

نجات گیاهان موتانت آرابیدوپسیس *old3-1* از مرگ سلولی زودرس در شرایط روز کوتاهی

مریم رجبی فرشمی، مهدی یاراحمدی، رضا شیرزادیان خرم‌آباد*، علی اعلمی، امین عابدی و

محمدحسین رضادوست

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۲/۰۵)

چکیده

گیاهان موتانت (*old3-1* (onset of leaf death 3-1) دارای یک جهش نقطه‌ای در ژن *AT4GI4880* هستند، این ژن کدکننده آنزیم سیستئین سنتاز سیتوسولی (OASTL-A1) است. سیستئین یک ترکیب آلی گوگرددار و پیش‌ساز ترکیبات دفاعی است. آنزیم OASTL-A1 (سیستئین سنتاز) در آخرین مرحله سنتز سیستئین نقش دارد. جهش *old3-1* موجب تغییر در ساختار و فعالیت این شده و گیاهان موتانت *old3-1* در شرایط روزبلندی و 21°C بعد از ۱۴ روز دچار مرگ سلولی زودرس می‌شوند. در این تحقیق موتانت *old3-1* در شرایط روز کوتاهی و دمای 21°C با گیاهان موتانت *B40-12*، *old3-2* و گیاهان مادری *Ler-0*، *Col-0* مورد مقایسه قرار گرفت. براساس نتایج فنوتیپی و فیزیولوژیکی، گیاهان *old3-1* دچار مرگ سلولی زودرس نشدند نجات یافتند و مراحل مختلف رشد و نمو تا گلدهی و تولید بذر را طی نمودند. بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در شرایط روز کوتاهی نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم‌ها در برگ‌های *old3-1* بیشتر از *Ler-0* و *B40-12* است، یعنی در روز کوتاهی فعالیت آنزیم‌ها افزایش یافت. بررسی بیان نسبی ژن‌های نشانگر سیستم ایمنی شامل *PR1* و *GST1*، *DEFL* در گیاهچه‌های *old3-1* و *Ler-0* ۲۲ روزه (روز کوتاهی و 21°C) و سپس انتقال یافته به روز بلندی نشان داد که بیان ژن‌های فوق در روز کوتاهی با افزایش قابل توجه‌ای همراه بوده و افزایش بیان این ژن‌ها احتمالاً موجب افزایش زنده‌مانی گیاهان موتانت *old3-1* شده است. براساس نتایج به دست آمده روز کوتاهی موجب بهبود وضعیت رشد و نمو و نجات گیاهچه‌های *old3-1* از مرگ سلولی زودرس می‌شود.

کلمات کلیدی: آرابیدوپسیس، روز کوتاهی، مرگ سلولی، موتانت *old3-1*

مقدمه

سلول (Cell Senescence) است (Holbrook *et al.*, 1996). پیری سلول در واقع توقف چرخه سلولی پایدار و برگشت‌ناپذیر است که در پاسخ به تنش‌های مختلف از جمله تنش اکسیداتیو ایجاد می‌شود (Kuilman *et al.*, 2010). تحت چنین شرایطی بیان ژن‌های (Senescence-Associated Gene) SAG افزایش می‌یابد (He *et al.*, 2001). ژن‌های SAG به‌عنوان

مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (PCD, Programmed Cell Death) یا آپوپتوزیس (Apoptosis) در گیاهان در انتهای دوره رشد و نمو، واکنش‌های دفاعی و همچنین زمانی که گیاه در شرایط نامطلوب قرار گیرد رخ می‌دهد (Valandro *et al.*, 2020). مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده پیامد اصلی فرایند پیری

گیاهان موتانت (*old3-1* (onset of leaf death 3-1) دارای یک جهش نقطه‌ای در ژن *AT4G14880* هستند. نتایج توالی‌یابی ژن *OLD3* در گیاهان موتانت *old3-1* نشان داد که نوکلئوتید G با A در ژن *AT4G14880* جایگزین شده و مکان ژنی آن روی کروموزوم شماره چهار قرار دارد. این جایگزینی منجر به تبدیل آمینواسید GLY به GLU می‌شود (Shirzadian-Khorramabad *et al.*, 2010). جهش نقطه‌ای *old3-1* در ژن *OLD3* به‌وسیله موتاژن EMS (Ethyl methane sulfonate) در گیاه مادری *Ler-0* به‌صورت یک جهش با غالبیت ناقص ایجاد شده است (Jing *et al.*, 2002). ژن *OLD3* کدکننده آنزیم سیستئین سنتاز سیتوسولی ((O-acetylserin (Thiol) OASTL-A1 = Iyase) است (Dominguez-solis *et al.*, 2004). سیستئین سنتاز از جمله پروتئین‌های حفاظت‌شده در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها است که آخرین مرحله بیوسنتز سیستئین را کاتالیز می‌کند (Wirtz and Hell, 2006). سیستئین یک ترکیب آلی گوگرددار و پیش‌ساز ترکیبات دفاعی است که در مقابله با تنش نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. سیستئین عامل اصلی کنترل بیوسنتز گلوکوتایون و فیتوکلاتین‌ها است. گلوکوتایون و سایر ترکیبات گوگرددار ثانویه در مهار رادیکال‌های آزاد و لذا در پاسخ گیاهان به تنش‌ها نقش دارند (Cobbett, 2000; Meyer and Hell, 2005). جهش *old3-1* موجب تغییر در ساختار و فعالیت آنزیم سیستئین سنتاز شده و مانع اتصال کوفاکتور PLP (pyridoxal 5'-phosphate) به آنزیم فوق می‌شود. از آنجایی که آنزیم *OLD3* نقشی اساسی در تولید سیستئین و ایجاد مقاومت نسبت به فلزات سنگینی مانند کادمیوم دارد، آنزیم موتانت *old3-1* نمی‌تواند واکنش لازم را داشته باشد و گیاهان موتانت *old3-1* نسبت به فلزات سنگین دارای حساسیت بیشتری بوده که در نهایت منجر به مرگ سلولی زودرس گیاهان می‌شود (Shirzadian-Khorramabad *et al.*, 2010). این مرگ سلولی که به‌صورت زردشدن برگ‌ها نمایان می‌شود در گیاهچه‌های هموزیگوس *old3-1* در شرایط رشدی روزبلندی و ۲۱°C، ۱۴ روز پس از رشد شروع می‌شود و همراه با کم‌شدن سریع محتوای کلروفیل و افزایش نشت

ژن‌های نشانگر پیشرفت پیری و سیستم دفاعی عمل می‌کنند. در بین *SAG*ها ژن‌هایی وجود دارند که پروتئین‌هایی مانند پروتئاز، لیپاز، RNase، پروتئین‌های دخیل در حرکت مواد مغذی، انتقال‌دهنده‌ها، فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های مربوط به ترجمه و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را کد می‌کنند (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Gan, 2003). ژن *CPR5* که در فرایندهای متعدد رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی درگیر است نیز ژن تنظیم‌کننده پیری است (Jing *et al.*, 2007).

تنش‌های زیستی و غیرزیستی عموماً منجر به افزایش میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS, Reactive Oxygen Species) می‌شوند (Raikhel, 1992). گونه‌های فعال اکسیژن محصولات جانبی اجتناب‌ناپذیر فرایندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی ضروری سلول هستند (Davies, 1995). گیاهان شبکه‌های ژنی پیچیده‌ای برای تولید و مهار گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد کرده‌اند. گونه‌های فعال اکسیژن از طریق آسیب اکسیداتیو و یا فعالیت به‌عنوان یک سیگنال مولکولی تأثیر مستقیمی بر فعالیت سلول دارند (Mittler, 2002). بر هم خوردن حالت تعادل بین تولید و تخریب گونه‌های فعال اکسیژن تنش اکسیداتیو نامیده می‌شود (Wang *et al.*, 2005). ژن‌های *GST1*, *DEFL* و *PR1* از جمله ژن‌های نشانگر تنش اکسیداتیو هستند. ژنوم‌های گیاهی حاوی چند صد ژن شبه *DEFL* (defensing-like) هستند. *DEFL*ها دسته‌ای قدیمی و متنوع از پروتئین‌های کوچک، غنی از سیستئین و ضد میکروبی هستند که در گیاهان، حشرات و پستانداران یافت می‌شوند (Silverstein *et al.*, 2005). *(Glutathione S-transferase 1)*. از جمله اعضای مهم خانواده *GST* محسوب می‌شود که افزایش فعالیت آن در واکنش تنش اکسیداتیو به اثبات رسیده است (Love *et al.*, 2005). در گیاهان پروتئین *PR1* (Pathogenesis-Related 1) به‌عنوان یک پروتئین دفاعی مهم در نظر گرفته می‌شود. تولید و انباشت پروتئین‌های *PR* در گیاهان یکی از پاسخ‌های مهم به چندین تنش زیستی و غیرزیستی است (Seo *et al.*, 2008).

گیاهچه‌های موتانت (*old3-2*, *old3-1* و *B40-12*) و مادری (*Ler-0* و *Col-0*) و بیان نسبی ژن‌های مارکر سیستم ایمنی (*PR1* و *GST1*, *DEFL*) در گیاهچه‌های موتانت *old3-1* و مادری *Ler-0* مورد بررسی و آزمایش قرار گرفت. نتایج فوق می‌تواند به درک نحوه عملکرد ژن *OLD3* کمک کند.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از بذور مادری (*Landsberg erecta*) *Ler-0* و (*Columbia*) *Col-0* و موتانت‌های [*onset of leaf death3-1*] (*old3-1*) (*Shirzadian et al., 2010*) و [*onset of leaf death3-2*] (*old3-2*) (*Shirzadian et al., 2010*) و [*B40-12*] (*B40-12*) (*Tahir et al., 2013*) استفاده و گیاهچه‌ها تحت شرایط نوری روزکوتاهی (۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی) و دمای $21/5^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند. در موتانت *old3-1* جهش نقطه‌ای در ژن *AT4G14880* گیاه مادری *Ler-0* و موتانت *old3-2* حاوی یک قطعه T-DNA در ژن *AT4G14880* در گیاه مادری *Col-0* است (*Shirzadian-Khorramabad et al., 2010*). ژن *AT4G14880* کدکننده سیستمین سنتاز سیتوسولی ($OLD3 =$) (*Dominguez-solis et al., 2004*) است (*OASTL-A1* موتانت (*old3-1 mutant + RNAi RPP1-like R genes line*) در واقع همان گیاهان موتانت *old3-1* هستند که با روش RNAi ژن‌های گروه *RPP1-like R* خاموش شده است. در ابتدا به منظور شکستن خواب بذور و جوانه‌زنی یکنواخت، بذور مادری و موتانت به مدت سه روز (۷۲ ساعت) درون آب مقطر در دمای 4°C و تاریکی مطلق نگهداری شدند. سپس درون هر گلدان حاوی ترکیب خاکی مورد نیاز آراییدوپسیس (۳۲ درصد ورمی کولیت، ۳۴ درصد پیت‌ماس، ۱۱ درصد ورمی کمپوست و ۲۳ درصد پرلیت) حدود ۱۰ بذر با استفاده از سمپلر ۱۰۰۰ کشت شد.

بررسی برخی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: به منظور انجام آزمایش‌های مورفولوژیکی (وزن تر و طول کامل گیاهچه)، فیزیولوژیکی (محتوای کلروفیل و میزان نشت یونی) و بیوشیمیایی (فعالیت آنزیم کاتالاز و

یونی ادامه و با مرگ کامل گیاه بعد از سه هفته خاتمه می‌یابد (*Shirzadian-Khorramabad et al., 2010*). گیاهچه‌های موتانت *old3-1* با رشد در دمای 28°C رشد نرمال خود را بدست می‌آورند و لذا مرگ سلولی زودرس در گیاهچه‌های *old3-1* وابسته به دما بوده و چنانچه گیاهچه در هر مرحله رشدی به دمای 21°C انتقال یابد دچار مرگ سلولی می‌شود (*Shirzadian-Khorramabad et al., 2010*). با توجه به مشاهدات نوروزی و همکاران (۱۳۹۳) تغییر دما از 21°C به 28°C موجب افزایش قابل ملاحظه‌ای در رشد طولی گیاهچه‌ها، وزن تر و سرعت جوانه‌زنی شد که این افزایش برای گیاهچه‌های *old3-1* چشم‌گیر بود. همچنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و بیان نسبی ژن‌های *DEFL* و *GST1* در 28°C در برگ گیاهان موتانت *old3-1* بیشتر از برگ‌های مادری بود. زمانی که موتانت *old3-1* تحت شرایط روز کوتاهی و دمای 21°C رشد می‌کند اتونکروز کاهش می‌یابد. بنابراین هم دما و هم طول روز می‌تواند شروع نکروز و مرگ برگ را در موتانت *old3-1* به تأخیر اندازد (*Tahir et al., 2013*). مرگ سلولی در گیاهان *old3* ارتباط بسیار نزدیکی با زمینه ژنتیکی گیاه دارد. فنوتیپ کشنده ایجادشده در گیاهان *old3-1* در اثر جهش ایجاد شده در ژن *OLD3* در زمینه ژنتیکی *Ler-0* صورت گرفت و انتقال ژن موتانت *old3-1* به گیاهانی که دارای زمینه ژنوتیپی *Col-0* هستند مثل *old3-2* مرگ سلولی رخ نمی‌دهد. مطالعاتی بعدی نشان داد که وجود یک ناحیه ژنی منحصر به فرد به نام (*old3-1 determinate*) ODD در کنار ژن هموزیگوس *old3* در اکوتیپ‌های با زمینه ژنتیکی *Ler-0* منجر به مرگ سلولی بعد از ۱۴ روز در دمای 21°C می‌شود. به نظر می‌رسد که ژن‌های ناحیه ODD در *Ler-0* متفاوت با این ژن‌ها در *Col-0* باشند (*Shirzadian-Khorramabad et al., 2010*).

در این تحقیق به منظور بررسی تأثیر شرایط نوری روزکوتاهی (۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی) بر نجات گیاهچه‌های موتانت *old3-1* از مرگ سلولی زودرس، برخی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

در لوله‌های آزمایش درب‌دار حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استریل قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۱۰۰ rpm و دمای اتاق 25°C نگهداری شدند. بعد از گذشت این زمان هدایت الکتریکی توسط دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در آون با دمای 120°C قرار داده شدند. بعد از سرد شدن نمونه‌ها برای دومین مرتبه هدایت الکتریکی محلول حاوی دیسک‌های برگی سنجیده شد. برای به دست آوردن مقدار نشت یونی از رابطه $EL=EC1/EC2 \times 100$ استفاده گردید.

به‌منظور سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل آسکوربات پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT)، ابتدا استخراج عصاره آنزیمی بر مبنای روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) انجام گرفت. بدین صورت که ابتدا نیم میلی‌گرم از برگ‌های فریز شده با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی به خوبی پودر شدند و سپس به تیوپ ۲ میلی‌لیتری منتقل و به آن‌ها یک میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه و ورتکس گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰ rpm در دمای 4°C سانتریفیوژ شدند. عصاره رویی توسط سمپلر برداشته و به تیوپ‌های یک و نیم میلی‌لیتری منتقل شد و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰ rpm در دمای 4°C سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، عصاره رویی با سمپلر برداشته و به میکروتیوپ‌هایی با همان حجم منتقل شد. سپس جهت سنجش فعالیت سینتیک آنزیم پراکسیداز از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) و به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) با اندکی تغییرات استفاده گردید.

استخراج RNA و بررسی بیان نسبی ژن‌ها: جهت مطالعه میزان بیان نسبی ژن‌های مورد نظر، ابتدا نمونه‌برداری از برگ گیاهچه‌های موتانت *old3-1* و مادری *Ler-0* رشد یافته در دو شرایط (۱) رشد به مدت ۲۲ روز در شرایط روزکوتاهی 21°C (۲۲) و (۲) ۱۸ روز رشد در شرایط روزکوتاهی 21°C و سپس چهار روز رشد در روز بلندی 21°C (۴+۱۸)، صورت گرفت. سپس استخراج RNA مطابق با پروتکل کیت RNX-Plus™

پراکسیداز)، گیاهچه‌ها به مدت ۳۵ روز در شرایط نوری روز کوتاهی و دمای 21°C رشد یافتند و سپس از آنها جهت انجام آزمایشات ذکر شده نمونه‌برداری شد. این آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 انجام و نتایج آن توسط آزمون مقایسه میانگین LSD مورد ارزیابی قرار گرفت و جهت ترسیم نمودارهای مربوطه و نرمال‌سازی داده‌ها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد.

جهت بررسی صفت وزن تر کل از هر ژنوتیپ موتانت و مادری رشد یافته در شرایط روزکوتاهی، پنج تکرار انتخاب و به‌وسیله ترازو با دقت 0.0001 اندازه‌گیری شد. جهت بررسی طول کامل گیاهچه‌ها اندازه‌گیری از نوک ساقه تا انتهای ریشه انجام شد.

بررسی میزان محتوای کلروفیل موجود در برگ گیاهچه‌های ۳۵ روزه موتانت و مادری رشد یافته در شرایط روزکوتاهی به روش Arnon (۱۹۴۹) انجام شد. بدین منظور ابتدا نیم میلی‌گرم از ماده تر گیاهی در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع به خوبی خرد و له شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به نمونه اضافه و در سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. عصاره جدا شده فوقانی به بالن شیشه‌ای منتقل گردید. سپس مقداری از محلول داخل بالن به کووت اسپکتروفتومتر منتقل و در طول موج ۶۶۳ برای کلروفیل *a* خوانده گردید و در نهایت میزان کلروفیل *a* بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه با استفاده از فرمول $Chlorophyll\ a = (193 \times A_{663} - 0.8 \times A_{645}) \times V / 100W$ محاسبه شد. در این فرمول A: جذب نور در طول موج ۶۶۳، V: حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ) و W: وزن تر نمونه بر حسب میلی‌گرم است.

آزمایش نشت یونی برای اندازه‌گیری مقدار نفوذپذیری غشا سلولی انجام می‌شود. اندازه‌گیری نشت یونی براساس روش Lutts و همکاران (۱۹۹۶) صورت گرفت. ابتدا ۲ میلی‌گرم دیسک برگی تهیه و برای برطرف شدن آلودگی‌های سطح برگ سه مرتبه با آب دو بار تقطیر شستشو شدند. سپس

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Real Time PCR.

| نام پرایمر | توالی پرایمر (۵'-۳') | طول محصول (bp) | طول پرایمر (bp) | دمای اتصال (°C) |
|------------------------------------|------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| (AT2G14610) <i>PRI</i> -Forward | 5'- GTTCACAACCAGGCACGAG -3' | 205 | 19 | 55°C |
| <i>PRI</i> -Reverse | 5'- CCTTCTCGCTAACCCACATG -3' | 205 | 20 | 55°C |
| (AT2G43510) <i>DEFL</i> -Forward | 5'- CTTAGTCATTTCGATGTG -3' | 160 | 19 | 56°C |
| <i>DEFL</i> -Reverse | 5'- GCATCTTCCACCTTTAGCTC -3' | 160 | 20 | 56°C |
| (AT1G02930) <i>GST1</i> -Forward | 5'-AAGAGCCTTTCATCCTTCGC-3' | 153 | 20 | 54°C |
| <i>GST1</i> -Reverse | 5'-CCATGTCCTTGCCAGTTGAG-3' | 153 | 20 | 54°C |
| (AT3G18780) <i>ACTIN2</i> -Forward | 5'-CTTGTTCCAGCCCTCGTTTG-3' | 149 | 20 | 54°C |
| <i>ACTIN2</i> -Reverse | 5'-CGATACCTGAGAACATAGTGG-3' | 149 | 21 | 54°C |

نتایج و بحث

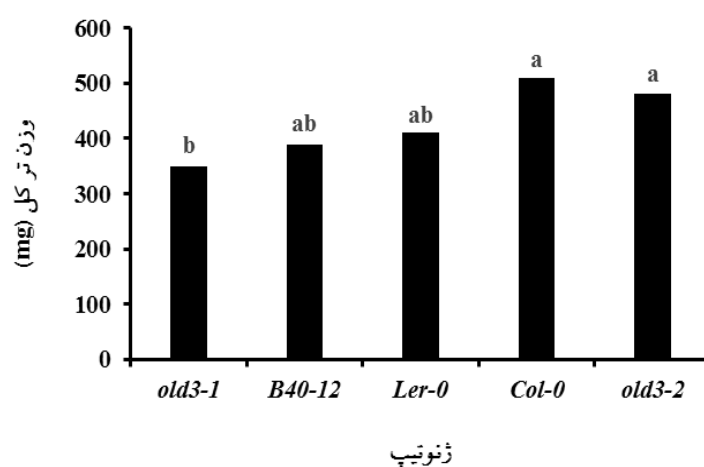
بررسی برخی صفات مورفولوژیکی: از جمله خصوصیتی که پس از تنش در گیاه تحت تأثیر قرار می‌گیرد، وزن گیاه است. تنش‌های محیطی بر میزان آب درون سلول‌ها اثر گذاشته و باعث از دست رفتن قسمت اعظمی از وزن گیاه می‌شوند. در واقع کاهش وزن به علت اختلال در متابولیسم کلی سلول است (Toppi and Gabbrielli, 1999). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های وزن تر کل در روزکوتاهی و دمای ۲۱°C حاکی از اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های *old3-1*، *old3-2*، *B40-12*، *Ler-0* و *Col-0* در سطح یک درصد است (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، میزان وزن تر کل در گیاهچه‌های موتانت *old3-1* تفاوت معنی‌داری با *Ler-0* و *B40-12* ندارد. میانگین وزن تر کل گیاهچه‌های پنج هفته‌ای *old3-1*، *B40-12* و *Ler-0* به ترتیب ۳۵۰، ۳۹۰ و ۴۱۰ میلی‌گرم است. لذا گیاهان موتانت *old3-1* در شرایط روز کوتاهی دارای رشد قابل ملاحظه‌ای بوده و تفاوت آن‌ها با گیاهان مادری *Ler-0* معنی‌دار نیست (شکل ۲). این بدان معنی است که شرایط روزکوتاهی توانسته گیاهان موتانت *old3-1* را از مرگ سلولی نجات بخشد و رشد و نمو آن‌ها را به حد گیاهان مادری برساند. این در حالی است که گیاهان *old3-1* در شرایط روزبلندی در مقایسه با گیاهان *Ler-0* دارای رشد بسیار محدودی بوده و پس از ۱۴ روز دچار مرگ سلولی شده و از

شرکت سازنده (سینا کلون) انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت و تأیید شد. سپس به وسیله آنزیم DNase1 (شرکت سینا کلون) آلودگی احتمالی DNA در RNA استخراج شده حذف شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthase ساخت شرکت سینا کلون انجام شد. صحت cDNA سنتز شده با پرایمر اکتین ارزیابی و تأیید شد. جهت انجام Real Time PCR، پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) با استفاده از سایت‌های OligoAnalyser، Primer3 و NCBI BLAST طراحی و اختصاصی بودنشان تأیید و سپس جهت ساخت به شرکت سینا کلون سفارش داده شد. هر واکنش تکثیر Real Time PCR حاوی ۶/۴۵ میکرولیتر MasterMix (SinaSYBRBlue)، ۰/۳ پرایمر رفت و ۰/۳ پرایمر برگشت ژن‌های *DEFL*، *PRI*، *GST1* و *Actin2*، ۱ میکرولیتر cDNA بود و با ۴/۴۵ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز به حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده می‌شود. از ژن خانه دار *Actin2* جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. دستگاه Roche Light Cycler 96 جهت انجام واکنش تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. برنامه PCR در این واکنش بدین صورت اعمال شد: 95°C- 5min, 95°C- 25s, (54,55,56)°C-25s, 72°C-30s)×39. جهت تجزیه و نرمال‌سازی داده‌ها از نرم‌افزار Excel و برای کمی‌سازی نسبی از معادله لیواک ($2^{-\Delta\Delta CT}$) استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001).

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک در گیاهچه‌های موتانت (*old3-1*, *old3-2* و *B40-12*) و مادری (*Ler-0*) و *Col-0* در شرایط روز کوتاهی ۲۱/۵°C.

| منابع تغییر | درجه آزادی | طول ریشه | وزن اندام‌های هوایی | وزن تر کل | کلروفیل a | نشت یونی |
|-------------|------------|----------|---------------------|-----------|----------------------|----------|
| ژنوتیپ | ۴ | ۲۴/۷** | ۰/۰۱۶** | ۰/۰۱۹** | ۰/۰۰۲۵ ^{ns} | ۱۱۸/۰۹** |
| خطا | ۱۰ | ۱/۳۸** | ۰/۰۰۲** | ۰/۰۰۲** | ۰/۰۰۰۴ | ۶۴/۵۲ |
| %CV | | ۹/۰۹ | ۱۰/۸۳ | ۱۰/۶ | ۱۳/۳۶ | ۱۹/۳ |

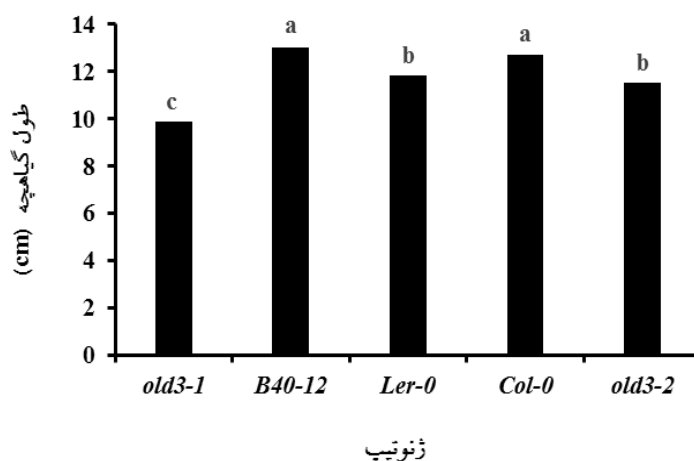
^{ns}، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪.



شکل ۱- مقایسه وزن تر گیاهچه‌های ۳۵ روزه موتانت (*old3-1*, *old3-2* و *B40-12*) و مادری (*Ler-0* و *Col-0*). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میانگین‌های مقایسه‌شده بر اساس روش LSD ($P \leq 0/05$) است.



شکل ۲- مقایسه اندام‌های هوایی گیاهچه‌های موتانت ۳۵ روزه *old3-1* و *B40-12* و مادری *Ler-0* آراییدوپسیس در شرایط روز کوتاهی. مقیاس در شکل فوق، ۲ سانتی‌متر است.



شکل ۳- مقایسه طول گیاهچه‌های ۳۵ روزه موتانت (*old3-1*، *old3-2* و *B40-12*) و مادری (*Ler-0* و *Col-0*). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میانگین‌های مقایسه‌شده براساس روش LSD ($P \leq 0/05$) است.

لحاظ این صفت در مقایسه با ژنوتیپ مادری *Ler-0* و موتانت *old3-1* است. میانگین طول گیاهچه موتانت *B40-12* برابر با ۱۳ سانتی‌متر است که در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها بیشترین میانگین در این صفت را دارد.

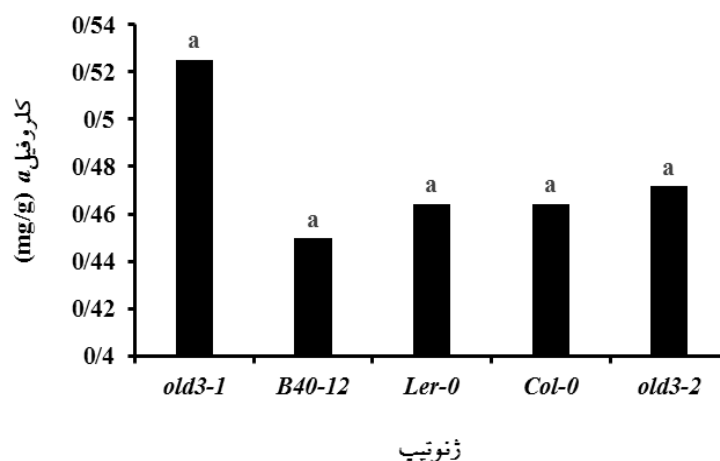
بررسی برخی صفات فیزیولوژیکی: از جمله علایم بروز تنش در گیاهان کاهش محتوای کلروفیل و نفوذپذیری غشا هستند که منجر به کاهش فتوسنتز و در نتیجه رشد گیاه می‌شوند (Tompson *et al.*, 1987). تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین پنج ژنوتیپ مورد بررسی از لحاظ میزان محتوای کلروفیل *a* در شرایط رشدی مشابه است (جدول ۲). میزان محتوای کلروفیل در موتانت *old3-1* برابر با ۰/۵۲۵ و در ژنوتیپ مادری *Ler-0* برابر ۰/۴۶۴ میلی‌گرم بر گرم است (شکل ۵). محتوای کلروفیل در *old3-1* به میزان اندکی (۰/۰۶۱ میلی‌گرم بر گرم) بیشتر از *Ler-0* است. بیشترین و کمترین میزان محتوای کلروفیل به ترتیب مربوط به موتانت *old3-1* و موتانت *B40-12* (۰/۴۵ میلی‌گرم بر گرم) است. میزان محتوای کلروفیل در *Col-0* و *old3-2* به ترتیب ۰/۴۶۴ و ۰/۴۷۲ میلی‌گرم بر گرم است. در این آزمایش میزان محتوای کلروفیل *a* بیشتری در گیاهان موتانت نسبت به مادری مشاهده شد که نکته قابل توجه‌ای است. نتایج دلالت بر نجات گیاهان *old3-1* از مرگ سلولی در شرایط روز کوتاهی دارد.

بین می‌روند (Shirzadian-Khorramabad *et al.*, 2010). میزان وزن تر کل در ژنوتیپ‌های *Col-0* و *old3-2* نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بیشتر است که نشان‌دهنده آن است که گیاهان با پس زمینه ژنتیکی *Col-0* از لحاظ این صفت دارای برتری هستند. میانگین وزن تر کل در *Col-0* و *old3-2* به ترتیب ۵۱۰ و ۴۸۰ میلی‌گرم است که با اختلاف کمی رقم مادری بیشتر از موتانت است.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری طول کامل گیاهان حاکی از تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0/01$) بین ژنوتیپ‌ها در شرایط رشدی مشابه (روزکوتاهی، 21°C) است (جدول ۲). همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود (شکل ۳)، میانگین طولی گیاهچه‌های پنج هفته‌ای ژنوتیپ موتانت *old3-1* و ژنوتیپ مادری *Ler-0* به ترتیب ۹/۸۶ و ۱۱/۸۲ سانتی‌متر می‌باشد (شکل ۴). میانگین طول گیاهچه‌ها در *old3-1* به میزان ۱/۹۶ سانتی‌متر و کمتر از *Ler-0* است، در حالیکه گیاهان موتانت *old3-1* در شرایط روزبلندی نمی‌توانند به این میزان از رشد برسند و دارای سرعت رشد کندتر و تفاوت طول بیشتری نسبت به گیاهان مادری *Ler-0* هستند. (Shirzadian-Khorramabad *et al.*, 2010). میانگین طول گیاهچه در ژنوتیپ مادری *Col-0* (۱۲/۷۲) و موتانت *old3-2* (۱۱/۵۱) بوده که حاکی از برتری گیاهان با پس زمینه ژنتیکی *Col-0* از



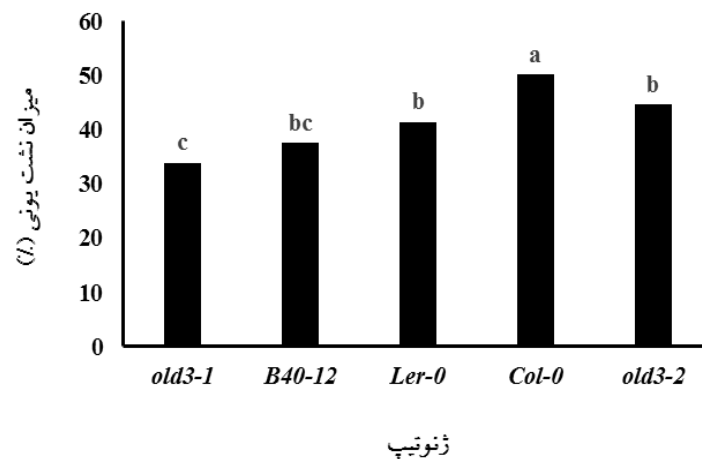
شکل ۴- مقایسه طول گیاهچه‌های ۳۵ روزه موتانت *old3-1* و *B40-12* و مادری *Ler-0* آرابیدوپسیس. مقیاس در شکل فوق ۱ سانتی‌متر است.



شکل ۵- مقایسه میزان کلروفیل *a* در برگ گیاهچه‌های ۳۵ روزه موتانت (*old3-1*، *old3-2* و *B40-12*) و مادری (*Ler-0* و *Col-0*) آرابیدوپسیس. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار میانگین‌های مقایسه‌شده براساس روش LSD ($P \leq 0/05$) است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود روز کوتاهی موجب افزایش قابلیت و توانایی رشد گیاهان موتانت *old3-1* نسبت به ژنوتیپ مادری *Ler-0* شده است. در مجموع می‌توان گفت در روز کوتاهی میزان تأثیر موتاسیون *old3-1* تا حد زیادی می‌تواند به فرم مادری نزدیک شود. تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/01$) بین ژنوتیپ‌ها از نظر میزان نشت یونی در شرایط روزکوتاهی و دمای 21°C است (جدول ۲). همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود (شکل ۶)؛ بیشترین و کمترین میزان نشت یونی به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ مادری *Col-0* (۵۰/۱۱ درصد) و ژنوتیپ موتانت *old3-1* (۳۳/۹ درصد) است. میزان نشت یونی در ژنوتیپ‌های *old3-2*، *Ler-0* و *B40-12* به‌ترتیب ۴۴/۵۸، ۴۱/۴۵ و ۳۷/۴۸ درصد است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد موتانت *old3-1*

همان‌طور که مشاهده می‌شود روز کوتاهی موجب افزایش قابلیت و توانایی رشد گیاهان موتانت *old3-1* نسبت به ژنوتیپ مادری *Ler-0* شده است. در مجموع می‌توان گفت در روز کوتاهی میزان تأثیر موتاسیون *old3-1* تا حد زیادی می‌تواند به فرم مادری نزدیک شود. تخریب غشا و افزایش نشت یونی از جمله علایم تنش و پیری برگ است. افزایش نشت یونی به‌عنوان یکی از علائم وقوع تخریب غشای سلولی می‌تواند فرآیند پیام‌رسانی را تخریب و منجر به از دست‌دادن آب و مرگ سلولی شود



شکل ۶- مقایسه میزان نشت یونی برگ گیاهچه‌های ۳۵ روزه موتانت (*old3-1*, *old3-2* و *B40-12*) و مادری (*Ler-0* و *Col-0*) آرابیدوپسیس. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میانگین‌های مقایسه‌شده براساس روش LSD ($P \leq 0/05$) است.

پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به شمار می‌آید و افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ موتانت *old3-1* نشان‌دهنده افزایش میزان تجمع گروه‌های فعال اکسیژن خصوصاً H_2O_2 نسبت به گیاهان مادری *Ler-0* است. کاتالاز از اصلی‌ترین آنزیم‌های تجزیه‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن است که H_2O_2 موجود در سلول‌های تنش دیده را به آب و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کند (Del et al., 2006). شواهد نشان می‌دهد که بیان و فعالیت کاتالاز همواره با تنش در آرابیدوپسیس فعال می‌شود و این آنزیم برای سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن در طول شرایط تنش ضروری است و افزایش فعالیت این آنزیم باعث مقاومت گیاه در شرایط تنش می‌شود. بنابراین افزایش فعالیت چشمگیر این آنزیم در موتانت *old3-1* حاکی از مقاومت این گیاه در شرایط روزکوتاهی است.

پراکسیداز از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که در سم‌زدایی از گونه‌های فعال اکسیژن دارای نقش حیاتی است. پراکسیداز عمدتاً در سیتوزول یافت شده و عمل کاهش تنش اکسیداتیو را از طریق سم‌زدایی H_2O_2 انجام می‌دهد (Scandalios, 2002) با توجه به نتایج به دست آمده، الگوی کلی فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان موتانت (*old3-1*) و *B40-12*) و مادری (*Ler-0*) تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد دارد (جدول ۳). همان‌طور که در نمودار مشاهده

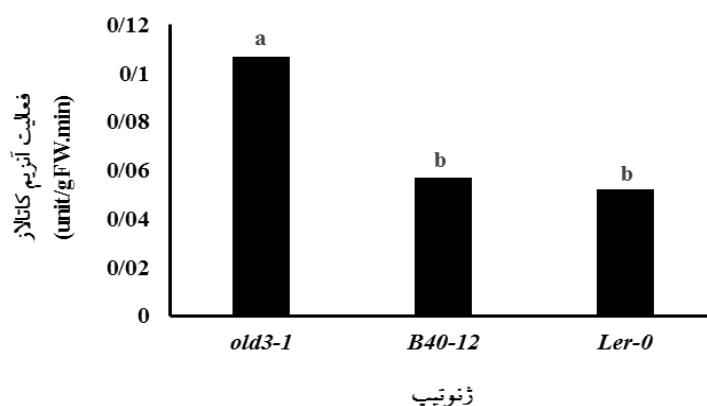
نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها دارای کمترین میزان نشت یونی است و بنابراین بسیار جوان‌تر از ژنوتیپ مادری *Ler-0* است و دیرتر علائم زردشدگی را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه مقدار نشت یونی رابطه عکس با پایداری غشا سلولی دارد می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ موتانت *old3-1* با داشتن نشت یونی کمتر از پایداری غشا سلولی بیشتری برخوردار است. لذا در مجموع می‌توان گفت که موتانت *old3-1* در شرایط رشد مناسب خود قرار گرفته‌است.

بررسی برخی صفات بیوشیمیایی: نتیجه تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی میزان آنزیم کاتالاز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/01$) بین ژنوتیپ‌های موتانت (*old3-1*) و *B40-12*) و مادری (*Ler-0*) در شرایط رشدی مشابه است (جدول ۳). همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود (شکل ۷) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاهچه‌های ۳۵ روزه موتانت *old3-1* بیشتر از مادری *Ler-0* و موتانت *B40-12* است. فعالیت آنزیم کاتالاز در *old3-1* به میزان $0/107 \text{ unit/g Fw.min}$ و در *Ler-0* به میزان $0/052 \text{ unit/g Fw.min}$ است که تقریباً دو برابر (بیشتر است $0/055 \text{ unit/g Fw.min}$) در *B40-12* فعالیت آنزیم فوق به مقدار $0/057 \text{ unit/g Fw.min}$ است که تقریباً برابر با *Ler-0* است. کاتالاز از مهم‌ترین آنزیم‌های جمع‌کننده

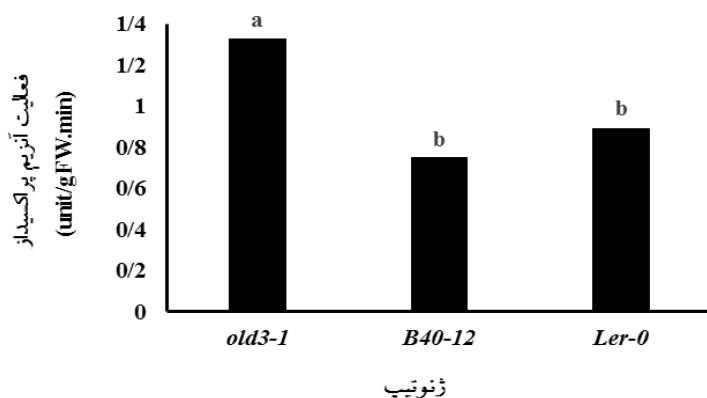
جدول ۳- جدول تجزیه واریانس آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در گیاهچه‌های موتانت (*old3-1* و *B40-12*) و مادری (*Ler-0*) آراییدوپسیس در شرایط روز کوتاهی $21/5^{\circ}\text{C}$.

| منابع تغییر | درجه آزادی | کاتالاز | پراکسیداز |
|-------------|------------|---------|-----------|
| ژنوتیپ | ۲ | ۰/۲۸** | ۰/۲۶۲* |
| خطا | ۶ | ۰/۰۰۰۲۴ | ۰/۰۳ |
| %CV | | ۲۱/۵۹ | ۱۷/۵ |

ns * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪.



شکل ۷- مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاهچه‌های ۳۵ روزه موتانت (*old3-1* و *B40-12*) و مادری (*Ler-0*) آراییدوپسیس. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میانگین‌های مقایسه‌شده براساس روش LSD ($P \leq 0/05$) است.



شکل ۸- مقایسه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ گیاهچه‌های ۳۵ روزه موتانت (*old3-1* و *B40-12*) و مادری (*Ler-0*) آراییدوپسیس. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میانگین‌های مقایسه‌شده براساس روش LSD ($P \leq 0/05$) است.

می‌شود (شکل ۸) فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ *old3-1* بیشتر از *Ler-0* و *B40-12* است. فعالیت آنزیم پراکسیداز در *old3-1* به میزان ۱/۳۳ unit/g Fw.min است. در *Ler-0* فعالیت این آنزیم ۰/۸۹ unit/g Fw.min است که به میزان

old3-1 نسبت به *Ler-0* نصف این میزان در روز بلندی است یعنی روز کوتاهی باعث نزدیک شدن ۵۰ درصدی تغییرات بیان ژن *DEFL* در دو ژنوتیپ شده است. در مجموع بیان ژن *DEFL* در ژنوتیپ *old3-1* در هر دو شرایط روز کوتاهی و انتقال یافته به روز بلندی بیشتر از ژنوتیپ *Ler-0* است و این مسئله می تواند به این دلیل باشد که به طور کلی میزان گونه های فعال اکسیژن گیاهان موتانت بیشتر از گیاهان مادری است. گونه های فعال اکسیژن یکی از انتقال دهنده های پیام تنش به ژن های واکنش گر به تنش های محیطی هستند (Okumuro et al., 1997) و بیان ژن *DEFL* در راستای پاسخ دفاعی به تنش خصوصاً تنش اکسیداتیو در گیاه افزایش می یابد (Shirzadian-Khorramabad et al., 2010).

در مواجهه با استرس های اکسیداتیو القاشده در گیاه، میزان بیان ژن های مرتبط با واکنش های دفاعی افزایش می یابد مانند *GST1 (AT1G02930)* که از جمله ژن های نشانگر در تنش اکسیداتیو است. از این ژن به عنوان ژن مرجع جهت شناسایی گیاه در معرض تنش اکسیداتیو استفاده می شود. با توجه به نمودار (شکل ۱۰) بیان ژن *GST1* در گیاهچه های ۲۲ روزه *old3-1* که تمام دوره رشد خود را در روز کوتاهی گذراندند ۵/۴ برابر بیشتر از *Ler-0* رشد یافته تحت شرایط مشابه است و بیان در *Ler-0* انتقال یافته به روز بلندی (شرایط ۱۸+۴) ۰/۰۹ (۱۰/۸) برابر کمتر از *Ler-0* رشد یافته در شرایط روز کوتاهی است. بیان *GST1* در *Ler-0* انتقال یافته به روز بلندی (شرایط ۱۸+۴) ۰/۵ (۲/۰۳) برابر کمتر از *old3-1* رشد یافته تحت شرایط مشابه است و بیان در *old3-1* رشد یافته در روز کوتاهی ۲۸/۷ برابر بیشتر از ژنوتیپ نظیر انتقال یافته به روز بلندی (۱۸+۴) است.

انتقال از شرایط روز کوتاهی به روز بلندی باعث کاهش بیان *GST1* در هر دو ژنوتیپ مادری و موتانت شده است و در هر دو شرایط رشدی بیان *GST1* در ژنوتیپ موتانت *old3-1* بیشتر از ژنوتیپ مادری *Ler-0* است. موتانت *old3-1* دارای یک جهش نقطه ای در ژن سنتزکننده سیستئین است. سیستئین پیش ساز ترکیبات ثانویه متعددی همچون گلوپتایون است.

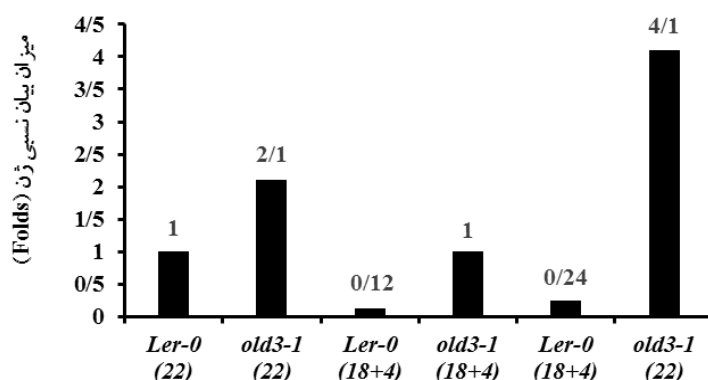
۰/۳۴ unit/g Fw.mi کمتر از *old3-1* است. به همین ترتیب در *B40-12* فعالیت آنزیم فوق به میزان ۰/۷۵ unit/g Fw.min است که نسبت به ژنوتیپ مادری نیز کمتر است. افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در *old3-1* نسبت به *Ler-0* و *B40-12* در نتیجه افزایش میزان تجمع گروه های فعال اکسیژن خصوصاً H_2O_2 رخ می دهد و منجر به افزایش مقاومت گیاهان موتانت *old3-1* در شرایط روز کوتاهی می شود.

بررسی بیان نسبی ژن ها: ژن های *DEFL*، *GST1* و *PR1* از

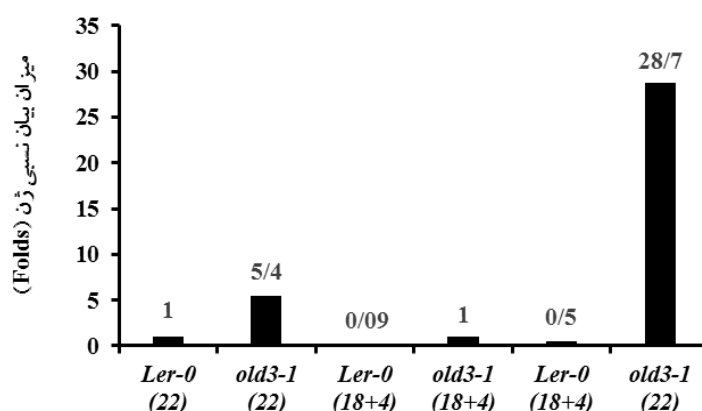
جمله ژن های واکنش گر تنش اکسیداتیو است. زمانی که گیاه در معرض تنش اکسیداتیو قرار می گیرد، بیان این ژن ها افزایش می یابد (Shirzadian-Khorramabad et al., 2010). لذا بیان نسبی این ژن های واکنش گر در گیاهچه های موتانت *old3-1* و مادری *Ler-0* رشد یافته در دو شرایط: حالت اول، ۲۲ روز رشد در روز کوتاهی $21^{\circ}C$ (۲۲) و حالت دوم، ۱۸ روز رشد در روز کوتاهی $21^{\circ}C$ و چهار روز رشد در روز بلندی $21^{\circ}C$ (۴+۱۸) مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به نمودار (شکل ۹)، بیان ژن *(AT2G43510)* *DEFL* در گیاهچه های ۲۲ روزه *old3-1* که تمام دوره رشد خود را در روز کوتاهی گذراندند ۲/۱ برابر بیشتر از *Ler-0* رشد یافته تحت شرایط مشابه است. بیان در گیاهان *Ler-0* انتقال یافته به روز بلندی (شرایط ۱۸+۴) یعنی ۸/۳ برابر کمتر از *Ler-0* رشد یافته در شرایط ۲۲ است. بیان *DEFL* در *Ler-0* انتقال یافته به روز بلندی (شرایط ۱۸+۴) ۰/۲۴ (۴/۲) برابر کمتر از *old3-1* رشد یافته تحت شرایط مشابه است و بیان در *old3-1* رشد یافته در روز کوتاهی ۴/۱ برابر بیشتر از ژنوتیپ نظیر انتقال یافته به روز بلندی است.

انتقال از روز کوتاهی به روز بلندی باعث کاهش بیان *DEFL* در هر دو ژنوتیپ موتانت و مادری شده است و ژن *DEFL* در موتانت *old3-1* همواره دارای میزان بیان بیشتری در مقایسه با ژنوتیپ *Ler-0* در شرایط رشدی مشابه است. تغییر بیان ژن *DEFL* در برابر تغییر طول روز در گیاهان *old3-1* به میزان نصف *Ler-0* بوده است. همان طور که از نتایج استنباط می شود در روز کوتاهی تغییرات بیان *DEFL* در



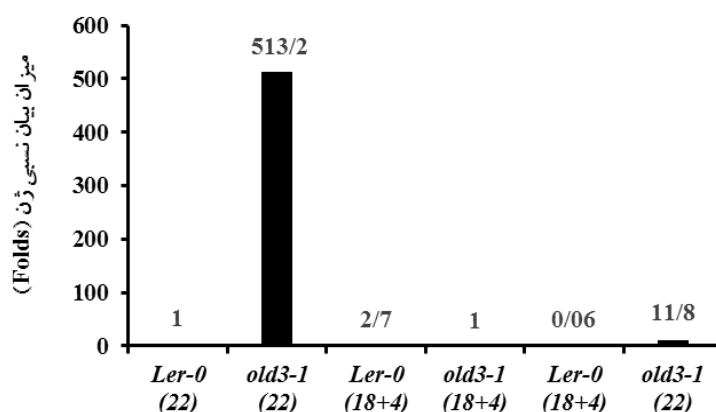
شکل ۹- مقایسه بیان نسبی ژن *DEFL* در گیاهچه‌های موتانت (*old3-1*) و مادری (*Ler-0*) رشد یافته تحت شرایط نوری مشابه و متفاوت (۲۲ روز رشد در روز کوتاهی (۲۲)، ۱۸ روز رشد در روز کوتاهی و ۴ روز رشد در روز بلندی (۱۸+۴)). سمت چپ: مقایسه میزان بیان *old3-1* (۲۲) با *Ler-0* (۲۲) و مقایسه میزان بیان *Ler-0* در دو شرایط نوری (*Ler-0* (۲۲) و *Ler-0* (۱۸+۴)). سمت راست: مقایسه میزان بیان *Ler-0* (۱۸+۴) با *old3-1* (۱۸+۴) و مقایسه *old3-1* (۲۲) با *old3-1* (۱۸+۴)



شکل ۱۰- مقایسه بیان نسبی ژن *GSTI* در گیاهچه‌های موتانت (*old3-1*) و مادری (*Ler-0*) رشد یافته تحت شرایط نوری مشابه و متفاوت (۲۲ روز رشد در روز کوتاهی (۲۲)، ۱۸ روز رشد در روز کوتاهی و ۴ روز رشد در روز بلندی (۱۸+۴)). سمت چپ: مقایسه میزان بیان *old3-1* (۲۲) با *Ler-0* (۲۲) و مقایسه میزان بیان *Ler-0* در دو شرایط نوری (*Ler-0* (۲۲) و *Ler-0* (۱۸+۴)). سمت راست: مقایسه میزان بیان *Ler-0* (۱۸+۴) با *old3-1* (۱۸+۴) و مقایسه *old3-1* (۲۲) با *old3-1* (۱۸+۴)

با انتقال به شرایط روزبلندی تفاوت بیان ژن *GSTI* در دو ژنوتیپ موتانت و مادری کاهش می‌یابد. در مجموع با بررسی میزان فعالیت ژن *GSTI* می‌توان میزان حساسیت ژنوتیپ‌ها به تنش اکسیداتیو را بررسی کرد (Grant et al., 2000). گیاهان *PR1* (*AT2G14610*) به‌عنوان یک پروتئین دفاعی مهم در نظر گرفته می‌شود. اعضای خانواده *PR1* در بین گیاهان به شدت محافظت می‌شود و همولوگ‌های آن در قارچ‌ها،

جهش موجب ناکارآمدی آنزیم سیستئین سنتاز و عدم پاسخ مقابله‌ای مناسب گیاه به تغییرات محیطی می‌شود بنابراین ژنوتیپ موتانت دارای حساسیت بیشتری نسبت به تغییرات محیطی و تنش‌های اکسیداتیو حاصل از آن در مقایسه با ژنوتیپ مادری است. با توجه به اینکه، ژن *GSTI* یکی از ژن‌های مارکر و شاخص در تنش اکسیداتیو است که افزایش بیان آن حاکی از افزایش میزان گروه‌های فعال اکسیژن می‌باشد.



شکل ۱۱- مقایسه بیان نسبی ژن *PR1* در گیاهچه‌های موتانت (*old3-1*) و مادری (*Ler-0*) رشد یافته تحت شرایط نوری مشابه و متفاوت (۱-۲۲ روز رشد در روز کوتاهی (۲۲) ۲-۱۸ روز رشد در روز کوتاهی و ۴ روز رشد در روز بلندی (۱۸+۴)). سمت چپ: مقایسه میزان بیان *old3-1* (۲۲) با *Ler-0* (۲۲) و مقایسه میزان بیان *Ler-0* (۲۲) در دو شرایط نوری (*Ler-0* (۱۸+۴) و *Ler-0* (۲۲)) سمت راست: مقایسه میزان بیان *Ler-0* (۱۸+۴) با *old3-1* (۱۸+۴) و مقایسه *old3-1* (۲۲) با *old3-1* (۱۸+۴)

سیستم دفاعی گیاه نقش مهمی دارد. از آنجایی که جهش در ساختار آنزیم سیستمین سنتاز اختلال ایجاد می‌کند و آنزیم موتانت نمی‌تواند عملکردی بهینه داشته باشد، گیاه موتانت *old3-1* در شرایط معمول رشد آرابیدوپسیس یعنی روزبلندی 21°C بعد از ۱۴ روز دچار مرگ سلولی شده و از بین می‌رود. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر شرایط نوری روزکوتاهی بر نجات گیاهان موتانت *old3-1* از مرگ سلولی زودرس انجام گرفت و بدین منظور برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیانی گیاهان موتانت *old3-1* در مقایسه با ژنوتیپ‌های *Ler-0*، *B40-12*، *old3-2* و *Col-0* در شرایط روزکوتاهی 21°C مورد بررسی قرار گرفت. در روز کوتاهی وزن تر کل و میزان محتوای کلروفیل در گیاه موتانت *old3-1* و مادری *Ler-0* دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشد و موتانت *old3-1* دارای کمترین میزان نشت یونی است که یک ویژگی مطلوب و نشانگر پایداری غشا سلول است. به عبارتی میزان تأثیر موتاسیون *old3* در روز کوتاهی تا حد زیادی به فرم مادری OLD3 نزدیک شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان موتانت *old3-1* بود که افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در نتیجه افزایش میزان تجمع گروه‌های فعال اکسیژن خصوصاً H_2O_2 رخ می‌دهد و منجر به

حشرات و مهره‌داران یافت شده است (Pecenkova et al., 2022). با توجه به نمودار (شکل ۱۱) بیان ژن *PR1* در گیاهچه‌های ۲۲ روزه *old3-1* که تمام دوره رشد خود را در روزکوتاهی گذراندند $513/2$ برابر بیشتر از *Ler-0* رشد یافته تحت شرایط مشابه است و بیان در *Ler-0* انتقال یافته به روزبلندی (شرایط ۱۸+۴) $2/7$ برابر *Ler-0* رشد یافته در روز کوتاهی است یعنی بیان این ژن پس از انتقال به روزبلندی $2/7$ برابر افزایش یافت. بیان *PR1* در *Ler-0* انتقال یافته به روزبلندی (شرایط ۱۸+۴) $0/06$ (برابر کمتر از *old3-1*) رشد یافته تحت شرایط مشابه است و بیان در *old3-1* رشد یافته در روزکوتاهی $11/8$ برابر بیشتر از ژنوتیپ نظیر انتقال یافته به روزبلندی (۱۸+۴) است. در هر دو شرایط نوری روز کوتاهی و روز بلندی بیان ژن *PR1* در *old3-1* همواره بیشتر از *Ler-0* است. بیشترین میزان افزایش بیان در مقایسه تغییر بیان ژن *PR1* در *old3-1* روز کوتاه نسبت به *Ler-0* روز کوتاه (به میزان $513/2$ برابر) مشاهده شد.

نتیجه گیری

موتانت *old3-1* دارای یک جهش نقطه‌ای در ژن سنتزکننده سیستمین است، سیستمین پیش‌ساز ترکیبات دفاعی بوده و در

حاکمی از نجات گیاهان موتانت *old3-1* در روزکوتاهی است. با توجه به یافته‌های به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که روزکوتاهی موجب حذف اثر موتاسیون *old3* در گیاهچه‌های موتانت *old3-1* شده است.

افزایش مقاومت گیاهان موتانت *old3-1* در شرایط روزکوتاهی می‌شود. در بررسی بیان نسبی ژن‌های نشانگر سیستم ایمنی شامل *GST1*، *DEFL* و *PR1* مشاهده شد که بیان این ژن‌ها در روز کوتاهی با افزایش قابل‌توجه‌ای همراه بوده و افزایش فعالیت این ژن‌ها در موتانت *old3-1* موجب افزایش مقاومت و زنده‌مانی آن‌ها شده است. همان‌طور که مشاهده شد نتایج

منابع

نوروزی، فرناز، شیرزادیان خرم‌آباد، رضا، قاسم‌نژاد، محمود، صبوری، عاطفه، و منبری، پیمان (۱۳۹۳). تغییر فعالیت ژن تولیدکننده سیستمین در گیاهان موتانت آرابیدوپسیس *old3* در واکنش به تنش اکسیداتیو ایجادشده توسط کلرید کادمیوم. *مجله ژنتیک نوین*،

۱۰(۴)، ۵۷۹-۵۹۰. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.20084439.1394.10.4.14.6>

- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplast. Polypeol oxide in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.24.1.1>.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., & Pink, D. (2003). The molecular analysis of leaf senescence a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1(1), 3-22. <https://doi.org/10.1046/j.1467-7652.2003.00004.x>.
- Chance, B. & Maehly, A. C. (1955). Assays of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8).
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 211-216. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)80067-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)80067-9).
- Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 61, 1-31. <https://doi.org/10.1042/bss0610001>.
- Del, L. A. R., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 330-335. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078204>.
- Dominguez-Solis, J. R., Lopez-Martin, M. C., Ager, F. J., Ynsa, M. D., Romero, L. C., & Gotor, C. (2004). Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal*, 2(6), 469-476. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00092.x>.
- Gan, S. (2003). Mitotic and postmitotic senescence in plants. *Science of Aging Knowledge Environment*, 38, re7-re7. <https://doi.org/10.1126/sageke.2003.38.re7>.
- Grant, A., Thiagarajah, M., & Sathian, K. (2000). Tactile perception in blind braille readers: A psychophysical study of acuity and hyperacuity using gratings and dot patterns. *Perception and Psychophysics*, 62, 301-312. <https://doi.org/10.3758/BF03205550>.
- He, Y., Tang, W., Swain, J. D., Green, A. L., Jack, T. P., & Gan, S. (2001). Networking senescence-regulating pathways by using arabidopsis enhancer trap lines. *Plant Physiology*, 126(2), 707-716. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.707>.
- Holbrook, N. Martin, G. R., & Lockshin, R. A. (1996). Cellular Aging and Cell Death. John Wiley & Sons, New York.
- Jing, H. C., Anderson, L., Sturre, M. J. G., Hille, J., & Dijkwel, P. P. (2007). Arabidopsis CPR5 is a senescence-regulatory gene with pleiotropic functions as predicted by the evolutionary theory of senescence. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3885-3894. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm237>.
- Jing, H. C., Sturre, M. J., Hille, J., & Dijkwel, P. P. (2002). Arabidopsis onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *The Plant Journal*, 32(1), 51-63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01400.x>.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & Development*, 24(22), 2463-2479. <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1971610>.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

- Love, A. J., Yun, B. W., Laval, V., Loake, G. J., & Milner, J. J. (2005). Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiology*, 139(2), 935-948. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066803>.
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0134>.
- Meyer, A. J. & Hell, R. (2005). Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research*, 86, 435-457. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-8425-1>.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9).
- Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T., & Kimura, K. (2005). Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 53(2), 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.03.015>.
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.
- Okamoto, J. K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., & Jofuku, K. D. (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 7076-7081. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.7076>.
- Pecenokova, T., Pejchar, P., Moravec, T., Drs, M., Haluska, S., Santrucek, J., Potocka, A., Zarsky, V., & Potocky, M. (2022). Immunity functions of Arabidopsis pathogenesis-related 1 are coupled but not confined to its C-terminus processing and trafficking. *Molecular Plant Pathology*, 23(5), 664-678. <https://doi.org/10.1111/mpp.13187>.
- Raikhel, N. (1992). Nuclear targeting in plants. *Plant Physiology*, 100(4), 1627-1632. <https://doi.org/10.1104/pp.100.4.1627>.
- Scandalios, J. G. (2002). Oxidative stress responses—what have genome-scale studies taught us. *Genome Biology*, 3(7), 1-6. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-reviews1019>.
- Seo, P. J., Lee, A. K., Xiang, F., & Park, C. M. (2008). Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: Insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant and Cell Physiology*, 49(3), 334-344. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn011>.
- Shirzadian-Khorramabad, R., Jing, H. C., Everts, G. E., Schippers, J. H., Hille, J., & Dijkwel, P. P. (2010). A mutation in the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase induces a genome-dependent early leaf death phenotype in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 10, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-80>.
- Silverstein, K. A., Graham, M. A., Paape, T. D., & VandenBosch, K. A. (2005). Genome organization of more than 300 defensin-like genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(2), 600-610. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060079>.
- Tahir, M., Watanabe, M., Jing, H. C., Hunter, D. A., Tohge, T., Nunes-Nesi, A., Brotman, Y., Fernie, A. R., Hoefgen, R., & Dijkwel, P. P. (2013). Activation of R-mediated innate immunity and disease susceptibility is affected by mutations in a cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 73(1), 118-130. <https://doi.org/10.1111/tpj.12021>.
- Tompson, J. E., Ledge, R. L., & Barber, R. F. (1987). The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*, 105(3), 317-344. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb00871.x>.
- Toppi, L. S. D. & Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41(2), 105-130. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(98)00058-6).
- Valandro, F., Menguer, P. K., Cabreira-Cagliari, C., Margis-Pinheiro, M., & Cagliari, A. (2020). Programmed cell death (PCD) control in plants: New insights from the *Arabidopsis thaliana* deathosome. *Plant Science*, 299, 110603. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110603>.
- Wang, Z., Triezenberg, S. J., Thomashow, M. F., & Stockinger, E. J. (2005). Multiple hydrophobic motifs in Arabidopsis CBF1 COOH-terminus provide functional redundancy in trans-activation. *Plant Molecular Biology*, 58, 543-559. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-6760-4>.
- Wirtz, M. & Hell, R. (2006). Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: Structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 273-286. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.013>.

Rescue of early cell death phenotype in *Arabidopsis old3-1* mutant plants in short-day condition

Maryam Rajabi-Farshmi, Mehdi Yarahmadi, Reza Shirzadian-Khorramabad*, Ali Aalami, Amin Abedi and Mohammad-hossein Rezaadoost

Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran

(Received: 2022/10/26, Accepted: 2023/04/25)

Abstract

The mutant plants *old3-1* (onset of leaf death 3-1) have a point mutation in the *AT4G14880* gene. This gene encodes the cytosolic cysteine synthase enzyme (OASTL-A1). Cysteine is a sulfur-containing organic compound and a precursor of defense compounds, and the OASTL-A1 enzyme plays a role in the last step of its synthesis. The *old3-1* mutation causes a change in the structure and activity of the cysteine synthase enzyme, and the *old3-1* mutant plants suffer premature cell death after 14 days under 21°C long-day conditions. In this research, the *old3-1* mutant was compared with mutants *B40-12*, *old3-2* and wild type *Ler-0*, *Col-0* under short-day conditions and 21°C. Based on the phenotypic and physiological results, *old3-1* plants did not suffer premature cell death and went through different stages of growth and development until flowering and seed production. Examining the activity of catalase and peroxidase enzymes under short day conditions showed that the activity of these enzymes in the leaves of *old3-1* is higher than that of *Ler-0* and *B40-12*, which means that in short-day conditions the activity of the enzymes increased. Examining the relative expression of immune system marker genes including *GST1*, *DEFL* and *PR1* in 22-day-old seedlings *old3-1* and *Ler-0* under the same conditions (short day and 21°C) following transferring to long day showed that the expression of the above genes in short day significantly increased, resulting in the survival of *old3-1* mutant plants. According to the obtained results, short days improve growth and development conditions and save *old3-1* seedlings from premature cell death.

Keywords: *Arabidopsis*, Cell death, *old3-1* mutant, Short-day

Corresponding author, Email: r.shirzadian@guilan.ac.ir