خود نشان می‌دهد. به این سیستم HATS (High Affinity Transport System) گفته می‌شود که خود به دو نوع مجزا تقسیم می‌گردد؛ یک سیستم که قویاً در برابر حضور نیترات القایی است و به عنوان سیستم iHATS (inducible HATS) شناخته شده است، در حالی که سیستم cHATS (constitutive HATS) به صورت ساختاری بیان می‌شود و حتی در غیاب نیترات نیز فعال است. سومین سیستم ناقل با عنوان LATS (Low Affinity Transport System) از تمایل پایینی نسبت به تغییرات برخوردار است و به نظر می‌رسد که وقتی غلظت نیترات در محیط بیش از یک میلی‌مولار باشد، این سیستم نقش مهمی را در جذب نیترات ایفاء می‌نماید. (Kronzucker *et al.*, 1995; Seddiqi *et al.*, 1990).

در گیاهان عالی حضور دو نوع از ناقلان نیترات با عنوان NRT1(Nitrate Transporter1) و NRT2 به اثبات رسیده است. ناقلان NRT2 به عنوان نماینده سیستم‌های HATS شناخته شده‌اند (Filleur and Daniel-Vedele, 1999). ناقل CHL1 (AtNRT1.1) بهترین نمونه مطالعه شده از ناقلان نیترات متعلق به خانواده NRT1 در گیاهان عالی است که با استفاده از جهش‌یافته‌های T-DNA مقاوم به کلرات (*chl1*) در آرابیدوپسیس جداسازی و کلون شد (Tsay *et al.*, 1993). جهش‌یافته‌های فیزیولوژیک این ژن که دارای نقص در جذب نیترات و کلرات بودند، برای نخستین بار در سال ۱۹۷۸ شناسایی شدند (Doddema *et al.*, 1978).

مطالعات بعدی بیانگر آن بود که این جهش‌یافته علاوه بر نقص در عملکرد LATS قادر به جذب نیترات توسط HATS نیز نیست (Liu *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998). بنابراین، پیشنهاد شد که CHL1 یک ناقل با تمایل دوگانه نسبت به نیترات است که عمدتاً در بخش‌های جوان ریشه بیان می‌شود (Huang *et al.*, 1999). تصور می‌شود که شرایط غذایی و غلظت نیترات، از مهمترین عوامل کنترل‌کننده تغییر فعالیت ناقل AtNRT1.1 است. بیشتر مطالعات فیزیولوژیک و مولکولی مرتبط با جذب نیترات توسط HATS در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا و با هدف درک نقش و نحوه کنترل ژن‌های خانواده *NRT2* انجام شده است و این مطالعات نشان می‌دهد که هفت ژن از این خانواده در ژنوم این گیاه حضور دارند (Filleur and Daniel-Vedele, 1999; Zhuo *et al.*, 1999).

در میان خانواده ژنی *AtNRT2* در آرابیدوپسیس، ژن *AtNRT2.1* در سطح وسیعی مطالعه شده است و بر اساس این شواهد، پیشنهاد شده است که احتمالاً ژن *NRT2.1* نقش غالب و مهمی در قیاس با دیگر ژن‌های *NRT2* در جذب نیترات توسط HATS دارد. (Cerezo *et al.*, 2001; Filleur *et al.*, 2001) به استثنای ژن *AtNRT2.1* و تا حدودی ژن *AtNRT2.2* عملکرد سایر ژن‌های خانواده *NRT2* در گیاهان هنوز مشخص نشده است. برخی مطالعات بر روی جهش‌یافته‌های دوگانه *atnrt2a* در گیاه

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

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

آرابیدوپسیس (این گیاهان دارای حذف کامل ژن *AtNRT2.1* و حذف بخشی از ژن *AtNRT2.2* هستند) بیانگر آن است که بیان ژن *AtNRT2.4* در این جهش‌یافته تشدید می‌شود (Orsel *et al.*, 2004).

همچنین، نتایج حاکی از آن است که بیان ژن *AtNRT2.4* به دنبال برقراری شرایط محرومیت نیتروژن افزایش و در شرایطی غنی از نیتروژن کاهش می‌یابد (ذوفن و همکاران، ۱۳۸۹). بنابراین به نظر می‌رسد که ژن فوق جزو ژن‌های ممانعت‌شونده توسط نیترات باشد. بر اساس برخی تحقیقات، استفاده از گیاهان جهش‌یافته و تراریخته و انجام مطالعات مقایسه‌ای با گیاهان وحشی برای درک بهتر و بیشتر نقش ژن‌های مرتبط با جذب نیترات از کارایی بالایی برخوردار بوده است (Cerezo *et al.*, 2001; Filleur *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). این نتایج یاد شده نشان داده‌اند که حضور چند ژن در یک خانواده ژنی می‌تواند به انعطاف‌پذیری فنوتیپی در پاسخ به شرایط محیطی مختلف منجر گردد و عدم حضور یک ژن می‌تواند با بیان و فعالیت ژن‌های دیگر موجود در آن خانواده ژنی جبران شود. کلرات یک آنالوگ نیترات و یک علف‌کش گیاهی است که توسط سیستم‌های جذب نیترات جذب و با فعالیت نیترات رودکتاز به کلریت تبدیل می‌گردد که کلریت برای گیاه بسیار سمّی است و به تجزیه کلروفیل و ریزش برگ منجر می‌شود. به همین جهت، این ماده در بررسی‌های اولیه بر روی عملکرد سیستم‌های جذب نیترات توسط LATS استفاده شده است (Tsay *et al.*, 1993). یکی از بهترین راهکارها برای تعیین و تأیید نقش یک ژن، بررسی فیزیولوژیک و مولکولی گیاهان جهش‌یافته و تراریخت و مقایسه آن با گیاهان وحشی است که از طریق تفکیک فنوتیپی و فیزیولوژیک این ژنوتیپ‌ها، زمینه مناسبی برای درک نقش این ژن‌ها فراهم می‌آید. به همین جهت، در این تحقیق تلاش بر این بوده است که با استفاده از لاین‌های جهش‌یافته و تراریخت در برخی ژن‌های دخیل در جذب نیترات نقش این ژن‌ها در عملکرد HATS در غلظت‌های میکرومولاری کلرات (به عنوان آنالوگ نیترات) بررسی گردد. بر همین اساس و با توجه به اینکه تاکنون تأثیر غلظت‌های پایین کلرات به عنوان آنالوگ نیترات بر عملکرد HATS در جذب نیترات مطالعه نشده است و با توجه به این که جذب کلرات و تبدیل آن به کلریت سمّی، به ایجاد سمّیت در گیاه و عدم جوانه‌زنی و رشد مناسب منجر می‌شود و همچنین جذب بیشتر کلرات می‌تواند بیانگر توانایی بیشتر گیاه در جذب بیشتر نیترات باشد، بنابراین، اثر کلرات در محدوده فعالیت HATS بر روی درصد جوانه‌زنی بذر برخی لاین‌های جهش‌یافته و تراریخته در ژن‌های *NRT* بررسی گردید تا درک بیشتری از نقش این ژن‌ها در عملکرد HATS و جذب نیترات از طریق آن به دست آید.

مواد و روش‌ها

کلیه بذرهای مورد استفاده در این از تحقیق، از بانک بذر مرکز تحقیقات کشاورزی INRA، مرکز ورسای واقع در کشور فرانسه تأمین شد. برای بررسی تأثیر کلرات بر عملکرد HATS، دو آزمایش جداگانه طراحی گردید. در آزمایش مقدماتی از جهش‌یافته‌های آرابیدوپسیس نظیر جهش‌یافته *atnrt2.1*، *atnrt2.4* و *chl1-5* به همراه اکوتیپ‌های وحشی (Col) Columbia و Wasselewkija (WS) استفاده شد. در آزمایش دوم

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

جهش‌یافته *atnrt2.1*، جهش‌یافته *atnrt2.1* تراریخته شده با ژن *NpNRT2* از *Nicotiana plumbaginifolia* به صورت (*atnrt2.1* RolD::*NpNRT2*) و آرابیدوپسیس تراریخته شده با RolD::*AtNRT2.1* انتخاب شدند که همگی دارای زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS بودند. صرفنظر از مرحله آزمایش، ابتدا کلیه بذرها با محلول ژاول-اتانول ۹۵ درصد استریل شدند و بعد از شستشو با اتانول ۹۵ درصد و تخلیه آن، به مدت ۲ ساعت در زیر هود لامینار قرار گرفتند تا اتانول باقی‌مانده کاملاً تبخیر شود. سپس در شرایط کاملاً استریل در هر پتری‌دیش حاوی محیط‌کشت جامد ۵۰ بذر از هر ژنوتیپ با فواصل منظم و در سه تکرار کاشته شد. برای کشت بذرها از محیط‌کشت جامد مطابق با روش Little و همکاران در ۲۰۰۵ استفاده گردید. در مرحله مقدماتی، چهار غلظت کلرات پتاسیم، شامل ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در دو اسیدیته ۶ و ۶/۵ بدون حضور نیترات در محیط و در آزمایش بعدی سه غلظت مختلف کلرات پتاسیم شامل ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در ترکیب با سه غلظت مختلف نیترات پتاسیم شامل ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در اسیدیته ۶/۵ به‌کار برده شد. هر مرحله از این مطالعه در سه تکرار انجام گردید. برای تنظیم pH از محلول MES ۱۴درصد (Morpholino-ethanesulfonic acid) و BCP ۰/۱۶درصد (Bromocresol) استفاده شد. بعد از کشت، کلیه پتری‌دیش‌های حاوی بذر به مدت ۴۸ ساعت به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی، دمای شبانه‌روزی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰ درصد و شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه انتقال یافتند. بررسی و ارزیابی تأثیر کلرات بر روی عملکرد HATS، بر اساس درصد برگچه‌های کاملاً باز بعد از هفت روز از آغاز کشت انجام گردید. شایان ذکر است که با توجه به اینکه در شرایط معمولی (بدون کلرات) برای تهیه این محیط از نیترات پتاسیم و کلسیم به عنوان منبع تأمین‌کننده نیتروژن استفاده می‌شود، بنابراین، در شرایط آزمایش کنونی، کمبود عناصر پتاسیم و کلسیم با افزودن غلظت‌های مناسبی از محلول KCl و $CaCl_2$ جبران شد. کلیه آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق، در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی در حداقل سه تکرار طراحی گردید. آنالیز داده‌های حاصل از این تحقیق با نرم‌افزار آماری Sigma Stat و از طریق مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار با احتمال $P\leq0.05$ صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

۱- آزمایش مقدماتی برای بررسی تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات

الف- بررسی تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات در اسیدیته‌های مختلف

بر اساس شکل ۱- الف و ب، در محیط فاقد کلرات یا حاوی ۱۰ میکرومولار کلرات با اسیدیته ۶ در اکثر موارد اختلاف معنی‌داری در درصد برگچه‌های کاملاً باز بین ۶ ژنوتیپ ذکر شده وجود ندارد، به استثنای جهش‌یافته *atnrt2.1* و تیپ وحشی Col در ۱۰ میکرومولار کلرات که به لحاظ این شاخص با سایر ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند (شکل ۱- ب). همان طور که در شکل ۱-ج و د مشاهده می‌گردد، با افزایش غلظت کلرات در محیط این شاخص در شش ژنوتیپ فوق کاهش

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

می‌یابد (مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف کلرات در آزمایش مقدماتی، همچنین غلظت‌های مختلف کلرات و نیترات در آزمایش نهایی از طریق آزمون دانکن انجام، ولی نتایج آن ارائه نشده است). با وجود این، در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرات جهش‌یافته *atnrt2.1* بالاترین میزان این شاخص را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد.

همان طور که در شکل ۲- الف تا د مشاهده می شود، با افزایش غلظت کلرات در محیط دارای اسیدیته ۶/۵ درصد برگچه‌های کاملاً باز کاهش معنی‌داری را برای همه ژنوتیپ‌های مورد اشاره نشان می‌دهد (نتایج آماری مربوط به این مقایسه ارائه نشده است). با وجود این، در غلظت‌های بالاتر کلرات (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) جهش‌یافته *atnrt2.1* افزایش معنی‌داری را در این شاخص در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر از خود ارائه می نماید (شکل ۲- ج و د). علاوه بر این، درغلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرات درصد برگچه‌های کاملاً باز در تیپ وحشی WS بعد از جهش‌یافته *atnrt2.1* دارای افزایش معنی‌داری است.

کلرات یک علف‌کش و یک ماده برگ ریز و تجزیه‌کننده کلروفیل است که در مطالعات اولیه فیزیولوژی جذب نیترات به عنوان یک آنالوگ نیترات، به ویژه در غلظت‌های بالا بسیار مؤثر بوده است. کلرات برای اولین بار برای شناسایی جهش‌یافته‌های مقاوم به غلظت‌های بالای کلرات با عنوان chl1 در گیاه آرابیدوپسیس استفاده شد (Tsay *et al.*, 1993). این تحقیقات نشان داد که ژن *CHL1* (که به آن ژن *AtNRT1.1* نیز گفته می‌شود) احتمالاً یک ناقل LATS را برای جذب کلرات (نیترات) کد می‌نماید. در این بخش از تحقیق، از جهش‌یافته‌های *atnrt2.1*، *chl1-5* (با زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS) و جهش‌یافته *atnrt2.4* (با زمینه ژنتیکی اکوتیپ Col) استفاده شد. جهش‌یافته *atnrt2.1* به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های پایین کلرات بر جذب آن به واسطه HATS انتخاب شد. با توجه به این که مطالعات قبلی حاکی از تشدید بیان ژن *AtNRT2.4* در فقدان عملکرد ژن *AtNRT2.1* است (Orsel *et al.*, 2004)، جهش‌یافته *atnrt2.4* برای تعیین نقش ژن *AtNRT2.4* در جذب غلظت‌های میکرومولاری کلرات استفاده گردید.

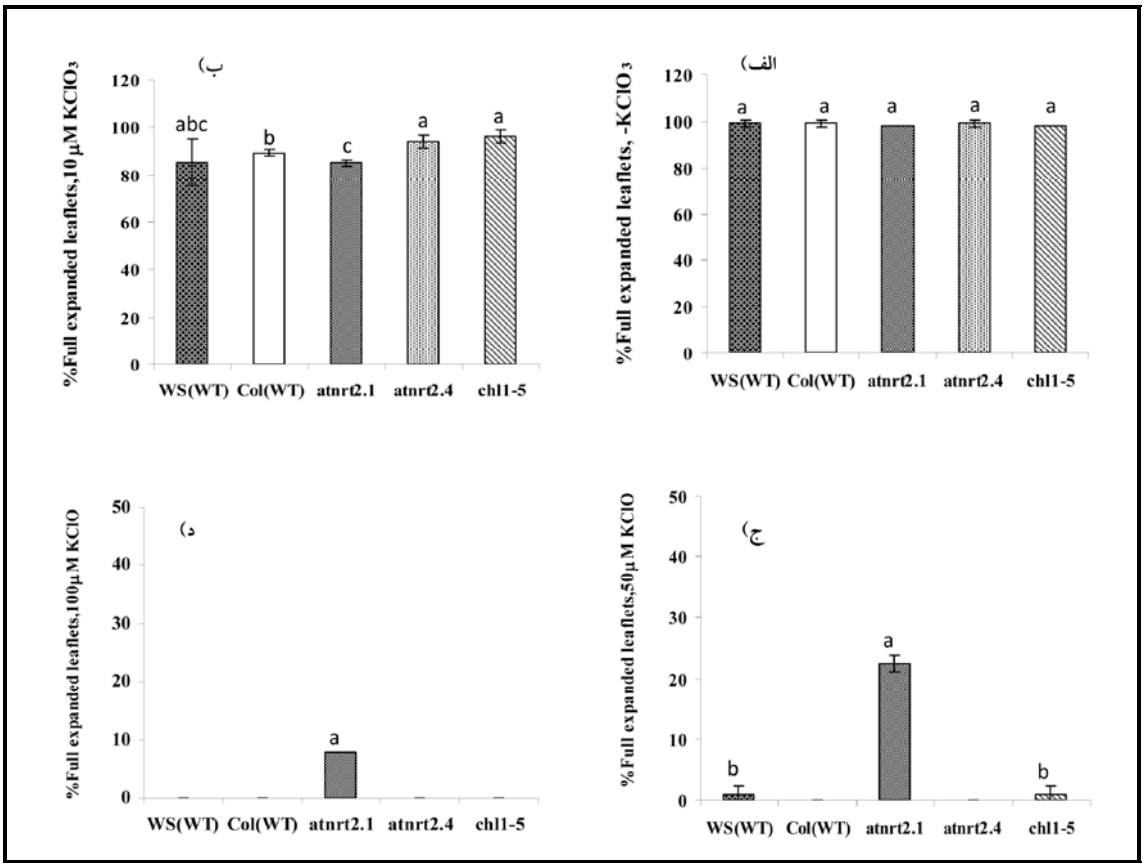
همچنین، برخی مطالعات (Lie *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998) بیانگر آن است که ژن *CHL1* یک ناقل با تمایل دوگانه LATS و HATS را برای جذب نیترات کد می‌کند، بنابراین جهش‌یافته *chl1-5* استفاده شد تا تأثیر غلظت‌های پایین کلرات بر این جهش‌یافته بررسی گردد.

بر اساس مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۳ توسط Okamoto و همکاران، پیشنهاد شده است که ژن *AtNRT2.4* در گروه ژن‌های القا شونده توسط نیترات قرار می‌گیرد، در حالی که بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات ذوفن و همکاران در سال ۱۳۸۹ با استفاده از گیاهان آرابیدوپسیس جهش‌یافته و تراریخت در این ژن، به نظر می‌رسد که ژن مذکور جزو ژن‌های ممانعت‌شونده توسط نیترات باشد؛ به طوری که بیان آن در شرایط غنی از نیترات کاهش و با برقراری شرایط محرومیت از نیتروژن افزایش می‌یابد. با وجود این، نقش دقیق ژن *AtNRT2.4* در جذب غلظت‌های پایین نیترات در گیاهان هنوز مشخص نشده است. با توجه به کاهش معنی‌دار درصد برگچه‌های کاملاً باز در جهش‌یافته *atnrt2.4* در مقایسه با جهش‌یافته *atnrt2.1* (شکل ۱- ج و د، شکل ۲- ج و د) در دو اسیدیته ۶ و ۶/۵ و نتایج حاصل از بررسی میزان جذب

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

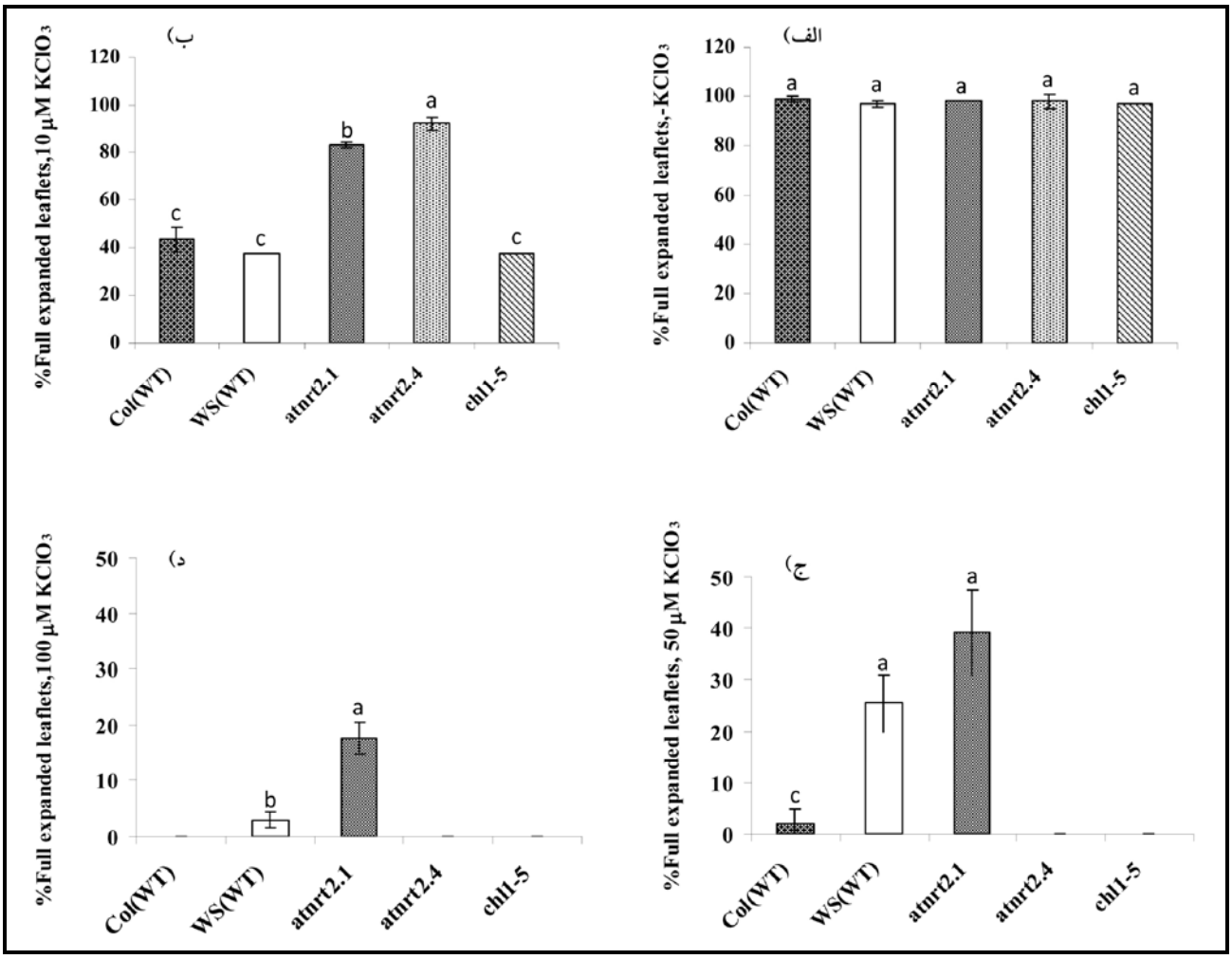
$^{15}NO_3$ در لاین‌های این جهش‌یافته که با ژن *AtNRT2.4* تراریخت شده‌اند (ذوفن، ۱۳۸۷)، به نظر می‌رسد که احتمالاً پروتئین حاصل از بیان ژن *AtNRT2.4* در جذب مستقیم غلظت‌های پایین نیترات توسط ریشه‌ها به عنوان یک سیستم HATS مشارکت ندارد.

اگرچه پیشنهاد شده است که ناقل CHL1 یک ناقل با تمایل دوگانه LATS و HATS است (Huang *et al.*, 1999)، با این حال، اختلال در بیان ژن *AtCHL1-5*، درصد برگچه‌ها را در قیاس با جهش‌یافته *atnrt2.1* به شدت کاهش می‌دهد و این کاهش در سطح قابل مشاهده برای تیپ وحشی است (شکل ۱- ج و د، شکل ۲- ج و د). بنابراین، با تکیه بر این نتایج تصور می‌شود که ژن *AtNRT2.1* نقش اصلی و کلیدی را در عملکرد HATS ایفا می‌نماید؛ به طوری که ایجاد جهش در ژن *AtCHL1* و یا ژن *AtNRT2.4* نمی‌تواند به ایجاد مقاومت در ژنوتیپ‌های مربوطه در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولاری کلرات منجر گردد، در حالی که اختلال در بیان ژن *AtNRT2.1* با ممانعت از جذب کلرات به ایجاد مقاومت در برابر کلرات، بروز سمّیت کمتر و در نتیجه درصد جوانه‌زنی بالاتر منجر می‌گردد.



شکل ۱- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف) ۰؛ ب) ۱۰؛ ج) ۵۰ و د) ۱۰۰ میکرومولار کلرات در محیط بدون نیترات با اسیدیته ۶ در آرابیدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی اکوتیپ Col و WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار ± SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com



شکل ۲- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف)۰؛ ب)۱۰؛ ج)۵۰ و د)۱۰۰ میکرومولار کلرات در اسیدیته ۶/۵ در آرابیدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی دو اکوتیپ Col و WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار ± SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

۲- تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات به همراه غلظت‌های پایین نیترات

با توجه به اینکه نتایج حاصل از آزمایش مقدماتی نشان داد که جهش‌یافته *atnrt2.1* بالاترین میزان مقاومت به کلرات را به ویژه در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار هم در اسیدیته ۶ و هم در اسیدیته ۶/۵ دارد، بنابراین، در آزمایش دوم از جهش‌یافته *atnrt2.1*، جهش‌یافته *atnrt2.1* تراریخته شده با ژن *NpNRT2.1* از تنباکو و آرابیدوپسیس تراریخته شده با ژن *AtNRT2.1* استفاده شد تا نقش و توانایی ژن *AtNRT2.1* در جذب کلرات به شکل دقیق‌تری بررسی گردد. کلیه ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این قسمت از تحقیق دارای زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS بودند. از طرف دیگر، نتایج آزمایش مقدماتی بیانگر آن بود که اسیدیته ۶ در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرات مقاومت کمتری را در جهش‌یافته *atnrt2.1* و تیپ وحشی WS در مقایسه با اسیدیته ۶/۵ نشان می‌دهد. بنابراین، برای تعیین و درک بهتر نقش ژن *AtNRT2.1* در جذب کلرات تصمیم

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

گرفته شد که در آزمایش دوم فقط اسیدیته ۶/۵ به محیط کشت اعمال گردد. علاوه بر این، آزمایش اول بیانگر آن بود که غلظت ۱۰۰ میکرومولار کلرات تقریباً برای همه ژنوتیپ‌ها به استثنای جهش‌یافته *atnrt2.1* کُشنده است. همچنین، به نظر می‌رسید که عدم حضور نیترات در محیط باعث از بین رفتن سریع‌تر گیاهچه‌ها توسط کلرات می‌گردد. بنابراین، در بخش دوم این تحقیق و در یک طراحی جدید حداکثر غلظت کلرات ۵۰ میکرومولار و به همراه سه غلظت مختلف نیترات شامل ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار نیترات انتخاب شد.

همان طور که در شکل ۳ - الف، ب و ج مشاهده می‌شود، در محیط فاقد نیترات با افزایش غلظت کلرات درصد برگچه‌های کاملاً باز در همه ژنوتیپ‌ها از خود کاهش نشان می‌دهد. با این حال، این کاهش در جهش‌یافته *atnrt2.1* به طور معنی‌داری کمتر است. در محیط حاوی ۵۰ میکرومولار کلرات، تشدید بیان ژن *NpNRT2.1* در جهش‌یافته *atnrt2.1* به کاهش شدید شاخص ذکر شده در سطح مشاهده شده برای تیپ وحشی منجر می‌شود (شکل ۳- ج).

با افزودن ۲۵ میکرومولار نیترات به محیط، افزایش غلظت کلرات به کاهش درصد برگچه‌های کاملاً باز در همه ژنوتیپ‌ها منجر می‌گردد (شکل ۴- الف، ب و ج). با وجود این، جهش‌یافته *atnrt2.1* بالاترین درصد شاخص رشدی فوق را نشان می‌دهد.

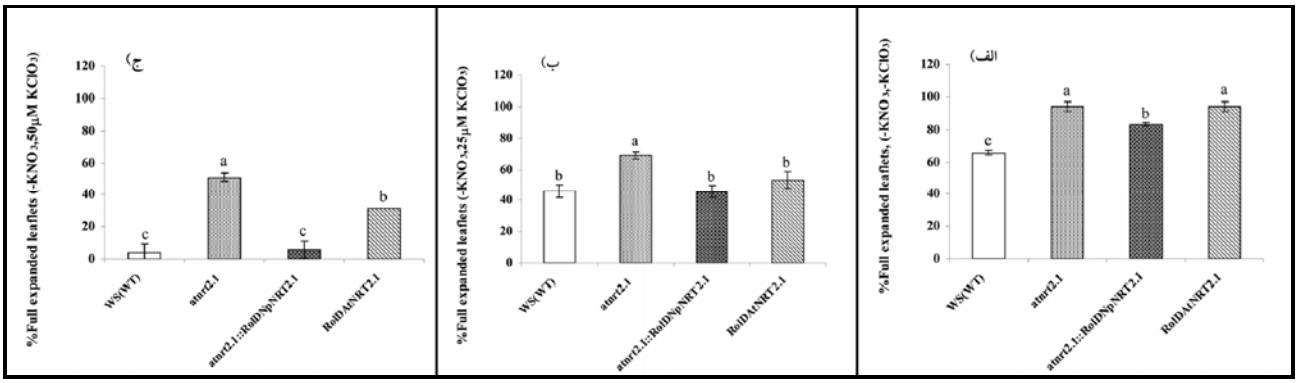
بر اساس شکل ۵- الف، ب و ج، درصد برگچه‌های کاملاً باز در جهش‌یافته *atnrt2.1* و گیاهان تراریخت شده با ژن *AtNRT2.1* در مقایسه با تیپ وحشی و جهش‌یافته تراریخت شده با ژن *NpNRT2.1* در محیط حاوی ۵۰ میکرومولار نیترات با سه غلظت مختلف کلرات، به ویژه در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار از خود افزایش نشان می‌دهد. بخش دوم این تحقیق با هدف درک بهتر نقش ژن *NRT2.1* و تکمیل نتایج به دست آمده از بخش اول انجام گردید. نتایج حاصل از بخش مقدماتی نشان می‌دهد که احتمالاً ژن *AtNRT2.1* عملکرد اصلی را در جذب نیترات از این طریق دارد (شکل‌های ۱ و ۲). جهش‌یافته *atnrt2.1* تراریخت شده با ژن *NpNRT2.1* از گیاه تنباکو، باعث کاهش قابل توجه مقاومت گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تالیانا، به ویژه در غلظت ۵۰ میکرومولار کلرات همراه با غلظت‌های ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرو مولار نیترات می‌گردد، به طوری که این کاهش در سطح مشاهده شده برای تیپ وحشی است (شکل‌های ۳، ۴ و ۵ موارد ب و ج).

بنابراین، به نظر می‌رسد که احیای بیان ژن *NRT2.1* در جهش‌یافته *atnrt2.1* با فعال کردن سیستم HATS و جذب کلرات، شرایط را برای کاهش شاخص فوق فراهم نموده است. با وجود این، بر اساس برخی از نتایج به دست آمده از این تحقیق تشدید بیان ژن *AtNRT2.1* تحت کنترل پروموتر RolD در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا منجر به جذب بیشتر کلرات و در نتیجه کاهش درصد برگچه‌های کاملاً باز نشده است (شکل ۳- ج). با توجه به تأیید بیان ژن انتقالی *NpNRT2.1* در جهش‌یافته *atnrt2.1* در سطح کپی‌برداری و ترجمه (مکاتبه شخصی با Daniel-Vedele)، تصور می‌شود که عوامل درونی ناشناخته‌ای در سطوح بعد از کپی‌برداری (برای مثال، افزایش بیش از حد کپی‌های ژن بر اثر بیان مداوم ژن انتقالی) از بیان پروتئین عملکردی و فعال تحت شرایط آزمایش کنونی ممانعت می‌نمایند؛ به طوری که بیان مداوم ژن انتقالی منجر به کاهش درصد برگچه‌های کاملاً باز در اکثر موارد، به ویژه در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار نیترات نمی‌گردد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵

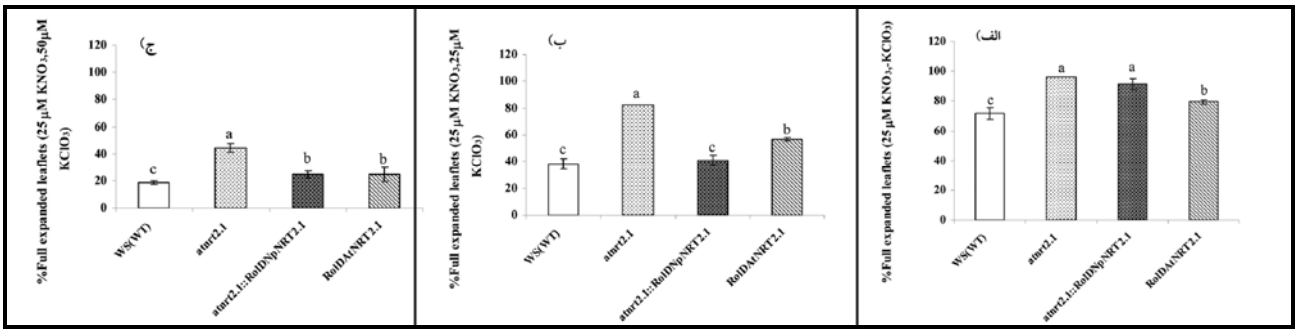
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

موارد ب و ج). همان‌طور که در نتایج حاصل از بخش دوم مشاهده می‌شود، اعمال نیترات به محیط در حضور کلرات، از کاهش بیش از حد شاخص رشدی مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های ذکر شده ممانعت می‌نماید؛ به طوری که با افزایش غلظت نیترات در محیط، حتی تیپ وحشی نیز اندکی مقاومت در برابر غلظت‌های میکرومولاری کلرات از خود نشان می‌دهد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵).

با توجه به اینکه کلرات به عنوان یک آنالوگ نیترات عمل می‌کند، به نظر می‌رسد که نیترات و کلرات در رقابت با یکدیگر توسط یک سیستم ناقل مشترک جذب می‌شوند و جذب نیترات می‌تواند تا حدودی از آثار مخرب کلرات بر شاخص رشدی مذکور جلوگیری نماید. در یک جمع‌بندی کلی و با تکیه بر نتایج به دست آمده از تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات بر روی سیستم HATS، مجدداً نتایج مطالعات فیزیولوژیک و مولکولی انجام شده (Cerezo *et al*., 2001; Chopin *et al*., 2007; Fraisier *et al*., 2000; Nazoa *et al*., 2003;Orsel *et al*., 2003 مبنی بر مشارکت مستقیم ژن *NRT2.1* در جذب غلظت‌های پایین نیترات به واسطه HATS تأیید می‌گردد.

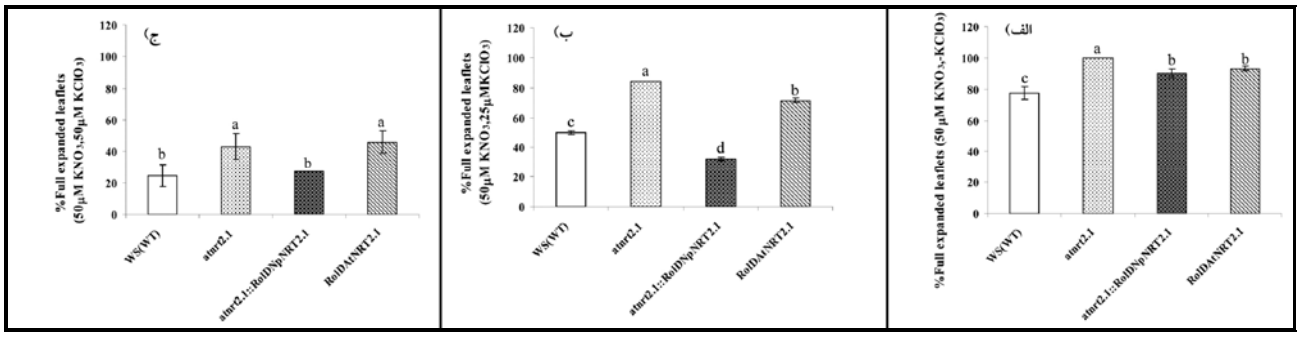


شکل ۳- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف)۰؛ ب)۲۵ و ج)۵۰ میکرومولار کلرات در محیط بدون نیترات با اسیدیته ۶/۵ در آرابیدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار ± SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۴- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف)۰؛ ب)۲۵ و ج)۵۰ میکرومولار کلرات در محیط دارای ۲۵ میکرومولار نیترات با اسیدیته ۶/۵ در آرابیدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار ± SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com



شکل ۵- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف)۰؛ ب)۲۵ و ج)۵۰ میکرومولار کلرات در محیط دارای ۵۰ میکرومولار نیترات با اسیدیته ۶/۵ در آرابیدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار ± SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات کشاورزی INRA واقع در کشور فرانسه جهت تأمین منابع بذری قدردانی می‌گردد.

منابع

ذوفن، پ. (۱۳۸۷) فیزیولوژی جذب نیترات توسط ناقل NRT2.1 در گیاه ترانسژنی تنباکو (*Nicotiana plumbaginifolia*). پایان‌نامه دکتری، دانشگاه اصفهان، اصفهان.

ذوفن، پ.، شریعتی، م. و دنیل- ودل، ف. (۱۳۸۹) پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی ناقل AtNRT2.4 به شرایط محرومیت نیتروژن در گیاه *Arabidopsia thaliana*. مجله زیست‌شناسی ایران ۲۳: ۹۴- ۱۰۸.

Cerezo, M., Tillard, P., Filleur, S., Munos, S., Daniel-Vedele, F. and Gojon, A. (2001) Major alterations of the regulation of root NO^-_3 uptake are associated with the mutation of *NRT2.1* and *NRT2.2* genes in *Arabidopsis*. Plant Physiology 127: 262-271.

Chopin, F., Wirth, J., Dorbe, M. F., Lejay, L., Krapp, A., Gojon, A. and Daniel-Vedele F. (2007) The *Arabidopsis* nitrate transporter ATNRT2.1 is targeted to the root plasma membrane. Plant Physiology and Biochemistry 45: 630-635.

Crawford, N. M. and Glass, A. D. M. (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends in Plant Science 3: 389-395.

Doddema, H., Hofstra, J. J. and Feenstra, W. J. (1978) Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. I. Effect of nitrogen source during growth on uptake of nitrate and chlorate. Physiologia Plantarum 43: 343-350.

Fraisier, V., Gojon, A., Tillard, P. and Daniel-Vedele, F. (2000) Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. Plant Journal 23: 489-496.

Filleur, S. and Daniel-Vedele, F. (1999) Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Arabidopsis thaliana by differential display. Planta 207: 461-469.

Filleur, S., Dorbe, M. F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A. and Daniel-Vedele, F. (2001) An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *NRT2* genes is impaired in nitrate uptake. Federation of European Biochemical Societies Letters 489: 220-224.

Forde, B. G. and Clarkson, D. T. (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. Advances in Botanical Research 30: 1-90.

Glass, A. D. M., Shaff, J. E. and Kochian, L. V. (1992) Studies of nitrate uptake in barley. IV: electrophysiology. Plant Physiology 99: 456-463.

Huang, N. C., Liu, K. H., Lo, H. J. and Tsay, Y. F. (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. The Plant Cell 11: 1381-1392.

Kronzucker, H. G., Siddiqi, M. Y. and Glass, A. D. M. (1995) Kinetics of NO_3 influx in spruce. Plant Physiology 109: 319-326.

Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N. M., Siddiqi, M. Y. and Glass, A. D. M. (2007) Dissection of the *AtNRT2.1*: *AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. Plant Physiology 143: 425-433.

Little, D. Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A. and Malamy, J. E. (2005) The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 102: 13693-13698.

Liu, K. H., Huang, C. Y. and Tsay, Y. F. (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate uptake. The Plant Cell 11: 865-874.

Miller, A. J. and Smith, S. J. (1992) The mechanisms of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells. Planta 187: 554-557.

Nazoa, P., Vidmar, J. J., Tranbarger, T. J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P., Zhou, D., Glass, A. D. M. and Touraine, B. (2003) Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. Plant Molecular Biology 52: 689-703.

Okamoto, M., Vidmar, J. J. and Glass, A. D. M. (2003) Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. Plant Cell Physiology 44: 304-317.

Orsel, M., Eulenburg, K., Krapp, A. and Daniel-Vedele, F. (2004) Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restritcs growth at low external nitrate concentration. Planta 219: 714-721.

Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J. and Rufty, T. (1990) Studies of the uptake of nitrate in barley: I. Kinetics of $^{13}NO_3$ influx. Plant Physiology 93: 1426-1432.

Tsay, Y. F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A. and Crawford, N. M. (1993) The herbicide sensivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. Cell 72:705-713.

Wang, R., Liu, D. and Crawford, N. M. (1998) The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 95: 1248-1254.

Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J. J. and Glass, A. D. M. (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2:1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 17: 563-568.

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com