

بررسی تأثیر تغییر عملکرد ژن‌های مختلف بر واکنش گیاهان به اتیلن (C_2H_4)شرایط *Arabidopsis thaliana* *in vitro*

سیده حمیده طاهری، رضا شیرزادیان خرم آباد^{*}، علی اعلمی و حبیب الله سمیع زاده

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، صندوق پستی ۱۳۱۴-۴۱۶۴۵

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۴/۱۷)

چکیده:

اتیلن، اگر چه یک ملکول ساده است، از جمله فاکتورهای مهم و موثر بر رشد و نمو گیاهان محسوب می‌شود. واکنش سه‌گانه در گیاهچه‌های اتیوله *Arabidopsis* به اتیلن (C_2H_4) به طور گستردۀ ای جهت بررسی فعالیت بیوسنتر، درک و سیگنانیگ اتیلن و همچنین جداسازی موتانت‌های مرتبط با این رخدادها در اتیلن استفاده می‌شود. در این تحقیق گیاهان مختلف موتانت که هر یک حاوی موتاسیونی اختصاصی در یکی از ژن‌های مرتبط با سنتز هورمون‌هایی مانند اتیلن (*ein1* و *ein2*)، جاسمونیک اسید (*jar1*) و سالسیلیک اسید (*NahG* و *pad4*) در *Arabidopsis* بودند جهت بررسی تأثیر تغییر عملکرد ژن‌های *EIN2*, *EDR1*, *JAR1*, *PAD4* و *NahG* بر واکنش گیاهان به اتیلن مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام بررسی فوق از روش ارزیابی واکنش سه‌گانه (Ethylene Triple Response) برای ارزیابی گیاهان موتانت بودند. بر اساس نتایج بدست آمده، هیچ کدام از موتانت‌های مورد بررسی در دو گروه (*Col-0*) مقایسه شد. بر اساس نتایج بدست آمده، هیچ کدام از موتانت‌های مورد بررسی در صفات سه‌گانه چرخش قلب رأسی، طول هیپوکوتیل و طول ریشه‌چه گیاهچه‌های موتانت مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و با شاهد والدینی (*eto* (Ethylene overexpression) مقایسه شد. بر اساس نتایج بدست آمده، هیچ کدام از موتانت‌های مادری در صفات ۳ گانه واکنش به اتیلن (*hook less* (hook) قرار نمی‌گیرند. در حالی که کلیه موتانت‌ها دارای تفاوتی معنی‌دار با ژنوتیپ مادری در صفات ۳ گانه واکنش به اتیلن بودند و فقط ژنوتیپ *pad4* از نظر طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه با ژنوتیپ مادری خود تفاوتی نداشت. لذا موقع موتاسیون در ژن‌های موثر بر سنتز دیگر هورمون‌ها به نحو قابل توجهی می‌تواند بر واکنش گیاهان به اتیلن تغییر ایجاد نماید. همچنین بررسی واکنش سه‌گانه در گیاهچه‌های اتیوله موتانت می‌تواند به عنوان یک شاخص مهم و قابل توجهی برای ارزیابی واکنش گیاهان بالغ به اتیلن نیز محسوب گردد.

کلید واژه: اتیلن، ACC، گیاهچه اتیوله، واکنش سه‌گانه، موتانت‌ها.

مقدمه:

رسیدگی میوه، تأثیر دارد (Olmedo *et al.*, 2006). میزان تولید اتیلن در گیاهان تحت تأثیر عواملی چون دوره رشد و نمو گیاهان قرار گرفته و در پاسخ به محرک‌های محیطی زنده و غیر زنده تغییر می‌کند. از جمله این محرک‌ها می‌توان به ایجاد

هورمون اتیلن (C_2H_4), اگرچه ملکولی بسیار ساده است، بر دامنه وسیعی از واکنش‌های فیزیولوژیکی در گیاهان از جمله جوانه‌زنی بذر، توسعه‌ی ریشه موئین، پیری گل، ریزش برگ و

که شامل: کوتاه شدن هیپوکوتیل، کوتاه و ضخیم شدن ریشه‌ها و چرخش در قلاب رأسی هیپوکوتیل می‌باشد. تغییرات مرفوولوژیکی که در طول رشد گیاهچه‌های اتیوله روی می‌دهد به آسانی و با چشم قابل رویت هستند. گیاهچه‌های موتانت *Arabidopsis* که دارای تغییر در مسیر بیوسنتر، درک و یا سیگنانینگ اتیلن هستند ممکن است تغییراتی را در واکنش سه‌گانه نشان دهند (Li and Guo, 2007). نحوه واکنش گیاهچه‌های اتیوله آراییدوبسیس به ACC روشی مناسب برای جداسازی موتانت‌های مرتبط با واکنش اتیلن بوده و جهت شناسایی ژن‌های مؤثر بر این فرآیند از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد و همچنین در زمینه بررسی مولکولی انتقال پیام اتیلن در گیاهان مهم به نظر می‌رسد (Kieber, 1997). موتانت‌هایی که دارای علائم کوتاه شدن طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه و دارای چرخش در قلاب رأسی در صورت عدم حضور تیمار اتیلن (Ethylene overexpression) هستند، موتانت‌های گروه *eto* (Ethylene overexpression *eto*) نامیده می‌شوند. موتانت‌هایی که دارای علائم کوتاهی هیپوکوتیل و ریشه‌چه و فاقد چرخش در قلاب رأسی در عدم حضور تیمار اتیلن هستند متعلق به گروه موتانت‌های *hls* (hook less) بوده و دسته سوم علائم طویل شدن هیپوکوتیل و ریشه‌چه و عدم چرخش قلاب رأسی در حضور تیمار اتیلن را نشان می‌دهند و از گروه موتانت‌های Ethylene (*ein*) (insensitive *ein*) می‌باشند (Gusman and Ecker, 1990). موتانت‌های *eto* قادر به تولید سطوح بالایی از اتیلن نسبت به ژنوتیپ وحشی می‌باشند که این موتانت‌ها در مراحل قبل از مرحله تبدیل ACC به اتیلن در مسیر بیوسنتر اتیلن چهار تغییر شده‌اند. ممکن است تغییر در این موتانت‌ها در مرحله تبدیل ACC به ACC و ناشی از تغییر در بیان ACC سنترازها باشد. در موتانت‌های *ein* نیز مقدار تولید اتیلن افزایش می‌یابد، ولی بر خلاف موتانت‌های *eto*، این موتانت‌ها در مسیر سیگنانینگ اتیلن دارای تغییراتی هستند. در موتانت‌های *ein*، فعالیت *ein* پروتئین2 به عنوان مهمترین جزء در مسیر سیگنانینگ اتیلن چهار تغییر شده و در نتیجه پیام اتیلن منتقل نشده و گیاه حساسیتی به حضور اتیلن نخواهد داشت (Wang et al., 2002). بررسی مکانیسم دریافت اتیلن توسط گیاه و انتقال پیام آن با

زخم، کمبود اکسیژن در بافت، میزان ازو، تنفس سرما یا یخ زدگی اشاره کرد (Stepanova and Ecker, 2000). در مسیر بیوسنتر اتیلن در گیاهان ابتدا آمینو اسید متیونین توسط آنزیم SAM (S-AdoMetionin) SAM به ATP با مصرف به SAM استاز و با تبدیل می‌شود. SAM یک سوبسترانس مهمن در بسیاری از چرخه‌های بیوشیمیایی از جمله چرخه بیوسنتر اتیلن است. مهم‌ترین قسمت این چرخه تبدیل SAM به ACC (1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid) توسط آنزیم ACC اکسیداز است. در مرحله بعد ACC توسط آنزیم ACC اکسیداز اکسید می‌شود و به اتیلن تبدیل می‌گردد. مرحله محدود کننده در بیوسنتر اتیلن تبدیل SAM به ACC توسط آنزیم ACC سنتراز می‌باشد (Wang et al., 2002; Dalcin et al., 2006). پس از سنتراز اتیلن، حضور آن توسط خانواده‌ای از گیرنده‌ها همچون ERS1, ETR2, ETR1 (ETR for Ethylene Resistant) ERS2 و EIN4 در سطح دیواره سلولی و شبکه آندوپلاسمی دریافت و سپس در مسیر سیگنانینگ ویژه سیتوپلاسم و هسته ارسال می‌شود (Omalley et al., 2005; Ma et al, 2006). اولین عضو در مسیر سیگنانینگ اتیلن، پروتئین CTR1 است. این پروتئین به طور مستقیم با ETR1 و ERS1 ارتباط داشته و آبشار سیگنانینگ Map kinase کننده EIN2 در پایین دست خود می‌باشد. این پروتئین تنظیم کننده متفاوت واکنش پایین دست محسوب می‌شود و نقش مهمی در سیگنانینگ اتیلن دارد. EIN3 در مسیر سیگنانینگ اتیلن پس از EIN2 قرار می‌گیرد و از فاکتورهای مهم رونویسی در هسته می‌باشد. فعالیت این فاکتور موجب فعل شدن فاکتورهای خانواده‌ی EILs همچون ERF1 شده و بیان ژن EIN3 را تنظیم می‌کند. در این صورت عملیات مرتبط با بیان ژنهای مربوط با واکنش گیاه به حضور اتیلن را القا نموده و لذا گیاه واکنش لازم به حضور اتیلن را نشان خواهد داد (Wang et al., 2002).

تغییرات مرفوولوژیکی در گیاهچه‌های اتیوله که توسط پیش‌ساز متابولیکی اتیلن (ACC) تیمار شده‌اند اصطلاحاً واکنش سه گانه (Triple Response) نامیده می‌شود (Wang et al., 2002). این واکنش اولین بار توسط Neljubow (1901) شرح داده شد

سالیسیلیک اسید در این موتانت ها می باشد (Tang *et al.*, 2005). مسیر سیگنالینگ سالیسیلیک اسید، جیبرلیک اسید و اتیلن در سیستم دفاعی گیاهان اثر متقابل و تداخلی بر هم دارند. برای اثر متقابل و تداخلی این هورمون ها نسبت به هم از اصطلاح cross-talk استفاده می شود. قطعاً تغییر در سطح هر کدام از این هورمون ها بر میزان فعالیت و سنتز سایر هورمون ها تأثیر می گذارد (Kunkle and Brook, 2002).

این تحقیق به منظور بررسی فعالیت مسیر بیوسنتزی اتیلن در این گروه از موتانت ها و چگونگی تأثیر تغییر ژن های مورد نظر در هر یک از موتانت ها بر واکنش موتانت ها به اتیلن صورت گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، هیچ کدام از موتانت های مورد بررسی در دو گروه موتانت های *eto* و *hls* قرار نمی گیرند.

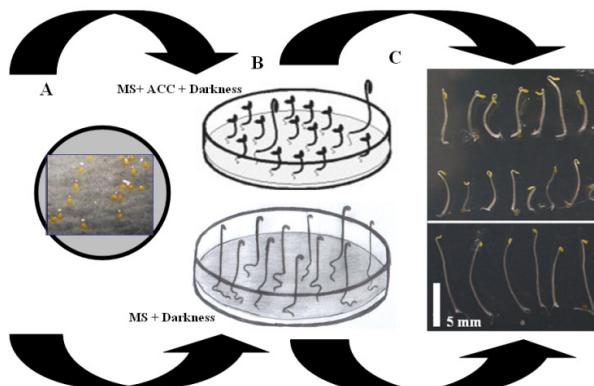
مواد و روش ها:

این تحقیق به منظور بررسی واکنش موتانت های مختلف متعلق به گروه گیاهان مادری Col-0 در *Arabidopsis* شامل *ein2*, *jar1* و *edr1* به اتیلن در شرایط *in vitro* انجام شد. تهیه بذور وحشی و موتانت ها از دپارتمان بیولوژی گیاهی دانشگاه گروینینگ هلن و از دانشگاه مسی نیوزلند تهیه شد. جهت استریل نمودن بذور از محلول هیپوکلرید سدیم ۱۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد و سپس در سه مرحله (هر مرحله به مدت ۳ دقیقه) بذور با آب مقطر استریل آبکشی شدند. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴°C و تاریکی مطلق نگهداری شدند و پس از یک ساعت قرار گرفتن در معرض نور، هر کدام از ژنتوتیپ ها در پتری های حاوی محیط MS-۱/۲ در ۵ غلاظت (۰، ۱، ۵، ۲۰ و ۴۰ میکرومول) از ACC-۱ آمینوسیکلو پروپان-۱-کربوکسیلیک اسید) و سه تکرار کشت شدند (Shirzadian-Khorramabad *et al.*, 2010).

مدت ۵ روز در انکوباتور و در شرایط تاریکی مطلق و دمای ۲۳ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در روز پنجم بررسی صفت طول هیپوکوتیل و ریشه چه و چرخش هیپوکوتیل مطابق با شکل ۱ در گیاهچه های *Arabidopsis* تحت عنوان روش سه

استفاده از موتانت هایی که دارای نقص در واکنش به اتیلن هستند صورت می گیرد (Stepanova and Ecker, 2000). مطالعه حاضر به منظور بررسی فعالیت مسیر بیوسنتزی، درک و یا سیگنالینگ اتیلن در تعدادی از موتانت های *Arabidopsis* که در ژنوم مادری Col-0 به وجود آمده اند شامل موتانت های *jar1* (Wang *et al.*, 2002) (*Ethylene insesitive 2 ein2*) (دارای ژن *NahG* (Jasmonic Acid response locus) باکتریایی از سویه Lawton *et al.*,) (*Naphtalen-degrading Phyto Alexin-Deficient 4 pad4*) (1995 Staswick and) (*Enhanced disease resistance edr1*) (Tiryaki, 2004 (Enhanced disease resistance edr1) (Tiryaki, 2004) (Tang *et al.*, 2005) انجام شد. *EIN2* یکی از مهمترین اجزا در مسیر سیگنالینگ اتیلن و یک تنظیم کننده مثبت در مسیر انتقال پیام اتیلن است. جهش در لوکوس *EIN2* موجب عدم حساسیت موتانت ایجاد شده در مقابل اتیلن داخلی و تیمار اتیلن می گردد (Alonso *et al.*, 1999). پروتئین *JAR1* یک JA-amino synthase است که برای فعال سازی جاسمونیک اسید به منظور فعالسازی این هورمون و سیگنالینگ مطلوب آن در *Arabidopsis* لازم است. در موتانت *jar1* به دلیل نقص آنزیمی مقدار JA (جیبرلیک اسید) فعال کاهش می یابد. در نتیجه مکانیسم دفاع نیز کاهش یافته و ضعیف می شود در *Staswick and Tiryaki., 2004*). ژن *NahG* برای اولین بار در باکتری *Pseudomonas studzeri* سویه *naphthalen-degrading* شناسایی شد. در اثر بیان این ژن آنزیم سالیسیلات هیدروکسیلاز تولید می شود. سالیسیلات هیدروکسیلاز مانع تجمع SA (سالیسیلیک اسید) در هنگام حمله پاتوژن می شود. لذا بیان *NahG* در گیاهان ترانسژیک موجب کاهش قدرت دفاعی این گیاهان شد (Lawton *et al.*, 1995). ژن *PAD4* برای سنتز کامالکسین در واکنش به آلدگی های باکتریایی و ویروسی در گیاه لازم است. موتانت های *pad4* در واکنش دفاعی نقص نشان می دهند که ناشی از نقص در سنتز کامالکسین می باشد (Zhou *et al.*, 1998).

متواسیون *edr1* در ژن *EDR1* منجر به افزایش مقاومت در گیاه علیه بیماری سفیدک پودری می شود این افزایش مقاومت ناشی از افزایش تولید



شکل ۱- وضعیت شماتیک گیاهچه‌های رشد یافته در محیط غذایی MS بعد از مدت ۵ روز نگهداری در تاریکی مطلق: کشت بذور در محیط غذایی MS و ACC (A)، بروز واکنش سه گانه در گیاهچه‌هایی که دارای سیستم نرمال در زمینه بیوسنتر، دریافت و انتقال پیام اتیلن در گیاه است (B) و تصویری از نحوه ارزیابی گیاهچه‌ها (C) دیده می‌شود.

بدان معنی است که موتاسیون در ژن‌های *NAHg*, *JAR1*, *EIN2*, *PAD4*, *EDR1* و *hls* منجر به ایجاد واکنش کاذبی شبیه آنچه در موتانت‌های *eto* و *eto* مشاهده می‌شود، نمی‌گردد. موتانت‌های *eto* و *eto* در صورت عدم حضور تیمار اتیلن علائمی از واکنش سه گانه را نشان می‌دهند. زیرا موتانت‌های *eto* در مراحل قبل از تبدیل ACC به اتیلن در مسیر بیوسنتر اتیلن چهار تغییر شده و به دلیل تأثیر جهش بر روی ژن ACC ستاز، مقادیر بالایی از اتیلن را تولید می‌کنند و همچنین موتانت *hls* به دلیل تأثیر موتاسیون بر ژن (*HLS*) (Guzman and Ecker, 1990) چهار تغییر فعالیت اتیلن شده است.

بررسی تغییرات واکنش سه‌گانه در گیاهچه‌های موتانت در حضور ACC به منظور بررسی مقدماتی واکنش موتانت های مورد بررسی به اتیلن، وضعیت فتوتیپی واکنش سه‌گانه گیاهچه‌های موتانت در حضور ACC مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). ژنوتیپ مادری-0 Col در حضور تیمار اتیلن هر سه فتوتیپ مربوط به واکنش سه‌گانه شامل کوتاهی ریشه‌چه، کوتاهی هیپوکوتیل و چرخش رأسی هیپوکوتیل را نشان داد. موتانت *ein2* دارای فتوتیپ متفاوتی در مقایسه با ژنوتیپ مادری در حضور پیش‌ساز اتیلن می‌باشد. این موتانت همانند موتانت‌های گروه *ein* در حضور ACC و تاریکی، فتوتیپ‌های کوتاهی هیپوکوتیل و ریشه‌چه و چرخش در هیپوکوتیل رأسی را نشان نمی‌دهد. در این موتانت، حضور اتیلن اثر مهارکنندگی

گانه (Neljubow, 1901) Triple Response اندازه‌گیری شد. ارزیابی واکنش گیاهچه‌ها به ACC می‌تواند الگویی از کارکرد فرآیند سترز، دریافت و انتقال اتیلن در سلول در مرحله اولیه و در مراحل بعدی رشد در *Arabidopsis* را در اختیار قرار دهد. آنالیز داده‌ها بر مبنای آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. جهت آنالیز داده‌های بدست آمده از نرم افزار SAS نسخه ۹ و Excel نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

جهت تیمار گیاهان بالغ با اتیلن، ابتدا گیاهان والدینی و گیاهان موتانت *ein2* در دمای 21°C و 21°C و 60% رطوبت نسبی محیط و تحت شرایط نور فلورسنت $60\mu\text{mol}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ ساعت روشناختی و ۸ ساعت تاریکی) برای مدت ۳۱ روز در اطاقک رشد نگهداری شدند. سپس برای مدت ۷۲ ساعت با گاز اتیلن ($10\text{ }\mu\text{l l}^{-1}$) و نور فلورسنت مداوم تیمار شدند.

نتایج و بحث:

بررسی تغییرات واکنش سه‌گانه گیاهچه‌های موتانت در عدم حضور ACC: در صورت عدم استفاده از ACC در محیط MS ۱/۲ در شرایط تاریکی، کلیه گیاهچه‌های مادری و موتانت‌های مشابه ژنوتیپ مادری خود (Col-0) را نشان دادند (داده‌ها نشان داده نشده). در این بررسی هیچ‌کدام از موتانت‌های مورد بررسی در دو گروه موتانت‌های *eto* و *hls* قرار نگرفتند. این

جدول ۱- بررسی وجود یا عدم وجود فتوتیپ سه گانه (Triple Response) در موتانت های گروه مادری Col-0 در حضور ACC و پس از ۵ روز تاریکی مطلق، تعداد تکرار برای هر مشاهده ۴ می باشد. ✓ (وجود) و ✗ (عدم وجود).

ژنوتیپ	کوتاه و ضخیم شدن طول هیپوکوتیل	کوتاه شدن ریشه چه	چرخش در قلاب رأسی	دارای چرخش
Col-0	✓	✓	✓	✓
<i>ein2</i>	✗	✗	✗	✗
<i>jar1</i>	✓	✓	✓	✓
<i>NahG</i>	✓	✓	✓	✓
<i>pad4</i>	✓	✓	✓	✓
<i>edr1</i>	✓	✓	✓	✓

در غلظت های ۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول از ACC اندازه گیری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده های حاصل از تأثیر مقادیر مختلف ACC بر دو صفت طول هیپوکوتیل و ریشه چه ژنوتیپ Col-0 و موتانت های *ein2* *jar1* *NahG* *pad4* و *edr1* در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج تجزیه واریانس داده های بدست آمده نشان می دهد که دو فاکتور ژنوتیپ و سطوح مختلف ACC و اثر متقابل آنها دارای تأثیرات معنی داری در سطح ۱٪ بر صفات اندازه گیری شده در این موتانت ها شامل طول هیپوکوتیل و ریشه چه می باشد.

همان طور که در شکل های ۲ و ۳ مشاهده می شود روند تغییرات طول هیپوکوتیل و ریشه چه در موتانت های گروه Col-0 از روند مشابهی برخوردار نیست. این تغییرات در والد وحشی Col-0 با افزایش غلظت ACC به صورت پلکانی کاهش می یابد، در حالیکه در گیاهچه های *ein2* روندی کاملاً متفاوتی از والد وحشی یعنی روندی غیر کاهشی و نسبتاً ثابتی را دنبال می کند. اگر چه روند تغییرات فوق در دیگر موتانت ها کاهشی است ولی شبیه تغییرات فوق از وضعیت مشابهی با والد وحشی برخوردار نیست. بنابراین علی رغم اینکه در مطالعه مقدماتی مشاهده گردید که موتانت های *jar1*, *NahG* و *pad4* در گروه چهارم از نظر واکنش سه گانه به اتیلن قرار دارند، ولی تجزیه واریانس داده های حاصل از مطالعه دقیق تر تأثیر غلظت های مختلف ACC بر دو صفت طول هیپوکوتیل و ریشه چه نشان می دهد (شکل ۲ و ۳) که میزان اثرگذاری ACC

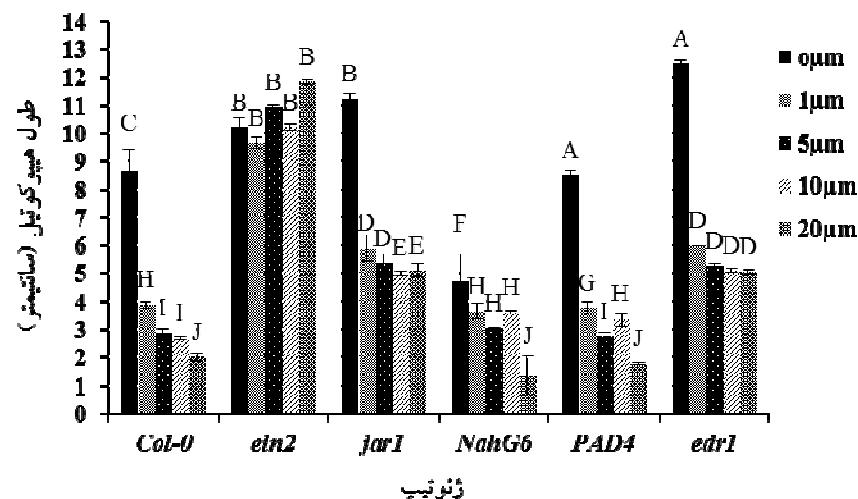
بر طویل شدن هیپوکوتیل و ریشه چه نداشته است و چرخش قلاب رأسی در این موتانت دیده نمی شود (جدول ۱). بنابراین می توان نتیجه گرفت که این موتانت متعلق به گروه موتانت *ein* می باشد. در این موتانت، EIN بعنوان مهمترین جز در مسیر سیگنالینگ اتیلن دچار تغییر شده است و در نتیجه پیام اتیلن منتقل نشده و گیاه حساسیتی به حضور اتیلن نشان نمی دهد (Alonso et al., 1999). مطابق با جدول ۱ موتانت های *jar1*, *NahG*, *pad4* و *edr1* در حضور تیمار اتیلن فاقد چرخش در قلاب رأسی می باشند. با توجه به اینکه این موتانت ها جز گروه *ein* نبوده و از طرف دیگر به دلیل عدم چرخش در قلاب رأسی، با ژنوتیپ مادری Col-0 نیز تفاوت دارند، می توان آنها را در گروه جدیدی قرار داده و از آنها به عنوان گروه چهارم در این تحقیق نام برد. در گروه اخیر در حضور تیمار اتیلن طول ریشه و هیپوکوتیل کاهش می یابد، اما چرخش هیپوکوتیل صورت نمی گیرد. این ویژگی کاملاً متفاوت با ویژگی سه گروه دیگر می باشد. شکل قلاب رأسی هیپوکوتیل در اثر طویل شدن نامتقارن سلول ها و در اثر فعالیت مواد آنتاگونیست فعالیت اتیلن در رأس هیپوکوتیل صورت می گیرد. احتمالاً عدم تشکیل قلاب رأسی در حضور تیمار اتیلن در موتانت های این گروه به دلیل عدم حضور مواد آنتاگونیستی فوق بوده و در نتیجه اتیلن تأثیر خود را به طور کامل گذاشته و قلاب رأسی تشکیل نمی گردد.

به منظور بررسی دقیق تر تفاوت واکنش موتانت ها به اتیلن در گروه ژنوتیپی فوق، طول هیپوکوتیل و ریشه چه گیاهچه ها

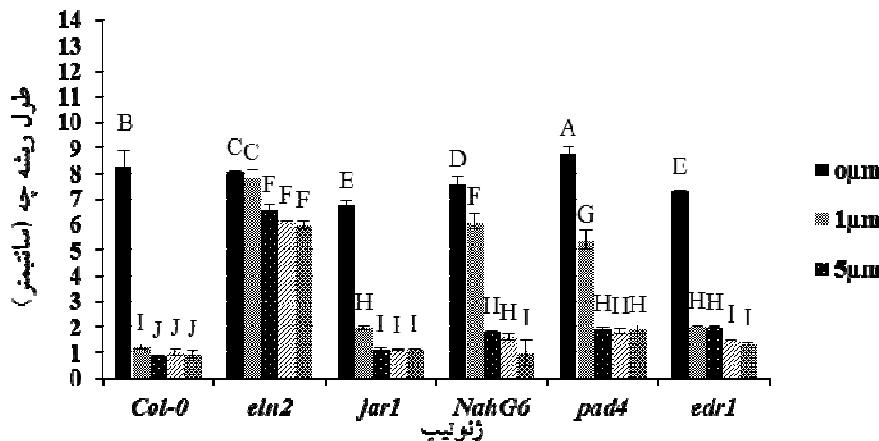
جدول ۲- تجزیه واریانس مربوط به اثر غلظت‌های مختلف ACC بر طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *NahG*, *jar1*, *ein2*, *edr1* و *pad4*

	F	MS	SS	درجه آزادی	منبع تغییرات
	طول هیپوکوتیل	طول ریشه‌چه	طول هیپوکوتیل	طول ریشه‌چه	طول هیپوکوتیل
١١٢/٣٢**	١٦٨/٩٤**	٣٢/٣٢٤	٢٤/٦٦٥	٩٣٧/٤٢٢	٧١٥/٢٩٦
٣٧٢/٦٩**	٢٩٤/٣٢**	١٠٧/٢٥٣	٤٢/٩٦٩	٥٣٦/٢٦٧	٢١٤/٨٤٨
**٢٤٧/٣٤	**٧١٢/٠٠	٧١/١٧٨	١٠٣/٩٤٩	٢٤٨/٧١٤	٤١٥/٧٩٧
٢٠/٢٣**	٢٨/٩٩**	٥/٨٢١	٤/٢٣٢	١١٦/٤٣٩	٨٤/٦٥٠
-	-	٠/٢٨٧	٠/١٤٥	١٧/٢٦٦	٨/٧٥٩
-	-	-	-	٩٥٤/٦٨٨	٧٢٤/٥٥٦
					کل

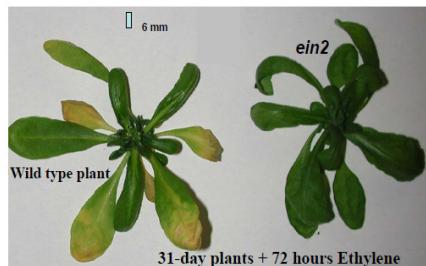
به مفهوم معنی دار بودن تفاوت داده‌ها در سطح ۱٪ **



شکل ۲- مقایسه میانگین‌های طول هیپوکوتیل در موتانت‌های مختلف گروه Col-0 در غلظت‌های ٠، ١، ٥، ١٠ و ٢٠ میکرومول از ACC. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ می‌باشند.



شکل ۳- مقایسه میانگین‌های طول ریشه‌چه در موتانت‌های مختلف گروه Col-0 در غلظت‌های ٠، ١، ٥، ١٠ و ٢٠ میکرومول از ACC. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ می‌باشند.

شکل ۴- فنوتیپ گیاهان ۳۱ روزه موتانت *ein2* پس از ۷۲ ساعت تیمار با گاز اتیلن با گیاه وحشی

موتانت پرداخته می شود.

بررسی طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت *pad4*
مطابق با جدول ۱ فنوتیپ یکسانی در گیاهچه‌های موتانت *pad4* در مقایسه با ژنوتیپ مادری Col-0 در زمینه واکنش سه‌گانه مشاهده نمی‌شود. این تفاوت عمدتاً در قسمت چرخش در قلاب رأسی هیپوکوتیل مشاهده می‌شود، اما طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت *pad4* دارای تفاوت معنی داری در غلظت‌های مختلف از ACC این موتانت می‌باشد (جدول ۳)، ولی دارای تفاوت معنی داری با ژنوتیپ مادری (جدول ۳)، ولی دارای تفاوت معنی داری با ژنوتیپ مادری (شکل ۵ و ۶). همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌نیست (شکل ۵ و ۶) بسیار نسبت تغییر طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های موتانت *Col-0* با نسبت فوق در گیاهچه‌های وحشی *pad4* (۰/۳۸) بسیار نزدیک می‌باشد. بنابراین موتانت *pad4* علاوه نسبتاً یکسان دوگانه با ژنوتیپ مادری بوده و احتمالاً می‌تواند از مسیر بیوسنتز، درک و یا سیگنانالینگ اتیلن نرمالی برخوردار باشد. ژن *PAD4* برای سنتز کامالکسین که یک نوع فایتوالکسین می‌باشد در واکنش به آلدوجی‌های باکتریایی و ویروسی در گیاه لازم است. محصول ژن *PAD4* یک پروتئین مشابه با تری اسیل گلیسرول لیپاز است که در سیگنانالینگ سالیسیلیک اسید به منظور افزایش قدرت دفاعی گیاه نقش مهمی دارد (Jirage et al., 1999). در موتانت *Phyto 4* *pad4* (Alexin-Deficient Mutant) به دلیل افزایش تولید آنزیم تخریب کننده سالیسیلیک اسید، بنام سالیسیلات هیدروکسیلار، مقدار تجمع سالیسیلیک اسید در سلول‌ها کاهش یافته و به دنبال آن میزان کامالکسین که در واکنش‌های دفاعی گیاهان نقش دارد، در سلول کاهش می‌باید (Jirage et al., 1999).

به صورت بروز واکنش سه‌گانه بسته به نوع موتاسیون متفاوت است، تا جائی که موتاسیون در ژنی همچون *EIN2* واکنش گیاهچه‌ها به غلظت‌های مختلف ACC را به حداقل میرساند. بررسی واکنش ۳ گانه در گیاهچه‌های موتانت ۵ روزه میتواند بعنوان شاخص قابل توجهی برای بررسی واکنش گیاهان بالغ به اتیلن محسوب گردد. زیرا همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، تیمار نمودن گیاهان بالغ ۳۱ روزه *ein2* با گاز اتیلن منجر به بروز واکنش مشابهی با گیاهچه‌های ۵ روزه در واکنش به اتیلن گردید. در این تصویر همانطور که مشاهده می‌شود تعدادی از برگ‌های گیاهان ۳۱ روزه والدینی در واکنش به ۷۲ ساعت تیمار گاز اتیلن زرد شده اند، در حالیکه در هیچ‌یک از برگ‌های گیاهان *ein2* علامتی از زردی مشاهده نمی‌شود. EIN2 یکی از مهمترین اجزا در مسیر سیگنانالینگ اتیلن و یک تنظیم کننده مثبت در مسیر انتقال پیام اتیلن است. جهش در EIN2 موجب عدم حساسیت موتانت ایجاد شده در مقابل اتیلن می‌گردد. به دنبال اختلال در مسیر سیگنانالینگ اتیلن، پیام اتیلن منتقل نشده و در نتیجه بیان ژنهای مرتبط با و متأثر از اتیلن صورت نگرفته و به دنبال آن تأخیر در فرآیند پیری رخ می‌دهد (Alonso et al., 1999).

جهت بررسی دقیق‌تر تفاوت موتانت‌ها در زمینه واکنش به ACC، مقایسه میانگین صفات مورد توجه قرار گرفت. میانگین دو صفت طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه برای کلیه موتانت‌ها در مقایسه با شاهد Col-0 به جز موتانت *pad4* دارای تفاوت معنی داری در سطوح مختلف ACC هستند (شکل ۵ و ۶). ذیلأً به بررسی تفکیکی تأثیر هر یک از موتاسیونهای فوق بر صفات اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های

(Leaf Senescence) در مقایسه با گیاهان وحشی که قادر موتاسیون *ein2* است می‌گردد (شکل ۴). همانطور که قبلًا ذکر شد، وظیفه اصلی ژن *EIN2* کد کردن یک پروتئین داخل غشاء‌ی می‌باشد، که تنظیم کننده مثبت در مسیر انتقال پیام اتیلن است. خصوصیت تأخیر پیری در گیاهان جهش یافته *ein2* با افزایش حساسیت به برخی پاتوژنها همراه است. در واقع کاهش حساسیت به اتیلن در برخی گیاهان منجر به افزایش امکان حمله پاتوژن‌ها می‌شود (Thommas *et al.*, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). احتمالاً این نتایج به دلیل تأثیر موتاسیون در مسیر بیوستز و یا سیگنانلینگ اتیلن در این موتانت می‌باشد. اما با توجه به جدول ۳ طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت *ein2* در غلطت‌های مختلف ACC هیچ تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد و این بدان معنی است که گیاهچه‌های موتانت *ein2* به تیمار اتیلن، حساسیت و واکنش سه همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فنوتیپ واکنش سه گانه در گیاهچه‌های موتانت *ein2* با علائم گروه موتانت‌های مشابه می‌باشد. در گیاهان موتانت، پروتئین EIN2 به عنوان *ein* مهمترین جزء در مسیر سیگنانلینگ اتیلن دچار تغییر شده است و در نتیجه پیام اتیلن منتقل نمی‌شود و گیاه حساسیتی به حضور اتیلن نشان نخواهد داد. موتانت *ein2* یک فنوتیپ قادر حساسیت به اتیلن (Ethylene insensitive phenotype) می‌باشد. EIN2 به عنوان یکی از اجزای مهم و ضروری در مسیر سیگنانلینگ اتیلن، بین اجزای CTR1 و EIN3/EIL قرار گرفته و تنظیم کننده مثبت در این مسیر می‌باشد (Alonso *et al.*, 1999). اتصال اتیلن به گیرنده‌های این هورمون موجب غیرفعال شدن گیرنده‌ها شده و غیرفعال شدن گیرنده‌ها منجر به غیرفعال شدن CTR1 می‌گردد. CTR1 تنظیم کننده منفی در مسیر سیگنانلینگ اتیلن بوده و با اتصال اتیلن به گیرنده‌ها، CTR1 غیرفعال می‌شود، سپس EIN2 به عنوان یکی از اجزای مهم در سیگنانلینگ اتیلن، شروع به فعالیت می‌کند. EIN2 تنظیم کننده مثبت در این مسیر بوده و موجب فعال‌سازی یکسری از فاکتورهای رونویسی بنام EIN3/EIL شده و در نهایت موجب بیان ژن‌های مرتبط با اتیلن می‌گردد (Wang *et al.*, 2002).

احتمالاً موتاسیون در جایگاه EIN2 مانع از انتقال پیام اتیلن به

Kunkle and Brook, 2002 کامالکسین به سالیسیلیک اسید نیاز می‌باشد، لذا احتمالاً میزان مقاومت گیاهچه‌های موتانت به دلیل کاهش میزان کامالکسین در مقابل حمله پاتوژن‌ها کاهش می‌یابد. مسیر سیگنانلینگ هورمون سالیسیلیک اسید با هورمون اتیلن در گیاهان تداخل دارد (Kunkle and Brook, 2002; Leon-Reyer *et al.*, 2010). طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت *pad4* دارای تفاوت معنی‌داری در غلطت‌های مختلف از ACC در مقایسه با ژنوتیپ مادری نیست (شکل ۵ و ۶). اما این موتانت در مقایسه با ژنوتیپ مادری و در حضور اتیلن قادر چرخش در هیپوکوتیل می‌باشد (جدول ۱)، بنابراین احتمالاً سطوح سالیسیلیک اسید در شکل گیری قلاب رأسی توسط اتیلن نقش داشته است و کاهش سطح سالیسیلیک اسید در طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه تغییری به وجود نیاورده اما مانع از چرخش قلاب رأسی شده است. لذا احتمالاً موتاسیون *pad4* روی میزان فعالیت ژنهای موثر بر شکل گیری قلاب رأسی مؤثر است.

بررسی طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت *ein2*
همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، فنوتیپ مشابهی در گیاهچه‌های اتیوله موتانت *ein2* و ژنوتیپ مادری Col-0 از نظر علائم سه‌گانه دیده نمی‌شود. زیرا برخلاف ژنوتیپ مادری، گیاهچه‌های موتانت *ein2* در حضور اتیلن دارای هیپوکوتیل و ریشه‌چه طویل و قادر چرخش در قلاب رأسی می‌باشد. همچنین با توجه به شکل ۵ و ۶ طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در غلطت‌های مختلف ACC در گیاهچه‌های موتانت *ein2* در مقایسه با ژنوتیپ Col-0 از تفاوت معنی‌داری برخوردار است، در حالیکه این تفاوت در مقایسه با خودش معنی دار نیست، یعنی در گیاهچه‌های این موتانت طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در غلطت‌های مختلف ACC تقریباً یکسان می‌باشد (جدول ۳). همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌گردد، نسبت تغییر طول هیپوکوتیل در گیاهچه‌های موتانت *ein2* (۰/۹۹) با نسبت فوق در گیاهچه‌های وحشی Col-0 (۰/۳) بسیار متفاوت می‌باشد. علاوه بر این، تیمار نمودن گیاهان بالغ ۳۱ روزه *ein2* با گاز اتیلن بطور چشمگیری منجر به تأخیر فرآیند پیری

جدول ۳- تجزیه واریانس طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در ژن‌تیپ‌های *NahG*، *jar1*، *ein2*، *Col-0*، *pad4* و *edr1* در سطوح مختلف ACC

به روش برش دهی

ژن‌تیپ	درجه آزادی	SS		MS		F		طول هیپوکوتیل	طول ریشه‌چه
		طول هیپوکوتیل	طول ریشه‌چه	طول هیپوکوتیل	طول ریشه‌چه	طول هیپوکوتیل	طول ریشه‌چه		
<i>Col-0</i>	۴	۸۶/۲۷۵	۱۲۵/۶۵۹	۲۱/۵۶۸	۳۱/۴۱۴	۷۴/۹۵**	۲۱۵/۱۷**	۷۴/۹۵**	طول ریشه‌چه
<i>ein2</i>	۴	۲/۰۴۴	۷۰/۹۶۰	۰/۰۱۱	۰/۷۴	۱/۷۸ns	۱/۸ns	۰/۷۴	طول هیپوکوتیل
<i>jar1</i>	۴	۸۴/۴۴۲	۲۱/۱۱۰	۲/۸	۱۷/۵۲	۷۳/۳۶**	۱۲۰/۰۳**	۱۷/۳۶**	طول ریشه‌چه
<i>NahG</i>	۴	۲۰/۴۷۹	۱۰۸/۰۹۷	۵/۱۱۹	۲۷/۰۲۴	۱۷/۷۹**	۱۸۵/۱۰**	۱۷/۷۹**	طول هیپوکوتیل
<i>pad4</i>	۴	۸۳/۸۸۶	۱۰۹/۹۷	۲۰/۹۷۱	۲۷/۴۹۲	۷۲/۸۷**	۱۸۸/۳۱**	۷۲/۸۷**	طول ریشه‌چه
<i>edr1</i>	۴	۱۲۴/۰۲۵	۷۵/۶۴۶	۳۱/۰۰۶	۱۸/۹۱۱	۱۰۷/۴۷**	۱۲۹/۰۵**	۱۰۷/۴۷**	طول هیپوکوتیل

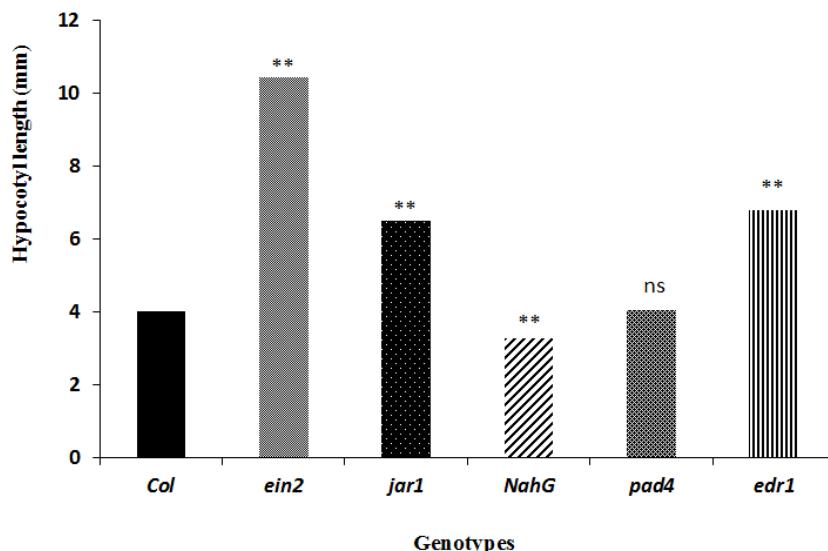
** به مفهوم معنی دار بودن تفاوت داده ها در سطح٪

گیاهان موتانت به علت افزایش القای سالیسیلیک اسید رخ داده است. واکنش دفاعی گیاهان علیه حمله میکروبی از طریق شبکه پیچیده‌ای از مسیرهای سیگنالینگ که شامل سیگنالینگ سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن هستند، صورت می‌گیرد. این تداخل (Cross talk) موجب القا واکنش دفاعی گیاهان در ارتباط با مسیرهای سیگنالینگ مختلف می‌گردد (Tang *et al.*, 2005; Kunkle and Brook, 2002). وجود تفاوت معنی دار در روند تغییر طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه بین موتانت *edr1* و ژن‌تیپ مادری *Col-0* نشان داد که این موتاسیون بر مسیر بیوسترز، درک یا انتقال پیام اتیلن نیز تأثیرگذار بوده و آنرا تغییر داده است. احتمالاً عملکرد ژن *EDR1* در مسیر تداخل بین سیگنالینگ اتیلن و سالیسیلیک اسید که در مرگ سلولی و پیری دخالت دارند، صورت می‌گیرد. به همین دلیل نیز تغییر در سطح سالیسیلیک اسید موجب تغییر در مسیر بیوسترز اتیلن می‌شود. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً افزایش در سطح سالیسیلیک اسید موجب ایجاد تغییر در مسیر بیوسترز و سیگنالینگ اتیلن خواهد شد.

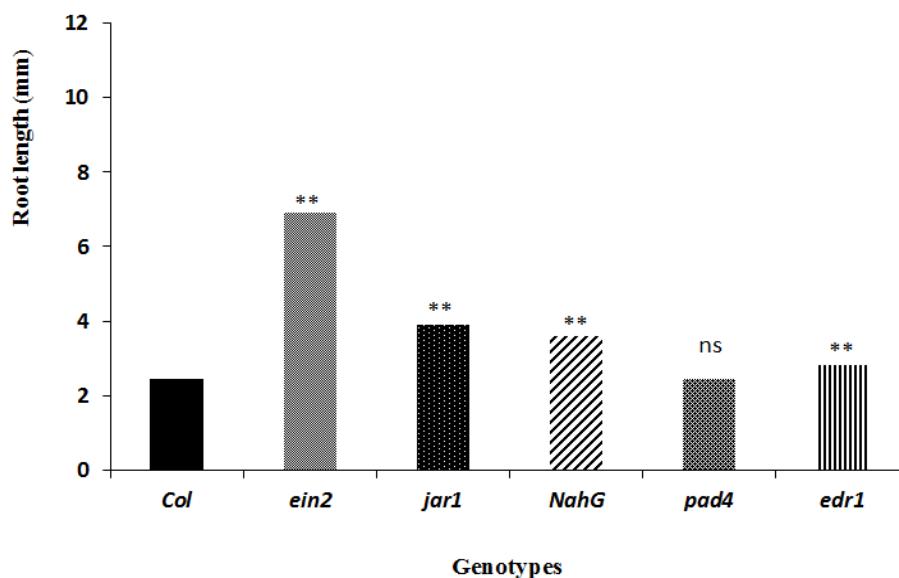
بررسی طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت *jar1*: مطابق با جدول ۱ در موتانت *jar1* و ژن‌تیپ مادری *Col-0* از نظر علائم سه‌گانه، فنوتیپ یکسانی دیده نمی‌شود. مطابق با شکل ۲ و ۳ موتانت *jar1* از نظر طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه دارای تفاوت معنی داری در سطوح مختلف ACC و همچنین با

سایر اجزای مسیر انتقال پیام اتیلن شده و در نهایت منجر به عدم حساسیت در حضور تیمار اتیلن و اتیلن داخل سلولی می‌شود.

بررسی طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت *edr1*: طبق جدول ۱ علائم کاملاً یکسانی در موتانت *edr1* و ژن‌تیپ مادری *Col-0* از نظر علائم سه‌گانه دیده نمی‌شود. زیرا موتانت *edr1* در حضور اتیلن فاقد چرخش در قلاب رأسی می‌باشد. مطابق با شکل ۲ و ۳ موتانت *edr1* از نظر طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه دارای تفاوت معنی داری با خودش در سطوح مختلف ACC و با ژن‌تیپ مادری *Col-0* میباشد(شکل ۵ و ۶- جدول ۳). همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌گردد، نسبت تغییر طول هیپوکوتیل در گیاهچه های موتانت *edr1* ($۰/۰/۴$) با نسبت فوق در گیاهچه های وحشی *Col-0* ($۰/۳/۰$) متفاوت میباشد. بنابراین احتمالاً این موتانت از وضعیت متفاوتی در زمینه مسیر بیوسترز، درک و سیگنالینگ اتیلن در مقایسه با ژن‌تیپ مادری *ENHANCED DISEASE (EDR1)* برخوردار است. ژن *EDR1* (RESISTANCE1) یک پروتئین کیناز مشابه CTR1 را کد می‌کند (Tang *et al.*, 2005). این کیناز تنظیم کننده منفی در فرایند مقاومت به بیماری و پیری القا شده توسط اتیلن است، لذا پیری در گیاهان موتانت *edr1* در واکنش به تیمار اتیلن تسريع و مقاومت در گیاه علیه بیماری سفیدک پودری افزایش می‌یابد (Dingzhong and Innes, 2002).



شکل ۵- مقایسه میانگین طول هپیوکوتیل در کلیه غلظت‌های مختلف ACC در هر یک از موتانت‌های *ein2*, *jar1*, *NahG*, *pad4* و *edr1* با شاهد Col-0 با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ (** = تفاوت معنی دار ns = تفاوت بی معنی).



شکل ۶- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه در کلیه غلظت‌های مختلف ACC در هر یک از موتانت‌های *ein2*, *jar1*, *NahG*, *pad4* و *edr1* با شاهد Col-0 با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ (** = تفاوت معنی دار ns = تفاوت بی معنی).

معنای تأثیر موتاسیون بر مسیر بیوسنتر، درک یا سیگنالینگ اتیلن در گیاهچه‌های موتانت *jar1* باشد. پروتئین *Jar1* اتیلن را در ژن *JAR1* (Acid response Jasmonic 1) از جمله ژن‌های موثر بر واکنش گیاه به سیگنالینگ جاسمونیک است. میزان حساسیت گیاهچه‌های موتانت *jar1* به جاسمونیک اسید و متیل جاسمونیت به دلیل نقص آنزیمی *JAR1* کاهش یافته و در

ژنوتیپ مادری Col-0 میباشد(شکل های ۵ و ۶ و جدول ۳). همانطور که در جدول ۴ مشاهده میگردد، نسبت تغییر طول هپیوکوتیل در گیاهچه‌های موتانت *jar1* (۰/۴۴) با نسبت فوق در گیاهچه‌های وحشی Col-0 (۰/۳) متفاوت میباشد. در نتیجه احتمالاً این ژنوتیپ دچار نقص در یکی از مسیرهای بیوسنتر، درک یا سیگنالینگ اتیلن میباشد و این میتواند به

جدول ۴- نسبت تغییر طول هیپوکوتیل در گیاهچه های موتانت و والد حشی Col-0 (تیمار شده با ۱۰ میکرومولار ACC) به طول هیپوکوتیل در این گیاهچه در محیط غذایی فاقد ACC.

Mutant	ACC (0µM)	ACC (10µM)	Ratio
Col-0	۸/۶۶ + ۰/۲	۲/۶۶ + ۰/۳	۰/۳
<i>ein2</i>	۱۰/۲ + ۰/۴	۱۰/۱ + ۰/۳	۰/۹۹
<i>Jar1</i>	۱۱ + ۰/۳۵	۴/۹ + ۰/۲	۰/۴۴
<i>NahG</i>	۴/۷۲ + ۰/۷	۳/۶ + ۰/۲	۰/۷۶
<i>PAD4</i>	۸/۸۳ + ۰/۴	۳/۳۶ + ۰/۲	۰/۳۸
<i>edr1</i>	۱۲/۵ + ۰/۲	۵ + ۰/۲	۰/۴

بررسی طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت *NahG*: همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در موتانت *NahG* و ژنوتیپ مادری Col-0 از نظر فنوتیپ واکنش سه‌گانه عالائم یکسانی دیده نمی‌شود. مطابق با شکل ۲ و ۳ موتانت *NahG* از نظر طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه دارای تفاوت معنی‌داری در سطوح مختلف ACC در مقایسه با خود و با ژنوتیپ مادری Col-0 می‌باشد(شکل‌های ۵ و ۶ و جدول ۳). همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌گردد، نسبت تغییر طول هیپوکوتیل در گیاهچه های موتانت *NahG* (۰/۷۶) با نسبت فوق در گیاهچه های وحشی Col-0 (۰/۳) بسیار متفاوت می‌باشد. در نتیجه احتمالاً این ژنوتیپ دچار نقص در یکی از مسیرهای بیوسنتز، درک یا سیگنالینگ اتیلن می‌باشد. گیاهان ترانسئنیک اثر بیان مضاعف این ژن، آنزیم سالیسیلات هیدروکسیلاز را با مقادیر بیشتری تولید می‌کنند. این آنزیم می‌تواند سالیسیلیک اسید را متabolize نماید. سالیسیلات هیدروکسیلاز مانع تجمع SA (سالیسیلیک اسید) در هنگام حمله پاتوژن شده و در نتیجه قدرت دفاعی گیاه را کاهش می‌دهد. این هورمون علاوه بر تأثیر در سیستم دفاعی گیاه، بیان برخی از ژن‌های مرتبط با پیری را نیز تنظیم می‌کند(Lawton *et al.*, 1995). همانطور که قبل اشاره شد، اثر متقابل و تداخلی هورمون‌های سالیسیلیک اسید، جیبرلیک اسید و اتیلن موجب می‌شود که تغییر در سطح یکی از هورمون‌ها در مسیر انتقال پیام سایر هورمون‌ها نیز تغییر ایجاد شود. نکته قابل توجه در خصوص موتانت *NahG* اینست

نتیجه واکنش دفاعی در گیاهان موتانت علیه پاتوژن‌ها دچار ضعف می‌شود (Staswick and Tiryaki, 2004). بنابراین این موتانت در مقابل حمله پاتوژن‌ها حساسیت بیشتری دارد. از طرف دیگر مقدار این هورمون در هنگام پیری در برگ‌ها افزایش یافته و بیان ژن‌های مرتبط با فتوسترات را کاهش می‌دهد (He *et al.*, 2002). از آنجایی که مسیر پیام رسانی سالیسیلیک اسید، جیبرلیک اسید و اتیلن در سیستم دفاعی گیاهان اثر متقابل و تداخلی بر هم دارند (Tang *et al.*, 2005; Kunkle and Brook, 2002)، در گیاهچه‌های موتانت *jar1* نیز ایجاد موتاسیون و تغییر مقاومت در گیاهان موتانت علیه پاتوژن‌ها و کاهش مقدار جیبرلیک اسید فعال در گیاه، به مسیر بیوسنتز، درک یا سیگنالینگ اتیلن آسیب وارد کرده است. احتمالاً موتانت‌هایی که در آنها سطح یکی از هومون‌های اتیلن، سالیسیلیک اسید و جیبرلیک اسید دچار تغییر شده است، برای فعال‌سازی مسیر پیام رسانی سایر هورمون‌ها تغییر حساسیت می‌دهند. موتانت *edr1* و *jar1* به ترتیب در القای سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید دچار اختلال و تغییر شده‌اند که این می‌تواند با توجه به وابستگی مسیر سیگنالینگ اتیلن به مسیر سیگنالینگ JA و SA در واکنش موتانت‌ها به اتیلن تغییر ایجاد کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت برای داشتن مسیر بیوسنتز، درک و انتقال پیام مناسب و فعال برای هورمون اتیلن در گیاهان، به فعالیت نرم‌مال و صحیح مسیر انتقال پیام دو هورمون سالیسیلیک اسید و جیبرلیک اسید نیاز است.(Wang *et al.*, 2002; Kunkle and Brook, 2002)

منتظر بررسی تأثیر فعالیت ژن‌های مختلف بر مسیر بیوسینتر، درک و انتقال پیام اتیلن در گیاهچه‌های موتانت *jar1 ein2*، *jar1* و *edr1 NahG pad4* در حضور و عدم حضور اتیلن مورد بررسی و با واکنش گیاهچه‌های مادری *Col-0* مقایسه شد. در این گروه هیچ کدام از ژنوتیپ‌ها فنوتیپ سه‌گانه کاملاً یکسانی با ژنوتیپ مادری در حضور و عدم حضور تیمار اتیلن نشان ندادند و فقط ژنوتیپ *pad4* از نظر طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه تفاوتی با ژنوتیپ مادری خود نداشته است و سایر ژنوتیپ‌ها دارای تفاوتی معنی‌دار با ژنوتیپ مادری در این گروه بوده‌اند. لذا وقوع موتاسیون در ژنهای متفاوت در گیاهان جهش یافته مورد بررسی موجب ایجاد اثرات متفاوتی در زمینه واکنش گیاهان موتانت به اتیلن می‌گردد.

که بر خلاف موتانت *pad4* که با کاهش سطح سالیسیلیک اسید توسط آنزیم سالیسیلات هیدروکسیلاز، تفاوت معنی‌داری در این ژنوتیپ از نظر طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل با ژنوتیپ مادری مشاهده نمی‌شود. در گیاهچه‌های موتانت *NahG* با وجود کاهش سطح سالیسیلیک اسید توسط آنزیم سالیسیلات هیدروکسیلاز، تفاوت معنی‌داری از نظر طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه با ژنوتیپ مادری نشان می‌دهد (شکل ۳ و ۴). تفاوت معنی‌دار طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت *NahG* با صفات فوق در ژنوتیپ مادری احتمالاً بعلت اثرات ورود ژن جدید بوده است.

نتیجه‌گیری:

در این تحقیق بررسی سه صفت طول هیپوکوتیل، طول ریشه‌چه و چرخش قلاب رأسی تحت عنوان واکنش سه‌گانه به

منابع:

- response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. Molecular Plant – Microbe Interactions 23: 187-197.
- Li, H and Guo, H. (2007) Molecular basis of the ethylene signaling and response pathway in *Arabidopsis*. Plant Growth Regulation 26:106-117.
- Ma, B., M. Sui, H. Sun, K. Takada, H. Mori, H. Kamada and H. Ezora. (2006) Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. Plant Physiology 141:587-597.
- Neljubow, D. N. (1901) Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer Pflanzen. Beiträge und Botanik Zentralblatt 10: 128-139.
- Olmedo, G., Goue, H., Gregory, B., Nourizadeh, S., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P. and Ecker, J. (2006) Ethylene-insensitive5 encodes a 5' → 3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3- targeting F-box proteins EBF1/2. PNAS 36: 13286-13293.
- Omalley, RC., F. Rodriguez, J. Esch, B. Binder, P. O'Donnell, H. Klee and A. Bleeker. (2005) Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and Tomato. Plant Journal 41:651–659
- Shirzadian-Khorramabad, R., Jing, H. C., Hille, J. and Dijkwel, P. P. (2010) Identification of *Arabidopsis* stay-green mutants with a functional ethylene-response pathway. In: Agronomy Society of New Zealand Special Publication No. 13 / Grassland Research and Practice No. 14: 119-130.
- Alonso, J., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh S., and Ecker, J. R. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. Science 284: 2148-2152.
- Dalcin, V., Rizzini, F., Botton, A., and Tonutti, P. (2006) The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. Postharvest Biology and Technology 42: 125-133.
- Guzman, P and Ecker, J. R. (1990) Exploiting the triple response of arabidopsis to identify ethylene-related mutants. Plant Cell 2: 513-523.
- He, Y., H. Fukushima, D. Hildebrand and Gan, S. (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in arabidopsis leaf senescence. Plant Physiology 128: 876-884.
- Jirage, D., Tootle, T., Linea, T., Forest, L. N., Fart, B., Parker, J. and Ausable, F. (1999) *Arabidopsis thaliana* PAD₄ encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. PNAS 96: 13583-13588.
- Kunkle, B and Brook, D. (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Plant Biology 5:325-331.
- Lawton, K., Waymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Üknes, S., and Ryals, J. (1995) Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. Molecular Plant Microbe Interaction 8:863-70.
- Leon-Reyer, A., Du, Y., Koornneef, A., Proietti, S., Korbes, A., Memelink, J., Pieters, C., and Ritsema, T. (2010) Ethylene signaling renders the jasmonate

- Thomma, B. P. H., Nelissen, I., Eggermont, K. and Broekaert, W. F. (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant Journal* 19: 163-171.
- Wang, K., Li, H. and Ecker, J. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* S131-S151.
- Zhou, N., Tootle, T., Tsue, F., Klessig, D. and Glazbrook, j. (1998) PAD4 Functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1021–1030.
- Stepanova, A and Ecker, J. R. (2000) Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Plant Biology* 3:353-360.
- Staswick, P. and Tiryaki, I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2117-2127.
- Tang, D., Christiansen, K. and Innes, R. (2005) Regulation of plant disease resistance, stress responses, cell death, and ethylene signaling in *Arabidopsis* by the EDR1 protein kinase. *Plant Physiology* 138: 1018–1026.
- Van loon, L., Geraats, P., and Linthorst, H. (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Plant Science* 11: 184-191.