

استفاده از چند تنظیم کننده رشد در یافتن موتان مؤثر بر سنتز جیبرلین در آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)

حسین میرزایی ندوشن

تهران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲

تاریخ دریافت: ۸۶/۴/۲۰

چکیده

محققین تلاش زیادی در شناسایی موتانهایی دارند که بتوانند آنها را در شناخت کامل مسیر بیوسنتز جیبرلین در گیاه کمک کنند. به همین منظور در این بررسی اثر غلظتهای مختلف سه ماده شیمیایی به نامهای یونیکانازل، ایزوکساین و پروناماید بر رشد آرابیدوپسیس و نیز اثرات متقابل آنها بررسی شد تا با استفاده از مخازن ژنی متنوع موجود در آرابیدوپسیس، موتانهایی که توانایی لازم در جهت ادامه رشد در حضور این بازدارندههای رشد را دارند شناسایی شوند. ابتدا غلظت بحرانی مواد مذکور بر جوانه زنی بذر و رشد گیاه آرابیدوپسیس تعیین شد. اثر متقابل سطوح محدوده غلظت بحرانی این مواد که می تواند به شناسایی موتانهایی منجر شود که در برابر اثر بازدارندگی رشد این مواد مقاومت کنند تعیین شد. در قالب دو طرح آزمایشی جداگانه، اثر ترکیب غلظتهای متفاوتی از یونیکانازل با ایزوکساین و ترکیب غلظتهای متفاوتی از یونیکانازل با پروناماید بر جوانه زنی و رشد گیاهچه آرابیدوپسیس بررسی گردید. ترکیبی که بیشترین اثر متقابل بر جوانه زنی و رشد را از خود نشان داد تعیین و در غربال کردن مخازن ژنی متنوعی از آرابیدوپسیس مورد استفاده قرار گرفت. بین بعضی از سطوح غلظت مورد بررسی مواد مورد نظر، اثرات متقابل معنی داری بر رشد آرابیدوپسیس مشاهده شد. در سطح بالای یونیکانازل (۳۹۵ نانومولار) سطوح ایزوکساین و پروناماید بیشتر از هیپوکتیل بر رشد ریشه تأثیر داشتند. سرعت تأثیر پروناماید بر کاهش رشد هیپوکتیل و ریشه بسیار بیشتر از ایزوکساین بود. ترکیبهای مورد استفاده در ضخامت مرستم انتهایی ریشه اثر عکس داشتند و با افزایش غلظت اگرچه طول هیپوکتیل و ریشه کاهش پیدا کرد ولی ضخامت مرستم انتهایی با افزایش غلظت مواد افزایش یافت. مخازن ژنی مورد نظر در ترکیب انتخابی مواد کشت شدند و تعدادی از بذور سبز شده و به رشد خود ادامه دادند که در ادامه کار با مراقبت از این گیاهچهها تعدادی گیاه تولید بذر نمودند که از آنها بذرگیری گردید و به عنوان موتانهایی مقاوم به مواد مورد نظر به کار گرفته شدند.

واژه های کلیدی: آرابیدوپسیس، موتان، مقاومت، جیبرلین، یونیکانازل، پروناماید، ایزوکساین.

نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۵۸۰۲۲۲ پست الکترونیکی: nodoushan2003@yahoo.com

مقدمه

برگ، ریشه، زودرسی و نظائر آن می شوند (۹). سالهاست که مسیر تولید اسید جیبرلیک در گیاهان یکی از دغدغه های اساسی محققین می باشد. اساساً جیبرلینها در تعدادی از فرایندهای رشدی و تکاملی گیاهان از جمله جوانه زدن بذر، رشد طولی ساقه، گلدهی و نیز تکامل و رشد میوه و بذر دخیل هستند (۱۵). در سایر گیاهان نظیر ذرت نیز کاربرد جیبرلین موجب بروز صفات بلوغ به ویژه تولید

آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) به عنوان گیاه مدل دارای ویژگیهایی است که به جرأت می توان گفت تا کنون خدمات زیادی را به محققین و علم ژنتیک نموده است. طی سالهای گذشته تعداد زیادی موتان در آرابیدوپسیس شناسایی شده است که هر یک به نوعی موجب بروز نقص یا تظاهر خاصی در این گیاه می گردد. این موتانها موجب تغییر در برخی از ویژگیهای گیاه، نظیر تشکیل بذر، گل،

سنجش غلظت بحرانی مواد شیمیایی مورد نظر: با توجه به اینکه غلظت بحرانی هیچیک از مواد مذکور بر بذر آراییدوپسیس معلوم نبود، آزمایشهای متعددی انجام شد تا اثر هر یک از غلظتهای تهیه شده از مواد مذکور بر بذر اکوتیپ کلمبیا از گونه آراییدوپسیس بررسی شود. غلظتهای بحرانی برای هر یک از مواد مورد استفاده در ممانعت از جوانه زنی بذر و رشد آراییدوپسیس متفاوت بود. در نهایت دامنه غلظتهای مورد استفاده سه ماده شیمیایی اصلی در مطالعات تکمیلی و نیز آزمون دوبعدی جوانه زنی بذور به شرح جدول ۱ مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- مواد شیمیایی و غلظت مورد استفاده آنها

ردیف	ماده شیمیایی	غلظت مینیمم (نانومولار)	غلظت ماکزیمم (میکرومولار)
۱	یونیکانازل	۲۵	۵۰
۲	ایزوکساین	۰/۷۶	۵۰
۳	پروناماید	۵۰	۵۰

به منظور بررسی اثر غلظتهای مختلف این مواد بر جوانه زنی بذر و رشد آراییدوپسیس، ابتدا به محیط MS، آگار با غلظت ۱ در صد اضافه گردید. در ادامه، ۲۰ میکرولیتر از هر یک از غلظتهای مواد مورد نظر با ۲۰ میلی لیتر محیط کشت در یک پتری دیش مخلوط گردید. لازم به ذکر است که با توجه به اینکه در این آزمایش ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت از مواد مذکور با ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت مخلوط گردید غلظت نهایی مورد مطالعه هزار برابر از غلظت محلولهای پایه رقیق تر شد. از این رو به عنوان نمونه در خصوص یونیکانازل غلظتهای ۵۰ nM (نانومولار) تا ۵۰ μM (میکرومولار) مورد مطالعه قرار گرفتند

ضد عفونی کردن بذر: بذرهای مورد نظر با استفاده از محلول ۱۰ درصد هیپوکلرید سدیم و ۰/۰۵ درصد تریتون ضد عفونی گردیدند. به این صورت که ابتدا بذور به اندازه مورد نیاز توزین گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در

پرزهای سطحی برگ در خلال فاز رشد رویشی می‌گردد (۵). در آراییدوپسیس موتانهایی که موجب تضعیف سنتز جیبرلین می‌شوند بروز صفات بلوغ را به تأخیر می‌اندازند در حالی که در مقابل، کاربرد مصنوعی جیبرلین گذر از جوانی به بلوغ را تسریع می‌کند (۳ و ۱۷). به رغم رشد فزاینده اطلاعات مربوط به تنظیم فاز رشد رویشی (۲، ۸، ۹ و ۱۱)، مکانیسمی که از طریق آن جیبرلین جنبه‌های مختلف رشد و رسیدن به مرحله بلوغ را تنظیم می‌کند ناشناخته است (۷). به همین دلیل محققین تلاش زیادی در بررسی مسیر تولید جیبرلین در گیاه نموده و موتانهایی متعددی که در این مسیر مفید فایده هستند را کشف و به کار گرفته‌اند (۶، ۱۳ و ۱۶). از کارآمدترین روشهایی که به وسیله آن می‌توان موتانهایی تأثیر گذار بر مسیر تولید جیبرلین را یافته و به کار گرفت مطالعه مخازن متنوع زنی آراییدوپسیس در غلظتهای بحرانی مواد و هورمونهای است که از اثرات جیبرلین ممانعت به عمل می‌آورند. به همین منظور در این بررسی اثر غلظتهای مختلف سه ماده شیمیایی از جمله یونیکانازل، ماده‌ای که از تولید اسید جیبرلیک جلوگیری کرده (۱۲) و از این طریق مانع رشد گیاه می‌شود، ایزوکساین و پروناماید که هر دو بازدارنده رشد هستند (۱۰ و ۱۴) بر رشد آراییدوپسیس و نیز اثرات متقابل آنها بررسی شد تا موتانهایی که ویژگیهای بازدارندگی این مواد را خنثی می‌کنند شناسایی شوند.

مواد و روشها

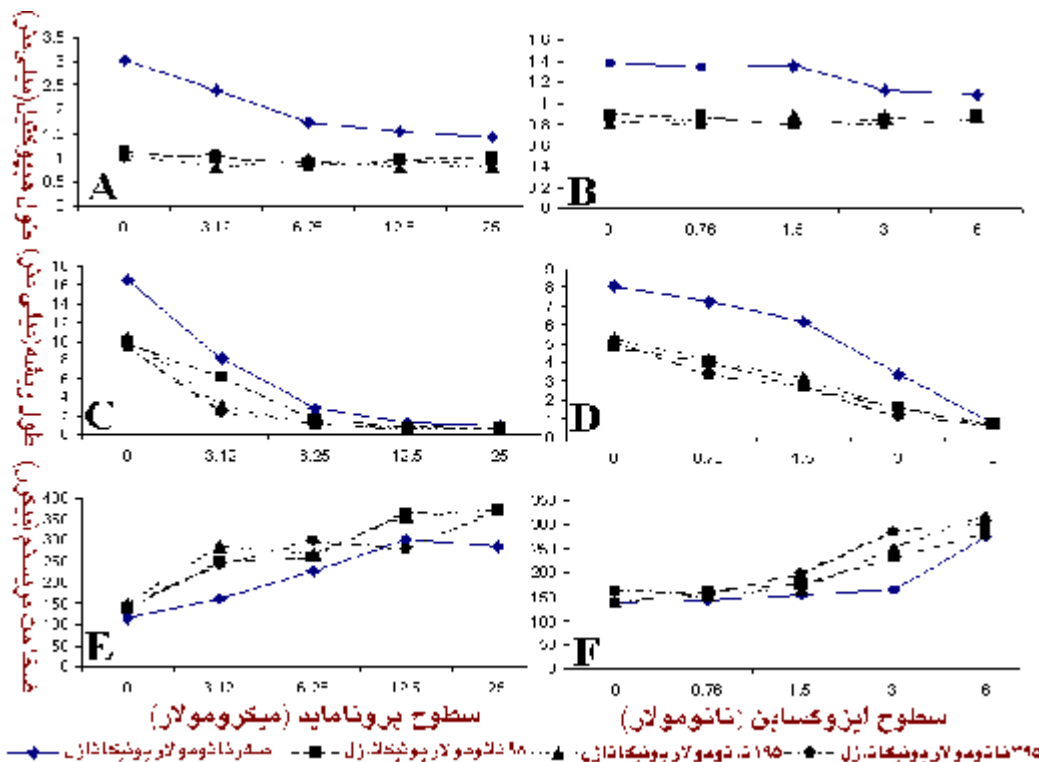
ابتدا محلول ۵۰ میلی‌مولار از مواد شیمیایی به نامهای پروناماید (Pronamide)، ایزوکساین (Isoxaben) و یونیکانازل (Uniconazol) تهیه شد. در ادامه هفده غلظت متوالی ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸، ۰/۳۹، ۰/۱۹۵، ۰/۰۹۸، ۰/۰۴۹، ۰/۰۲۴، ۰/۰۱۲، ۰/۰۰۶، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۱۵ و ۰/۰۰۰۷۶ میلی مولار از هر یک از مواد مذکور در محلول Dimethyl sulfoxide (DMSO) تهیه گردید.

سانتیگراد قرار داده شدند تا نیاز سرمایی بذرهای تأمین گردد. روز پنجم پتری دیشها در ژرمیناتور و در شرایط نوری کامل قرار داده شدند. پس از جوانه زدن بذرهای، نسبت به شمارش بذرهای جوانه زده و تعیین درصد آنها در زیر بینوکولار اقدام گردید. اولین سطحی از مواد که بذر در آنها جوانه زده بود به عنوان سطح بحرانی ماده مذبور قلمداد گردید.

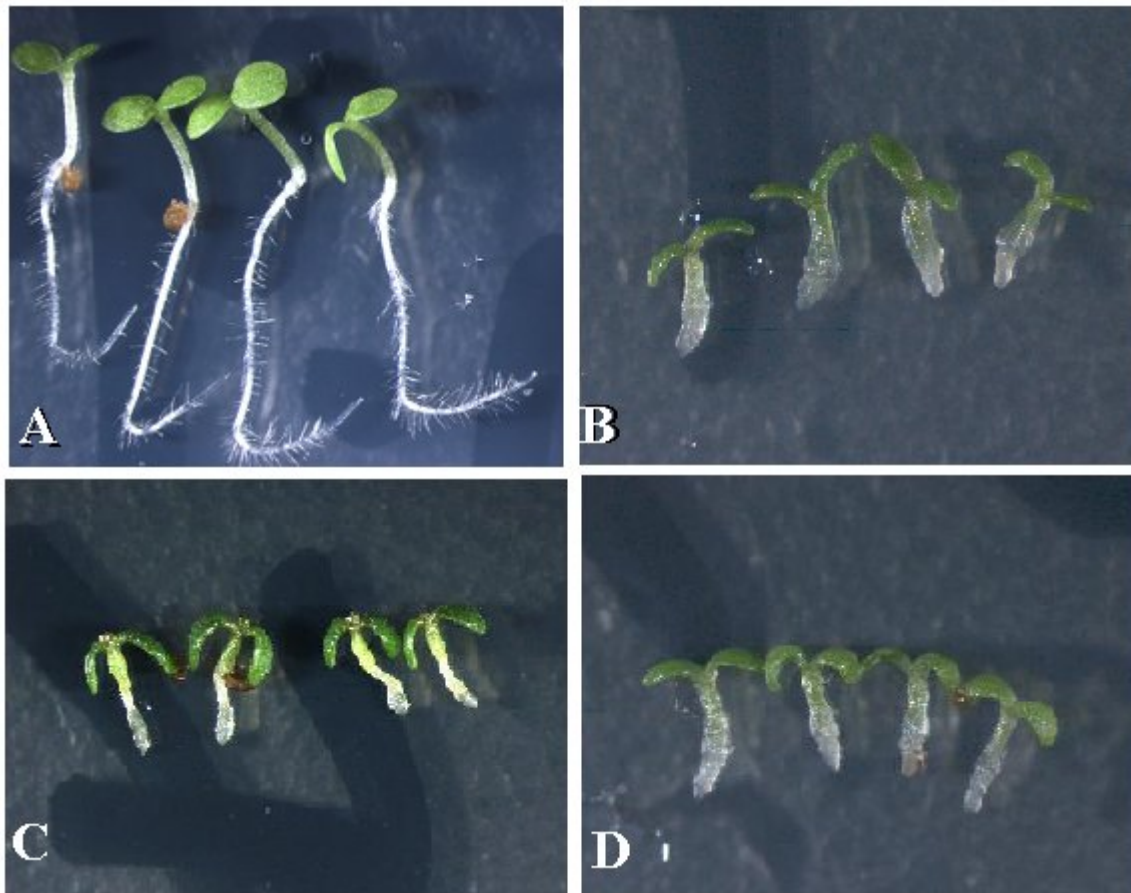
آزمون دوبعدی سنجش سطح بحرانی و اثرات متقابل مواد: با توجه به اینکه اثرات متقابل بین بعضی از مواد آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق موجب بروز صفات یا شناسایی موتانهایی می شود که می توانند در رسیدن به اهداف موصوف مورد استفاده قرار گیرند، تصمیم گرفته شد که اثرات متقابل مواد مورد استفاده در محدوده سطوح بحرانی آنها مورد بررسی قرار گیرد.

محلول مذکور قرار داده شد. پس از سانتیفریوژ محلول حاوی بذور در ۴۰۰۰ دور در دقیقه و ته نشین شدن بذرهای محلول ضد عفونی کننده تخلیه شد. در ادامه با آب مقطر استریل ۵ مرتبه بذرهای به همان صورت شسته شد تا بقایای هیپوکلرید سدیم که مانع جوانه زنی بذر می گردد از بذرهای جدا شود.

کشت بذر در شرایط استریل: پس از سرد شدن محیط کشت حاوی مواد شیمیایی با غلظت مورد نظر در بستر آگار در پتری دیش و ضد عفونی کردن بذرهای، در هر پتری دیش به تعداد حدود ۱۰۰۰ عدد بذر استریل شده از اکوتیپ کلمبیا قرار داده شده و در سطح آگار به طور یکنواخت پراکنده شدند. در محیط کشتهای شاهد نیز ۲۰ میکرولیتر DMSO استفاده شد تا شرایط مشابهی غیر از غلظت مواد شیمیایی، در پتری دیشها ایجاد شود. در ادامه، پتری دیشها به مدت ۳ تا ۴ روز در دمای ۴ درجه



شکل ۱- اثرات متقابل سطوح مختلف ایزوکساین و پروناماید با یونیکانازل در رشد گیاهچه آرابیدوپسیس. A = اثر متقابل پروناماید و یونیکانازل بر طول هیپوکتیل. B = اثر متقابل ایزوکساین و یونیکانازل بر طول هیپوکتیل. C = اثر متقابل پروناماید و یونیکانازل بر طول ریشه. D = اثر متقابل ایزوکساین و یونیکانازل بر طول ریشه. E = اثر متقابل پروناماید و یونیکانازل بر ضخامت مرستم انتهایی ریشه. F = اثر متقابل ایزوکساین و یونیکانازل بر ضخامت مرستم انتهایی ریشه.



شکل ۲ - A = نمونه‌ای از گیاهچه‌های حاصل از رویش بذر آرابیدوپسیس در شرایط شاهد، بدون حضور مواد شیمیایی در سن ۱۰ روزگی گیاهچه. B = نمونه‌ای از گیاهچه‌های حاصل از رویش بذر آرابیدوپسیس در حضور ترکیبی از ایزوکساین و یونیکانازل در سن ۱۰ روزگی گیاهچه. C = نمونه‌ای از گیاهچه‌های حاصل از رویش بذر آرابیدوپسیس در حضور پروناماید در سن ۱۰ روزگی گیاهچه. D = نمونه‌ای از گیاهچه‌های حاصل از رویش بذر آرابیدوپسیس در حضور یونیکانازل در سن ۱۰ روزگی گیاهچه

دیشها پس از تأمین نیاز سرمائی در نور مناسب قرار داده شدند و پس از حدود ده روز (ترکیبهای یونیکانازل و ایزوکساین روز دهم و ترکیبهای یونیکانازل و پروناماید روز یازدهم) با رشد مناسب گیاهچه‌ها در هر واحد آزمایشی روی چهار تک گیاه که به صورتی که در شکل ۲ نمایش داده شده مرتب شدند، صفات طول هیپوکوتیل، طول ریشه و ضخامت مریستم انتهایی ریشه اندازه گیری شد. به این ترتیب برای هر صفت در هر آزمایش ۲۴۰ تک گیاه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. از آنجا که در این شرایط گیاهچه‌های آرابیدوپسیس بسیار ریز هستند، به ویژه ضخامت مریستم انتهایی که کسری از میلی‌متر است با

به همین منظور آزمایشهایی طراحی گردید که به تبع آن اثرات متقابل مواد به ترکیبی که در جداول ۲ و ۳ ارائه شده‌اند بر جوانه‌زنی و رشد آرابیدوپسیس، مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفت. انتخاب سطوح مواد بر اساس سطح بحرانی هریک از آنها بر جوانه‌زنی و رشد اکوتیپ کلمبیا بر آرابیدوپسیس صورت گرفت. به ازای هریک از ترکیبات اشاره شده در جداول ۲ و ۳ بذر اکوتیپ کلمبیا از آرابیدوپسیس در قالب دو طرح آزمایشی کاملاً تصادفی (RCD) هریک با سه تکرار روی محیط کشت حاوی غلظتهای مورد نظر (جداول ۲ و ۳) کشت گردید. هر آزمایش در این مقطع شامل ۶۰ واحد آزمایشی بود. پتری

چشم غیر مسلح قابل اندازه‌گیری نیست، همه اندازه‌گیریها زیر بینوکولار و با استفاده از نرم‌افزار میکرومیتر انجام شد به نحوی که با بزرگنمایی ۲۰ از عدسی شیئی بینوکولار ابتدا و انتهای طول یا ضخامت هر ریشه مورد اندازه‌گیری قرار گرفته و به نرم‌افزار داده شد. نرم‌افزار طول یا ضخامت را به میکرون ثبت نمود. داده‌های حاصل در محیط نرم افزارهای SAS و Excel تجزیه و تحلیل شد و نمودارهای مربوطه رسم گردید.

مخازن ژنی مورد استفاده: مخازن ژنی متنوعی از آرابیدوپسیس توسط Cutler و همکاران (۲۰۰۰) ایجاد شد که می‌توانستند دارای قابلیت‌های متعددی از جمله بروز موتانهای جدید باشند. از این رو از این مخازن ژنی جهت غربال کردن موتانهای مورد نظر استفاده گردید (۴).

انتخاب ترکیب مواد شیمیایی در یافتن موتان: با توجه به اثرات متقابلی که ترکیبهای مختلف مواد از خود نشان دادند، سطوحی از این مواد جهت یافتن موتانهای مورد نیاز انتخاب گردید. با کشت مخازن ژنی مورد نظر در ترکیبهای انتخابی مواد شیمیایی تعدادی از بذور سبز شده و به رشد خود ادامه دادند که از محیط کشت حاوی مواد شیمیایی خارج شده و در محیط کشت معمولی رشد داده شدند. پس از ده روز از انتقال این گیاهچه‌ها به محیط کشت معمولی، آنها را به خاک منتقل کرده و تا تولید بذر در شرایط اتاق رشد نگهداری گردیدند. بذر حاصل از این گیاهان برای مطالعات بعدی برداشت گردید.

جدول ۲ - سطوح و ترکیب مورد استفاده از ایزوکسابن (به نانو مولار) و یونیکانازل (به نانومولار) در ارزیابی اثر متقابل آنها در جوانه‌زنی بذر و رشد اولیه آرابیدوپسیس.

ایزوکسابن					
۰	۰/۷۶	۱/۵	۳	۶	یونیکانازل
۰	۰	۰	۰	۰	۰
۹۸	۹۸	۹۸	۹۸	۹۸	۹۸
۱۹۵	۱۹۵	۱۹۵	۱۹۵	۱۹۵	۱۹۵
۳۹۰	۳۹۰	۳۹۰	۳۹۰	۳۹۰	۳۹۰

جدول ۳ - سطوح و ترکیب مورد استفاده از پروناماید (به میکرومولار) و یونیکانازل (به نانومولار) در ارزیابی اثر متقابل آنها در جوانه‌زنی بذر و رشد اولیه آرابیدوپسیس.

پروناماید					
۰	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	یونیکانازل
۰	۰	۰	۰	۰	۰
۹۸	۹۸	۹۸	۹۸	۹۸	۹۸
۱۹۵	۱۹۵	۱۹۵	۱۹۵	۱۹۵	۱۹۵
۳۹۰	۳۹۰	۳۹۰	۳۹۰	۳۹۰	۳۹۰

جدول ۴ - میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه گیری صفات گیاهچه‌های تحت تأثیر ترکیبهای مختلف ایزوکسابین و یونیکانازل.

منابع تغییر	درجه آزادی	طول هیپوکتیل	طول ریشه	ضخامت مریستم
سطوح یونیکانازل	۳	۰/۶۴۲**	۲۱/۱۳**	۶۰۲۲**
سطوح ایزوکسابین	۴	۰/۰۱۰*	۵۱/۸۶**	۴۸۵۰۷**
اثر متقابل	۱۲	۰/۰۱۹**	۱/۵۷**	۱۲۳۸**
خطا	۴۰	۰/۰۰۳	۰/۲۴	۲۷۲

* و ** = به ترتیب در سطح ۵ و ۱٪ معنی دار

جدول ۵ - میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه گیری صفات گیاهچه‌های تحت تأثیر ترکیبهای مختلف پروناماید و یونیکانازل.

منابع تغییر	درجه آزادی	طول هیپوکتیل	طول ریشه	ضخامت مریستم
سطوح یونیکانازل	۳	۴/۴۱۵**	۲۷/۴**	۱۴۵۹۹**
سطوح پروناماید	۴	۰/۵۸۳**	۲۵۳/۱**	۸۵۲۰۱**
اثر متقابل	۱۲	۰/۲۹۲**	۷/۱**	۲۱۶۵**
خطا	۴۰	۰/۰۱۳	۰/۱	۲۴۴

* و ** = به ترتیب در سطح ۵ و ۱٪ معنی دار

جدول ۶ - میانگین صفات طول هیپوکتیل، طول ریشه و ضخامت مریستم انتهایی ریشه در تیمارهای مختلف حاصل از ترکیب سطوح مختلف یونیکانازل و پروناماید.

سطوح یونیکانازل (نانومولار)	سطوح پروناماید (میکرومولار)	طول هیپوکتیل (میلی متر)	طول ریشه (میلی متر)	ضخامت مریستم انتهایی (میکرون)
	۰	۳/۰۱۸	۱۶/۴۸۸	۱۱۳/۵۷
	۳/۱۲	۲/۴۱۳	۸/۰۹۷	۱۵۹/۷۵
۰	۶/۲۵	۱/۷۳۲	۲/۷۵۷	۲۲۶/۵۱
	۱۲/۵	۱/۵۳۱	۱/۱۸۳	۳۰۰/۴۰
	۲۵	۱/۴۱۵	۰/۹۱۸	۲۸۲/۵۸
میانگین		۲/۰۲۲	۵/۸۸۸	۲۱۶/۵۶
	۰	۱/۱۲۲	۹/۹۰۷	۱۳۷/۷۶
	۳/۱۲	۰/۹۹۱	۶/۲۲۱	۲۴۹/۷۲
۹۸	۶/۲۵	۰/۹۱۰	۱/۶۵۰	۲۶۰/۲۱
	۱۲/۵	۰/۹۳۵	۰/۸۹۰	۳۶۶/۱۲
	۲۵	۰/۹۸۲	۰/۷۳۹	۳۶۹/۱۳
میانگین		۰/۹۸۸	۳/۸۸۱	۲۷۶/۵۹
	۰	۱/۰۵۵	۱۰/۵۱۳	۱۴۹/۱۲
	۳/۱۲	۰/۸۱۲	۳/۱۶۷	۲۸۶/۰۷
۱۹۵	۶/۲۵	۰/۹۵۰	۱/۰۶۷	۲۶۷/۴۱
	۱۲/۵	۰/۸۰۷	۰/۷۶۷	۳۵۷/۷۳

۳۷۴/۳۰	۰/۶۰۷	۰/۸۳۶	۲۵	
۲۸۶/۹۳	۳/۲۲۴	۰/۸۹۲		میانگین
۱۴۱/۴۳	۹/۴۰۶	۰/۹۹۲	۰	
۲۴۳/۹۲	۲/۴۲۰	۱/۰۵۹	۳/۱۲	
۲۹۸/۵۹	۱/۲۱۶	۰/۸۳۱	۶/۲۵	۳۹۵
۲۷۹/۲۲	۰/۶۳۳	۰/۹۳۴	۱۲/۵	
۳۷۰/۱۱	۰/۶۱۶	۰/۸۷۸	۲۵	
۲۶۶/۶۵	۲/۸۵۸	۰/۹۳۹		میانگین

نتایج و بحث

سطح بالایی معنی دار گردیدند (جداول ۴ و ۵). از این رو ترکیب بعضی از سطوح مواد شیمیایی مورد مطالعه در این بخش از تحقیق جهت گزینش موتانهها در ادامه مطالعات مورد استفاده قرار گرفت. اثرات متقابل مشاهده شده در شکل ۱ ارائه شده‌اند. همچنین نمونه‌هایی از اثرات انفرادی مواد مورد استفاده در شکل ۲ ارائه شده است.

نتایج حاصل از بررسی اثرات متقابل مواد مذکور نشان داد که بین بعضی از سطوح مورد بررسی مواد اثرات متقابل معنی‌داری بر رشد آرابیدوپسیس وجود داشت که می‌تواند مبنای مطالعات تکمیلی قرار گیرد. به عبارت دیگر اثرات ساده فاکتورهای مورد بررسی، و نیز اثرات متقابل آنها در

جدول ۷ - میانگین صفات طول هیپوکتیل، طول ریشه و ضخامت مریستم انتهایی ریشه در تیمارهای مختلف حاصل از ترکیب سطوح مختلف یونیکانازل و ایزوکسابن.

سطح یونیکانازل (نانومولار)	سطوح ایزوکسابن (نانومولار)	طول هیپوکتیل (میلی متر)	طول ریشه (میلی متر)	ضخامت مریستم انتهایی (میکرون)
۰	۰	۱/۳۸۶	۸/۰۸۶	۱۳۶/۸۱
۰/۷۶	۰/۷۶	۱/۸۳۳	۷/۲۶۶	۱۴۰/۹۴
۱/۵	۱/۵	۱/۳۵۰	۶/۲۳۲	۱۵۳/۳۱
۳	۳	۱/۱۲۸	۳/۳۵۶	۱۶۴/۵۰
۶	۶	۱/۰۸۲	۰/۷۸۳	۲۷۵/۰۲
		۱/۲۵۷	۵/۱۴۵	۱۷۴/۱۲
				میانگین
۰	۰	۰/۸۹۸	۴/۸۶۹	۱۳۶/۳۹
۰/۷۶	۰/۷۶	۰/۸۷۷	۴/۰۵۵	۱۵۷/۹۹
۱/۵	۱/۵	۰/۸۰۴	۲/۷۰۱	۱۷۶/۸۰
۳	۳	۰/۸۵۸	۱/۶۲۴	۲۳۲/۰۳
۶	۶	۰/۸۷۹	۰/۶۶۵	۲۸۱/۹۴
		۰/۸۶۳	۲/۷۸۳	۱۹۷/۰۴
				میانگین
۰	۰	۰/۸۱۶	۵/۳۱۷	۱۴۰/۶۶
۰/۷۶	۰/۷۶	۰/۸۵۲	۴/۱۶۱	۱۵۴/۷۸
۱/۵	۱/۵	۰/۸۷۲	۳/۱۹۰	۱۶۵/۲۶
۳	۳	۰/۸۷۵	۱/۵۰۲	۲۵۳/۹۱
۶	۶	۰/۸۸۰	۰/۷۵۳	۳۱۸/۰۹

۲۰۶/۵۴	۲/۹۸۵	۰/۸۵۹	میانگین
۱۶۱/۷۷	۵/۱۶۴	۰/۸۳۳	۰
۱۵۹/۳۲	۳/۳۷۵	۰/۷۹۲	۰/۷۶
۱۹۸/۳۳	۲/۶۷۹	۰/۷۹۴	۱/۵
۲۸۷/۱۲	۱/۱۴۰	۰/۷۹۶	۳
۳۰۳/۳۴	۰/۶۷۳	۰/۸۵۵	۶
۲۲۱/۹۸	۲/۶۰۶	۰/۸۱۴	میانگین

ایزوکساین به سمت بالاست (شکل ۱B و ۱D). ترکیبهای مورد استفاده در ضخامت مریستم انتهایی ریشه اثر عکس داشتند. به عبارت دیگر با افزایش غلظت مواد مورد استفاده اگرچه طول هیپوکتیل و ریشه کاهش پیدا کرد ولی ضخامت مریستم انتهایی با افزایش غلظت مواد افزایش یافت. در این خصوص نیز افزایش ضخامت مریستم انتهایی در اثر افزایش پروناماید با ثابت بودن سطح یونیکانازل سریع تر از این افزایش در ایزوکساین بود. به نحوی که برعکس حالت قبل قوس عمومی منحنی حاصل از داده‌های اثر ترکیبهای مختلف پروناماید رو به بالاست در حالی که این قوس در ایزوکساین رو به پایین است. تغییر شیب این منحنیها در سطوح مختلف یونیکانازل حاکی از همان اثر متقابلی است که در جدول تجزیه واریانس معنی‌دار شدن آن مشخص بود. در خصوص اثر ترکیبهای یونیکانازل و ایزوکساین روی رشد طولی هیپوکتیل و ریشه و ضخامت مریستم انتهایی ترکیب سطوح ۳ نانومولار ایزوکساین و ۱۹۵ نانومولار یونیکانازل جهت پیدا کردن موتانهای مؤثر بر مسیر تولید جیبرلین استفاده گردید. ولی در بین ترکیبهای یونیکانازل و پروناماید ترکیب سطوح ۱۹۵ نانومولار یونیکانازل و ۶/۲۵ میکرومولار پروناماید جهت یافتن موتانهای مورد نظر استفاده گردید.

همان طور که در قسمت مواد و روشها اشاره گردید مخازن زنی مورد نظر در این ترکیب انتخابی مواد کشت شدند و تعدادی از بذور سبز شده و به رشد خود ادامه دادند که در

چنان که در شکل ۲C مشاهده می‌شود، پروناماید که بنا بر مطالعات سایرین (۱۰) مانع تشکیل میکروفیبرها در درون سلول می‌شود، به جای رشد طولی ریشه به تورم مریستم انتهایی منجر شد. در جداول ۶ و ۷ نشان داده شده است که مواد شیمیایی مورد استفاده بیشترین تأثیر را بر رشد ریشه گذاشتند تا رشد هیپوکتیل. به طوری که در سطح صفر یونیکانازل طول ریشه گیاه بین ۱۶/۴۸۸ تا ۰/۹۱۸ میلی-متر به ترتیب در سطوح صفر تا ۲۵ میکرولیتر پروناماید تغییر کرد. همین امر در ایزوکساین نیز اتفاق افتاد به نحوی که در سطح صفر یونیکانازل طول ریشه در سطوح مختلف ایزوکساین بین ۰/۷۸۳ تا ۸/۰۸۶ میلی‌متر متغیر بود. در سطح بالای یونیکانازل (۳۹۵ نانومولار) سطوح ایزوکساین و پروناماید تأثیر بیشتری بر رشد ریشه داشتند تا رشد هیپوکتیل به طوری که در این سطح یونیکانازل، طول هیپوکتیل در سطوح مختلف پروناماید بین ۰/۹۹۲ تا ۰/۸۷۸ میلی‌متر متغیر بود ولی طول ریشه بین ۹/۴۰۶ تا ۰/۶۱۶ میلی‌متر تغییر کرد (جدول ۶). به عبارت دیگر دامنه تغییرات طول هیپوکتیل در اثر سطوح پروناماید ناچیز بود ولی دامنه این تغییر در طول ریشه بیشتر بود. مقایسه اثرات متقابل این مواد در نمودارهای ارائه شده در شکل ۱ واضح تر است. چنان که ملاحظه می‌شود سرعت تأثیر پروناماید بر کاهش رشد هیپوکتیل و ریشه بسیار بیشتر است تا ایزوکساین، به صورتی که قوس عمومی منحنی کاهش رشد طولی هیپوکتیل و ریشه در ترکیبهای یونیکانازل و پروناماید به سمت پایین است (شکل ۱A و ۱C) ولی قوس همین منحنی در ترکیبهای یونیکانازل و

بدیهی است پاسخ به این سؤالات و تعیین مکانیسم این نوع مقاومتهاست که به سوال اصلی این تحقیق که سالهاست دغدغه محققین علوم گیاهی است پاسخ می‌دهد و مسیر بیوسنتز جیبرلین در گیاه را تعیین می‌کند. بررسی نحوه توارث این صفات هم باید در دستور کار قرار گیرد. از این رو می‌توان با تلاقی موتانه‌های حاصل با اکوتیپ وحشی کلمبیا و تولید نسل‌های F1، F2 و تلاقیهای برگشتی و بررسی نسبت افراد مقاوم به ترکیب مواد شیمیایی مورد نظر در هر یک از نسل‌های مذکور این مهم صورت گیرد (۱).

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از مسئولین محترم سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و نیز مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع که امکان اجرای این پروژه فراهم آوردند قدردانی می‌گردد. همچنین از پروفسور کاتلر استاد دانشگاه تورونتو در کانادا که ضمن راهنمایی و همکاری بیدریغ، سخاوتمندانه امکانات مورد نیاز این تحقیق را فراهم نمودند بی نهایت سپاسگزاری و تشکر می‌گردد.

ادامه کار با مراقبت از این گیاهچه‌ها ۲۷ گیاه تولید نمودند که از آنها بذرگیری شد. البته لازم به ذکر است که با توجه به تکثیر مکرر این مخازن ژنی در نسل‌های قبلی، برخی از این گیاهان و موتانه‌ها یقیناً کپی یکدیگر می‌باشند که در مراحل بعدی شناسایی خواهند شد. آنچه مسلم است این گیاهان حامل ژن یا ژن‌هایی هستند که در مقابل عامل بازدارندگی این مواد شیمیایی در تولید جیبرلین مقاومت می‌کنند و می‌توانند به عنوان موتان مؤثر بر مسیر تولید جیبرلین مورد استفاده و بررسی قرار گیرند. این امکان وجود دارد که موتانه‌های یافت شده نیاز کمتری به جیبرلین دارند. به گونه‌ای که این موتانه‌ها در حضور ترکیبی از دو بازدارنده رشد که از تولید اسید جیبرلیک جلوگیری کرده و مانع رشد گیاه می‌شوند (۱۰، ۱۲ و ۱۴) قادر به رشد هستند. مکانیسم مقاومت این موتانه‌ها در برابر بازدارنده‌های رشد و تعیین اینکه چه عواملی مسئول این نوع مقاومت در موتانه‌ها هستند موضوعی است که باید در ادامه تحقیقات مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد. به عبارت دیگر مطالعات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تکمیلی دیگری نیز لازم است تا مکانیسم این نوع مقاومت در این موتانه‌ها را تعیین کند.

منابع

۱. میرزایی ندوشن، ح.، ۱۳۸۳. بررسی نحوه توارث عوامل مقاومت در برابر یونیکانازول در جهش یافته‌های حاصل از ورود T- and reproductive maturity in maize. *Plant Physiol.*, 108: 475-487.
2. Berardini, T.Z., Bollman, K., Sun, H., and Poethig, R.S., 2001. Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40. *Science*, 291: 2405-2407.
3. Chien, J.C., and Sussex, I.M., 1996. Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.*, 111: 1321-1328.
4. Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S., and Somerville, C.R., 2000. Random GFP: cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *PNAS*, 97: 3718-3723.
5. Evans, M.M., and Poethig, R.S., 1995. Gibberellins promote vegetative phase change
6. Fleet, C.M., and Sun, T.P., 2005. A Delicate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8: 77-85.
7. Gan, Y., Kumimoto, R., Liu, C., Ratcliffe, O., Yu H., and Broun, P., 2006. Glabrous inflorescence stems modulates the regulation by gibberellins of epidermal differentiation and shoot maturation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18: 1383-1395.
8. Groot, E.P., and Meicenheimer, R.D., 2000. Comparison of leaf plastochron index and allometric analyses of tooth development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.*, 19: 77-89.

9. Hunter, C., Sun, H., and Poethig, R.S., 2003. The *Arabidopsis* heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member. *Curr. Biol.*, 13: 1734–1739.
10. Mersie, W., and Elliott, J., 1993. Selectivity of Pronamide and trifluralin in Belgian endive (*Cichorium intybus*). *Weed Technology*, 7:226-229.
11. Meyerowitz, E.M., and Somerville, C.R., 1994. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
12. Nambara, E., Akazawa, T., and McCourt, P., 1991. Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor Uniconazol on mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 97: 736-738.
13. Prigge, M.J., and Wagner, D.R., 2001. The *Arabidopsis* serrate gene encodes a zinc-finger protein required for normal shoot development. *Plant Cell*, 13: 1263–1279.
14. Scheible, W.R.,shed, R., Richmond, T., Delmer, D., and Somerville, C., 2001. Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* *lxr1* mutants. *PNAS*, 98:10079-10084.
15. Silverstone, A.L., Tseng, T.S., Swain, S.M., Dill, A., Jeong, S.Y., Olszewski N.E. and Sun, T., 2007. Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143: 987-1000.
16. Swain S.M., and Singh D.P., 2005. Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. *Trends Plant Sci.*, 10: 123–129.
17. Telfer, A., Bollman, K.M., and Poethig, R.S., 1997. Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124: 645–654.

Utilizing several growth inhibitors for finding gibberellin synthesizing affecting mutants in *Arabidopsis thaliana*

Mirzaie-Nodoushan H.

Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Scientists have made much effort to identify mutants which can help them to recognize gibberellin synthesizing pathway in plants. Therefore, effects of different concentrations of three chemical agents named Uniconazol, Pronamide and Isoxaben on *Arabidopsis thaliana* growth was investigated, using existing variable *Arabidopsis* gene pools, to find mutants by which inhibitory effects of the mentioned chemicals can be prevented. Critical concentration of the chemicals on seed germination and vegetative growth of *Arabidopsis* was first determined. Interaction effects of the levels close to critical concentration of the chemicals by which the mutants may be identified were recognized. Combination effects of Uniconazol, Isoxaben and Uniconazol, Pronamide on seed germination and vegetative growth of *Arabidopsis* were investigated by two separate experiments. The combinations with the higher interaction effects were specified to be used by screening of several genetically variable gene pools of *Arabidopsis thaliana*. Significant interaction effects on vegetative growth of the *Arabidopsis* species were observed between several levels of the chemicals. At the highest applied level of Uniconazol (395 nM) the applied levels of Isoxaben and Pronamide showed more effects on roots than on hypocotyls growth. Pronamide effects on the reduction of hypocotyl and root growth were much more than those of Isoxaben. The chemical combinations effects showed reverse effects on root tip meristems. Although by increasing the chemicals concentration, hypocotyl and root length were decreased, increasing the concentrations, root tip meristem thicknesses were also increased. The variable *Arabidopsis* gene pools were sown on media containing the combinations of the chemicals concentration. A number of seeds were germinated and grown on the media. These were grown to maturity and seed production. Seeds were collected on the grown plants to be employed as mutants resistant to inhibitory effects of the chemicals in the future.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Mutants, Resistant, Gibberellin, Uniconazol, Pronamide and Isoxaben.