

آنالیز بیان ژن و فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز در لایه آلرون تیمار شده با هورمون جیبرلیک اسید، آبسزیک اسید و سالیسیلیک اسید

نسیم طلایی و آذر شاه‌پیری*

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۵/۲۸)

چکیده:

لایه آلرون لایه‌ای نازک در بذر غلات می‌باشد که در جوانه‌زنی بذر نقش کلیدی دارد. امکان جداسازی لایه آلرون بذر جو از سایر بافت‌های بذر و همچنین کشت آن در بافر مناسب، باعث شده تا محققان آن را به عنوان سیستم مدل برای مطالعه سیگنال‌های گیاهی در سطح مولکولی استفاده کنند. در این مطالعه اثر سه هورمون جیبرلیک اسید (GA)، آبسزیک اسید (ABA) و سالیسیلیک اسید (SA) بر روی بیان دو ژن کدکننده آسکوربات پراکسیداز (Apx)، Apx1 و Apx2، در آلرون تیمار شده با این هورمون‌ها در زمان‌های مختلف ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو ژن Apx1 و Apx2 در لایه آلرون بیان می‌شود و سطح بیان آنها در لایه آلرون تحت تاثیر هورمون‌ها قرار نمی‌گیرد. همچنین فعالیت آنزیمی Apx در آلرون تیمار شده با این هورمون‌ها مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیمی در لایه آلرون تیمار شده با GA بین ۷۲-۲۴ ساعت تیمار شروع به کاهش کرد که با فعالیت آنزیمی در لایه آلرون تیمار شده با دیگر هورمون‌ها و محیط فاقد هورمون تفاوت قابل توجهی نشان داد.

کلمات کلیدی: آبسزیک اسید، آسکوربات پراکسیداز، جیبرلیک اسید، سالیسیلیک اسید، فعالیت آنزیمی، لایه آلرون.

مقدمه:

گیاهچه را فراهم می‌کنند (Ritchie et al., 2000). آمینواسیدهای مورد نیاز برای سنتز آنزیم‌های هیدرولیتیکی که از لایه آلرون ترشح می‌شود از ذخائر پروتئینی موجود در واکوئل‌های ذخیره‌ای لایه آلرون تامین می‌گردند (Jones, 1969). همچنین انرژی مورد نیاز برای متابولیسم سلولی لایه آلرون از ذخائر تری گلیسرید موجود در لایه آلرون تامین می‌گردند. اسیدهای چرب موجود در لایه آلرون در فرایند بتا اکسیداسیون می‌سوزد و انرژی لازم برای متابولیسم سلولی لایه آلرون را فراهم مینماید (Finnie et al., 2011). متابولیسم سلولی در لایه آلرون از جمله فرایند بتا اکسیداسیون که با هورمون GA آغاز

لایه آلرون غلات لایه‌ای بسیار نازک است که نقش کلیدی در جوانه زنی دارد (Ishibashi, 2012). به محض جذب آب توسط بذرهای خشک هورمون جیبرلیک اسید (GA) در جنین تولید می‌شود. سپس این هورمون به لایه آلرون بذر فرستاده می‌شود و در لایه آلرون در پاسخ به این هورمون آنزیم‌های هیدرولیتیکی سنتز شده و به درون آندوسپرم نشاسته‌ای ترشح می‌شوند (Zentella et al., 2002). این آنزیم‌ها باعث هضم پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های ذخیره در سلول‌های آندوسپرم نشاسته‌ای شده و مواد غذایی لازم برای حمایت از رشد

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir

اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل آسکوربات، توکوفرول، کاروتنوئیدها و ترکیبات متفرقه از جمله فلاونوئیدها، مانیتول‌ها و پلی‌فنول‌ها مسئول تعدیل میزان ROS ها در سلول می‌باشد (Mittler *et al.*, 2004). تا کنون مطالعاتی در رابطه با فعالیت آنزیم کاتالاز در لایه آلرون تیمار شده با هورمون‌های GA و ABA صورت گرفته است و نشان داده شده که فعالیت آنزیمی کاتالاز در لایه آلرون تیمار شده با هورمون GA با گذشت زمان کاهش یافته است در حالی که فعالیت این آنزیم در حضور هورمون ABA با گذشت زمان به صورت ثابت باقی مانده است (Fath *et al.*, 2002). در این مطالعه نیز قصد داریم با استفاده از لایه آلرون به عنوان یک سیستم مدل به بررسی بیان ژن کد کننده آنزیم APX که یکی از مهمترین آنزیم‌های مسئول ردوکس در سلول‌های گیاهی می‌باشد در لایه آلرون تیمار شده با هورمون‌های GA، ABA و SA پردازیم. به علاوه در این تحقیق فعالیت آنزیمی APX در لایه آلرون مورد مطالعه قرار می‌گیرد و ارتباط فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با مرگ سلولی در لایه آلرون بذر جو تیمار شده با هورمون‌های مختلف مورد بحث قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها:

جدا سازی لایه آلرون از دیگر قسمت‌های بذر جو: بذره‌های جو رقم فجر ۳۰ از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تهیه شد. با توجه به اینکه جنین بذر منبع تولید هورمون در بذر هنگام جوانه‌زنی می‌باشد، قسمت حاوی جنین که در انتهای شیار هفت مانند بذر قرار گرفته است، با استفاده از اسکالپل از بذر جدا شد. سپس بذره‌های فاقد جنین در اتانول ۷۰٪، ضدعفونی شدند و پس از آن ۵ مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. بذره‌های فاقد جنین شستشو شده در ml ۲۵ آب مقطر استریل حاوی ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مدت ۴ روز در دمای 4°C خیسانده شدند. بعد از آن پوسته بذر از قسمت رویی آن به آرامی جدا شد و سپس با تراشیدن آندوسپرم نشاسته‌ای به کمک اسکالپل تمیز، آندوسپرم از لایه آلرون جدا شد. بعد از اتمام جداسازی لایه‌های آلرون از بذرها، مقدار mg ۱۰۰ لایه آلرون در ml ۲ بافر مناسب

می‌گردد منجر به تولید گونه‌های واکنش گر اکسیژن مانند رادیکال سوپر اکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) می‌شوند (Fath *et al.*, 2002). تجمع ROS در سلول‌ها سبب بروز صدمات در سلول می‌گردد که منجر به مرگ سلول می‌شوند (Bonsager *et al.*, 2010). اکسید شدن لیپیدهای غشایی و در نتیجه تغییر ساختار غشا و از هم پاشیدگی یکپارچگی آن، تغییر ساختمان پروتئین‌ها و اکسید شدن گروه‌های سولفیدریل ($-\text{SH}$)، غیر فعال شدن آنزیم‌ها و آسیب به مولکول‌های آلی مثل DNA از جمله این صدمات می‌باشند (Mohanty, 2003). بعد از ترشح کامل آنزیم‌های هیدرولاز، سلول‌های آلرون زنده دیگر برای بذر لازم نمی‌باشند. لذا پس از فرا رسیدن مرگ سلولی سلول‌های آلرون مرده شبیه سلول‌های آندوسپرم نشاسته‌ای می‌باشند. این سلول‌های مرده برای تجزیه کامل در معرض آنزیم‌ها قرار می‌گیرند. تجزیه ماکرومولکول‌های باقی مانده در بقایای سلول‌های آلرون مرده، به عنوان ماده غذایی برای جنین به مصرف می‌رسند (Bethke *et al.*, 1999).

تحقیقات قبلی به خوبی نشان داده اند که مرگ سلولی در لایه آلرون بذر غلات توسط هورمون‌ها کنترل می‌گردد. بطوریکه هورمون GA با عث القای مرگ سلولی در لایه آلرون می‌گردد در حالیکه مرگ سلولی در لایه آلرون تیمار شده با هورمون ABA به تاخیر می‌افتد (Kuo *et al.*, 1996). لازم به ذکر است که ABA هورمون دیگری است که اثرآنتاگونیستی با GA دارد و از بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک در لایه آلرون جلوگیری می‌کند (Ho *et al.*, 2003). در طول بالغ شدن بذر، افزایش ABA از جوانه‌زنی بذر جلوگیری می‌کند و باعث ارتقای پر شدن دانه و خشک شدن آن می‌شود (Olsen, 2001). با این حال ABA بیان بسیاری از ژن‌ها که در تحمل به استرس و خواب بذر نقش دارند را تحریک می‌کند (Rock, 2000. Leung, and Giraudat, 1998).

کنترل سطح ROS ها در سلول‌های زنده اهمیت زیادی دارد. در واقع شبکه ای از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلووتاتیون ردوکتاز (GR) است و آنتی

مرحله قبل، آنزیم Taq DNA پلیمرز (Fermentas) و آغازگرهای اختصاصی، واکنش PCR انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد بارگذاری شد. شدت باندها با استفاده از نرم افزار Image J به دست آمد. سپس نسبت شدت باند مربوط به Apx نسبت به شدت باند مربوط به 18srRNA محاسبه شد و نمودارهای ستونی با استفاده از میانگین سه تکرار رسم شد.

استخراج پروتئین محلول کل از لایه آلرون و تخمین

غلظت پروتئین: برای استخراج پروتئین از لایه‌های آلرون جدا شده، ابتدا ویال‌های حاوی آنها به مدت ۳-۴ ساعت در دستگاه سانتریفیوژ تحت خلا قرار داده شدند تا آب آنها کاملاً گرفته و خشک شوند. لایه‌های آلرون خشک شده در هاون‌های چینی کاملاً استریل و سرد کوبیده شدند و به پودر تبدیل شدند. برای استخراج پروتئین از لایه‌های آلرون از مقدار ۶۰۰ μ l بافر استخراج استریل (۵ mM Tris-HCl در pH=۷/۵ و ۱ mM CaCl_2) و سرد استفاده شد. لازم به ذکر است جهت جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های پروتئاز در محیط ۴ μ l بازدارنده پروتئاز (فرمنتاز) به بافر اضافه شد. برای استخراج بیشتر پروتئین از لایه‌های آلرون و به دست آوردن مخلوط همگن، در داخل هر ویال ۲-۳ عدد از تیل‌های شیشه‌ای استریل قرار داده شدند و چند ثانیه بر روی دستگاه ورتکس نگه داشته شدند. سپس ویال‌ها بر روی شیکر در دمای ۴°C به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. ویال‌ها در دمای ۴°C به مدت ۲ دقیقه و با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع آوری شد و به ویال‌های جدید منتقل شدند. سپس ویال‌ها در دمای ۴°C و به مدت ۱۰ دقیقه و با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این مرحله مقدار ۵۰۰ μ l مایع رویی به داخل ویال جدید و سرد انتقال داده شدند و در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند. برای تعیین غلظت پروتئین کل موجود در لایه آلرون از روش بردفورد استفاده شد. منحنی استاندارد با استفاده از پروتئین بویین سرم آلبومین (BSA) رسم شد.

فعالیت آنزیمی Apx: واکنش در حجم ۳۰۰ میکرو لیتر

شامل پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۷، EDTA با

۲۰ mM سوکسینات سدیم، ۲۰ mM کلرید کلسیم و ۵۰ μ g/ml آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در pH= ۴/۲ حاوی یکی از هورمون‌های GA (۵ μ M)، هورمون SA (۲۰ μ M) و هورمون ABA (۲۰ μ M) و هم‌چنین تیمار بدون هورمون به عنوان شاهد در زمان‌های مختلف ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. در پایان مدت زمان تعیین شده لایه‌های آلرون از هر تیمار به وسیله پنس تمیز جمع‌آوری و پس از شستشو با بافر بالا، در داخل ویال استریل قرار داده شدند. جهت نگهداری لایه‌های آلرون ویال‌های حاوی لایه آلرون برای مدت چند دقیقه در ازلت مایع قرار گرفتند و سپس تا زمان استفاده در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند.

استخراج rRNA کل از لایه آلرون: محتوای RNA کل

از آلرون‌ها با استفاده از کیت High pure RNA isolation (Roche) جهت حذف آلودگی DNA، نمونه‌ها توسط محلول DNase فاقد RNase، تیمار شدند. غلظت rRNA کل با استفاده از اسپکتروفوتومتر با اندازه‌گیری در جذب ۲۶۰ نانومتر تعیین شد.

آنالیز بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در لایه آلرون: آنالیز

بیان ژن با استفاده از روش semi-quantitative RT-PCR انجام شد. لازم به ذکر است ژن 18s rRNA به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. بدین منظور محتوای RNA (غلظت ۰/۱ میکروگرم) با استفاده از واکنش نسخه برداری معکوس (RT-PCR) و توسط کیت AMV Reverse Transcriptase (Fermentas) و آغازگر Oligo dT (Fermentas) جهت تهیه cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

جفت پرایمرهای اختصاصی Apx2F- و Apx1R-Apx1F به ترتیب بر اساس توالی ژن کد کننده آنزیم Apx2R (AJ006358) و Apx2 (AF411228) در گیاه جو طراحی شد (جدول ۱). لازم به ذکر است با توجه به شباهت بالای توالی این دو ژن طراحی پرایمر اختصاصی برای هر ژن از روی نواحی غیر مشابه این دو ژن صورت گرفت. پرایمرهای 18sF و 18sR بر اساس توالی 18srRNA موجود از گیاه جو در بانک ژنی طراحی شد. سپس با استفاده از cDNAی تولید شده در

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

Primers	Sequences
Apx1F	GCAAGTCTTTGGGAAGCAGA
Apx1R	AGTTTGTGCACTTGAAGCTGAAG
Apx2R	CAGGCAGGTGTTTTCCACTC
Apx2F	CCTTGTCGGTCGGCAACT
srRNA ¹⁸	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA
srRNA ¹⁸	ACACTTCACCGGAC-CATTCAA

تخمین غلظت پروتئین محلول کل و تأثیر هورمون‌ها بر فعالیت آنزیمی Apx در لایه آلرون: تخمین غلظت پروتئین-های استخراج شده از مقدار یکسانی AL-ABA، AL-GA و AL-SA 20 μM در زمان‌های ۶ تا ۴۸ ساعت انکوباسیون، تفاوت معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد در همان زمان انکوباسیون نداشت. با این حال پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، مقدار پروتئین محلول استخراج شده از لایه‌های آلرون تیمار هورمونی GA در این زمان کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲). این درحالی است که این کاهش در AL-ABA، AL-SA در مقایسه با تیمار شاهد در این زمان مشاهده نشد.

فعالیت آنزیمی APX در AL-GA بین ۶-۲۴ ساعت انکوباسیون روند رو به افزایشی را نشان داد. با این حال بین ۷۲-۲۴ ساعت انکوباسیون فعالیت آنزیمی روند رو به کاهش قابل توجهی داشت (شکل ۳). فعالیت آنزیمی Apx در AL-control بین ۶-۴۸ ساعت انکوباسیون روند روبه افزایشی را نشان می‌دهد. با این حال فعالیت آنزیمی Apx بعد از ۷۲ ساعت در مقایسه با فعالیت آنزیم بعد از ۴۸ ساعت هیچ تغییری نداشت. فعالیت آنزیمی Apx در AL-ABA بین ۶-۷۲ ساعت انکوباسیون روند رو به افزایشی را نشان داد. در این تیمار بر خلاف آلرون‌های کشت شده در محیط فاقد هورمون میزان فعالیت آنزیمی Apx در آلرون‌های انکوبه شده به مدت ۷۲ ساعت به طور قابل توجهی بیش از فعالیت آنزیمی Apx در آلرون‌های انکوبه شده به مدت ۴۸ ساعت بود. فعالیت آنزیمی در AL-SA-20 بین ۷۲-۶ ساعت انکوباسیون تقریباً ثابت باقی ماند (شکل ۳).

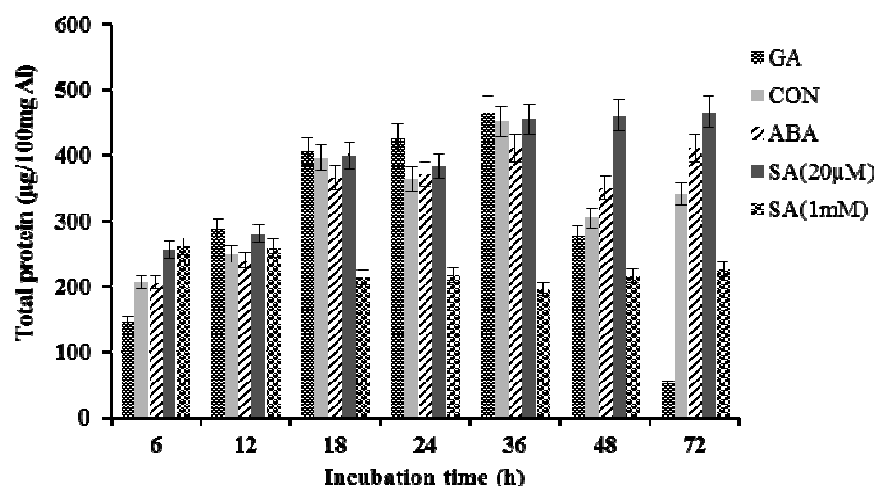
بحث:

کنترل ROS در طول جوانه زنی بذر غلات توسط آنزیم‌های مختلفی صورت می‌گیرد. چرخه آسکوربات- گلوکاتینون یکی

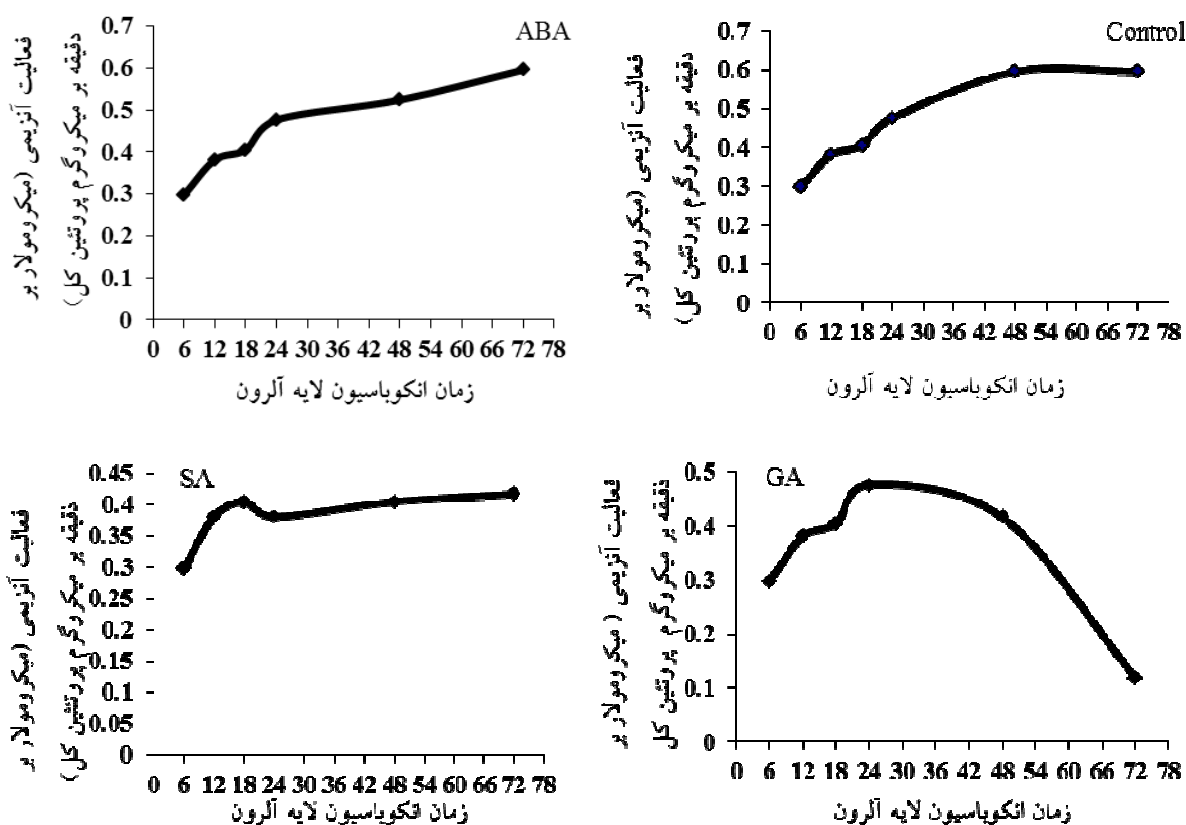
غلظت ۰/۱ میلی مولار، H₂O₂ با غلظت ۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید با غلظت ۱ میلی مولار با اضافه کردن ۳۰ میکرو گرم از پروتئین‌های استخراج شده در دمای آزمایشگاه انجام شد. مقدار جذب نوری در طول موج ۲۹۰ نانومتر، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Beckman DU 530) اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است یک واکنش حاوی تمام ترکیبات ذکر شده در واکنش بدون حضور پروتئین به عنوان واکنش کنترل در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیمی بر اساس میزان مصرف آسکوربیک اسید در واحد زمان در واحد وزن پروتئین کل وارد شده در واکنش محاسبه شد. ضریب خاموش مولی برای آسکوربیک اسید ۲/۸ mM⁻¹Cm⁻¹ در نظر گرفته شد.

نتایج:

آنالیز بیان ژن Apx در لایه آلرون تیمار شده با هورمون: باند مربوط به هر دو ژن Apx1 و Apx2 در لایه آلرون کشت داده شده در محیط فاقد هورمون (AL-Control) و همچنین در لایه‌های آلرون تیمار شده با GA (AL-GA)، تیمار شده با ABA و تیمار شده با SA در غلظت ۲۰ میکرومولار (AL-SA 20μM) مشاهده شد (شکل ۱). شدت این باند در زمانهای مختلف انکوباسیون ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت تقریباً یکسان بود. لازم به ذکر است با توجه به اینکه غلظت rRNA استخراج شده در AL-GA بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون به شدت کم بود آنالیز بیان ژن در این تیمار فقط تا ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون مورد مطالعه قرار گرفت. با این حال در AL-control، AL-ABA و AL-SA-20μM شدت باند مربوط به هر دو ژن Apx1 و Apx2 در ۷۲ ساعت انکوباسیون با شدت باند این دو ژن در زمان‌های اولیه انکوباسیون تقریباً یکسان بود.



شکل ۲- مقایسه پروتئین محلول کل استخراج شده از ۱۰۰ میلی گرم لایه‌های آلرون تیمار شده با هورمون‌های GA، ABA، SA (۱ mM)، SA (۲۰ µM) و تیمار شاهد در زمان‌های بین ۶-۷۲ ساعت انکوباسیون. (هر نمودار با ۳ تکرار آزمایش نشان داده شده است).



شکل ۳- فعالیت آنزیمی آنزیم APX در پروتئین‌های استخراج شده از AL-Control و AL-SA (20 µM)، AL-ABA، AL-GA در زمان‌های بین ۶-۷۲ ساعت پس از انکوباسیون.

چرخه با فعالیت آنزیم Apx مولکول H_2O_2 به آب و اکسیژن تبدیل می‌شود. این عمل از طریق اکسید شدن آسکوربیک اسید

از مهمترین سیستم‌های کنترل سطح ROS می‌باشد. در این چرخه آنزیم‌های مختلفی درگیر می‌باشند. در واقع در این

نمی‌شود. اما بررسی فعالیت آنزیمی Apx در این تحقیق نشان می‌دهد فعالیت این آنزیم در لایه آلرون پس از ۲۴ ساعت تیمار با GA شروع به کاهش می‌نماید. از طرفی فت و همکاران در سال ۲۰۰۱ با استفاده از تکنیک وسترن بلات و آنتی بادی اختصاصی علیه Apx نشان دادند که مقدار این آنزیم در AL-GA با افزایش انکوباسیون کاهش ابد. در حالیکه میزان این آنزیم در AL-Control، AL-ABA با افزایش زمان انکوباسون ثابت باقی می‌ماند. لذا به نظر می‌رسد هورمون GA اگرچه بر روی بیان دو ژن تأثیری نداشت ولی به طور قابل توجهی باعث کاهش مقدار و فعالیت این دو آنزیم می‌شود.

بررسی مقدار پروتئین استخراج شده از لایه آلرون نیز نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون لایه آلرون در GA مقدار بسیار ناچیزی پروتئین در لایه آلرون وجود دارد. این در حالی است که در لایه آلرون تحت تیمار ABA و یا SA و همچنین لایه های آلرون قرار گرفته در محیط کشت فاقد هورمون کاهش محسوسی در مقدار پروتئین استخراج شده بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون مشاهده نمی‌شود. این کاهش قابل توجه در مقدار پروتئین کل قابل استخراج از AL-GA بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون را شاید بتوان به مرگ سلولی نسبت داد که بیش از این نشان داده شده که با حضور GA تسریع می‌گردد و برعکس با حضور ABA به تاخیر می‌افتد. کاهش قابل توجه در فعالیت آنزیمی Apx در لایه های آلرون تیمار شده با هورمون GA را شاید بتوان یکی از دلایل اصلی در عدم کنترل ROS و در نتیجه تسریع مرگ سلولی در حضور GA دانست (Kuo et al., 1996).

(AsA) به منو دهیدرو آسکوربات (MDHA) انجام می‌شود. این ماده نیز متعاقباً به AsA و دهیدرو آسکوربات (DHA) تبدیل می‌شود. آنزیم‌های MDHA ردوکتاز (MDHAR) و DHA ردوکتاز (DHAR) احیای MDHA و DHA و تبدیل آن به AsA را کاتالیز می‌کنند. آنزیم GR فرم اکسید شده گلوکاتینون (GSSG) را به فرم احیائی آن (GSH) تبدیل می‌کند. در بذر جو تا کنون دو ژن کد کننده Apx شناسایی شده است. آنالیز بیان ژن با استفاده از RT-PCR نشان داد رونوشت برای هر دو ژن Apx1 و Apx2 در جنین بالغ و در حال جوانه زنی وجود دارد و مقدار آنها با پیشرفت مراحل جوانه زنی افزایش یافت. با این حال مطالعه در سطح پروتئین با استفاده از ژل دو بعدی و اسپکترومتری جرمی منجر به تشخیص هیچکدام از دو ایزوفرم Apx1 و Apx2 در پروتئین محلول کل استخراج شده از بذره‌های بالغ نشد. در هنگام جوانه زنی پس از ۲۴ ساعت در جنین بذره‌های در حال جوانه زنی Apx1 در ژل دو بعدی مشاهده شد و مقدار آن در طول جوانه زنی افزایش یافت (Jones., 1969). ایزوفرم Apx2 در ژل دو بعدی ران شده با پروتئین استخراج شده از جنین در مراحل مختلف جوانه زنی مشاهده نشد. در مطالعه حاضر وجود رونوشت های هر دو ژن Apx1 و Apx2 در لایه آلرون نشان می‌دهد که هر دو ایزوفرم در لایه آلرون در کنترل ROS درگیر می‌باشند. با این حال بررسی در سطح پروتئین ضروری به نظر می‌رسد. با توجه با اینکه سطح بیان این دو ژن در لایه های آلرون تیمار شده با هورمونهای GA، ABA و SA نسبت به کنترل تغییری نکرد به نظر می‌رسد بیان این دو ژن توسط هیچ یک از هورمونهای GA، ABA و SA در لایه آلرون در سطح روتویسی تنظیم

منابع:

- cells. Journal of Experimental Botany. 53: 1273-1282.
- Finnie, C., Andersen, B. Shahpiri, A. and Svensson, B. (2011) Proteomes of the barley aleurone layer: a model system for plant signalling and protein secretion. Proteomics 11: 1595-1605.
- Ho, T. H. D., Gomez-Cadenas, A., Zentella, R. and Casaretto, J. (2003) Crosstalk between gibberellin and abscisic acid in cereal aleurone layer. Plant Growth Regulation 22: 185-194.
- Ishibashi, Y. (2012) Role of ROS on GA/ABA signaling in aleurone cells. Plant Physiology 158: 1705-1714.
- Bethke, P., Lonsdale, J. E., Fath, A. and Jones, R. L. (1999) Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone cells. Plant Cell 11: 1033-1046.
- Bonsager, B. C., Shahpiri, A. Finnie, C. and Svensson, B. (2010) Proteomic and activity profiles of ascorbate-glutathione cycle enzymes in germinating barley embryo. Phytochemistry 71: 1650-1655.
- Fath, A., Bethke, P., Beligni, V. and Jones, R. (2002) Active oxygen and cell death in cereal aleurone

- Olsen, O. A. (2001) Endosperm development: Cellularization and cell fate specification. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 233–267.
- Ritchie, S., Swanson S. J. and Gilroy, S. (2000) Physiology of the aleurone and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. *Seed Science Research* 10: 193-222.
- Rock, C. (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* 148: 357–396.
- Zentella, R., Yamauchi, D. and Ho, T. D. (2002) Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells. *Plant Cell* 14: 2289–2301.
- Jones, R. L. (1969) The structure of barley aleurone cells. *Planta* 85: 359-374.
- Kuo, A., Cappelluti, S., Cervantes, M., Rodriguez, M. and Bush, D. S. (1996) Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell* 8: 259–269.
- Leung, J. and Giraudat, J. (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology* 49: 199–222.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and VanBreusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends. Plant Science* 9: 490–498.
- Mohanty, N. (2003) Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of flag leaf and the grain yield in two cultivars of *Triticum aestivum* (L.) exposed to warmer growth conditions. *Journal of Plant Physiology* 160: 71-74.