علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۴ (ص ۴۲۲-۴۱۳)

بررسی تأثیر تشدید بیان ژن توکوفرول سیکلاز در تحمل به تنش خشکی در توتون (*Nicotiana tabacum*)

ناهید رعنائیان[1]، علیرضا عباسی[2*] و حسن زینالی خانقاه[3]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۲۰)

چکیده

تنش‌های محیطی دامنهٔ گسترده‌ای از پاسخ‌های گیاهی مانند تغییر در بیان ژن تا تغییرپذیری‌ها در سوخت‌وساز (متابولیسم) درون‌یاخته‌ای و رشد را راه‌اندازی می‌کنند. واکنش‌های گیاهی مختلفی برای رویارویی با اثرگذاری‌های زیانبار بالقوهٔ ایجادشده توسط نور، خشکی، شوری، عفونت ناشی از بیمارگر و تنش‌های دیگر وجود دارد. آلفا توکوفرول[1] ترکیب عمدهٔ ویتامین E است که در کلروپلاست برگ یافت می‌شود. این ضداکسنده (آنتی‌اکسیدان)، گونه‌های فعال اکسیژن مشتق‌شده از نورساخت (فتوسنتز) را غیرفعال کرده و از انتشار پراکسیداسیون چربی (لیپید) توسط پاکسازی رادیکال‌های پروکسیل چربی در غشاهای تیلاکوئید جلوگیری می‌کند. در این تحقیق گیاهان توتون دارای سازهٔ ژنی pBin: At.TC که در آنها ژن توکوفرول سیکلاز (یکی از ژن‌های کلیدی مسیر ساخت ویتامین E که تبدیل ۲ و ۳-دی متیل-۵-فیتیل-۱ و ۴-بنزوکوئینون را به گاما-توکوفرول[2] کاتالیز می‌کند) تشدید بیان یافته بود، استفاده شدند. به منظور بررسی اثر ژن منتقل‌شدهٔ گیاهان تراریخت (تراژن) حاصل تحت تنش خشکی قرار گرفتند و ویژگی‌های فیزیولوژیک مانند محتوای سبزینه (کلروفیل)ها و کاروتنوئید، محتوای آمینواسید پرولین، میزان نفوذپذیری نسبی غشا و محتوای آب نسبی گیاه در گیاهان تراریخت و شاهد بررسی و تجزیه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که گیاهان تراریخت محتوای سبزینه، پرولین و آب نسبی بالاتر و همچنین میزان نشت یونی کمتری در سطوح تنشی ۴۰ و ۶۰ درصد در مقایسه با گیاهان شاهد داشتند. به‌طورکلی تشدید بیان ژن توکوفرول سیکلاز در گیاه توتون به‌احتمال موجب افزایش مقاومت آن در شرایط تنش خشکی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: **پراکسیداسیون چربی، توکوفرول سیکلاز، تنش خشکی، ضداکسنده، گونه‌های فعال اکسیژن.**

مقدمه

توکوفرول‌ها تنها در غشاهای تیلاکوئیدها یا پلاستیدها مکان‌یابی می‌شوند و زیست‌ساخت (بیوسنتز)شان تنها در گیاهان، جلبک‌ها و بعضی از سیانوباکتری‌ها مشاهده شده است (Munne-bosch, 2005). این توزیع نشان می‌دهد که این مسیر در سیانوباکتری‌ها برای حفاظت این موجود (ارگانیسم)ها از گونه‌های فعال اکسیژن مشتق‌شده از طریق نورساخت (فتوسنتز)

* تلفن: ۰۹۱۲۴۱۲۸۷۰۹
E-mail: rezabbasi@ut.ac.ir

1. α-tocopherol
2. 2,3-dimethyl-5-phytyl-1,4-benzoquinone (DMPBQ)

تکامل یافته است (Munne-bosch, 2005). همچنین درمورد فرایندهای زیست‌شناختی نوری (فتوبیولوژیکی) به عنوان مثال نورساخت، باید گفت که انجام این فرایندها در واقع بدون سرپوش اطمینانی که بتواند انرژی برانگیختهٔ اضافی را در یک راه بی‌زیان پراکنده کند امکان‌پذیر نخواهد بود. بنابراین در طبیعت نورساخت به‌طور پیوسته در یک انتقال متوازن بین به دام انداختن کارآمد انرژی خورشیدی و پراکندگی سریع آن زمانی که بیش از نیاز گیاه باشد، عمل می‌کند (Munne-bosch, 2005). گیاهان سازوکار (مکانیسم)های تکامل‌یافتهٔ پرشماری را برای پراکندگی انرژی اضافی در کلروپلاست‌ها دارند، که شامل غیرفعال‌سازی گرمایی القاشده توسط اسیدی شدن لومن[1] در غشاهای تیلاکوئید، چرخهٔ زانتوفیل، چرخهٔ انتقال الکترون، تولید و پاکسازی بعدی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[2]، تنفس نوری و تغییرپذیری‌های دیگر در فعالیت سوخت‌وسازی (متابولیکی) است (Demmig-Adams & Adams, 1996; Osmond *et al*., 1997; Asada, 1999). آلفا توکوفرول در تعامل با دیگر ضداکسنده (آنتی‌اکسیدان)ها، نقشی را در کاهش سطوح ROSها (به‌طور عمده $^1O_2$ و OH°) در غشاهای نورساخت عمل می‌کند و میزان پراکسیداسیون چربی (لیپید)ها را با کاهش رادیکال‌های پروکسیل چربی به هیدروپراکسیدهای متناظر محدود می‌کند (Havaux *et al*., 2005; Maeda *et al*., 2005; Trebst *et al*., 2002). آلفا توکوفرول می‌تواند دفع فیزیکی و بنابراین غیرفعال‌سازی $^1O_2$ در کلروپلاست‌ها را انجام دهد. برآورد شده است که یک مولکول آلفا توکوفرول پیش از تخریب می‌تواند بیش از ۱۲۰ مولکول $^1O_2$ را با انتقال انرژی تشدیدیافته (رزونانس) غیرفعال کند (Fahrenholzt *et al*., 1974). افزون بر این آلفا توکوفرول می‌تواند به صورت شیمیایی $^1O_2$ و رادیکال‌های پروکسیل چربی را پاکسازی کند. پاکسازی شیمیایی $^1O_2$ با آلفاتوکوفرول به‌طور تغییرناپذیری به تشکیل اپوکسیدها[3] و کوئینون ها[4]ی آنها منجر می‌شود، درحالی‌که پاکسازی رادیکال‌های پروکسیل چربی به تشکیل رادیکال‌های توکوفروکسیل[5] منجر می‌شود که می‌تواند دوباره با آسکوربات به آلفاتوکوفرول تبدیل شود (Munne´-Bosch & Alegre, 2002a). بنابراین آلفاتوکوفرول در نگهداری یک حالت اکسایش-احیای (Redox) مناسب در کلروپلاست‌ها شرکت کرده و همین‌طور در نگهداری ساختار و عملکرد غشای تیلاکوئید در طول رشد و توسعهٔ گیاه و در پاسخ‌های گیاه به تنش‌ها شرکت می‌کند (Munne´-Bosch & Alegre, 2002a; Sattler *et al*., 2004). توکوفرول سیکلاز جهش‌یافته در ذرت به تجمع کربوهیدرات، آنتوسیانین و پینه (کالوس) و همچنین به تغییرپذیری‌های فراساختمانی پلاسمودسماتا[6] بین bundle sheath و یاخته‌های پارانشیم آوندی در شرایط رشد بدون تنش منجر شد (Russin *et al*., 1996). خاموشی توکوفرول سیکلاز در گیاهان سیب‌زمینی همچنین منجر به تجمع پینه و تغییرپذیری‌های فراساختمانی پلاسمودسماتا بین bundle sheath و یاخته‌های پارانشیم آوندی شد (Hofius *et al*., 2004).

در سال ۲۰۰۶ گزارش شد که جهش (موتانت)های *vte1* علف تال (آرابیدوپسیس) کربوهیدرات را در شرایط دمای پایین تجمع می‌دهند (Maeda *et al*., 2006). در سال ۲۰۱۱ ژن *osVTE1*، که یک راست‌نسخهٔ (ارتولوگ) توکوفرول سیکلاز در برنج را کد می‌کند، جداسازی و تعیین ویژگی شد (Ouyang *et al*., 2010). *osVTE1*، به‌طور قابل توجهی با تنش‌های غیرزیستی مانند نمک بالا، H_2O_2، خشکی، سرما و هورمون‌های آبسیزیک اسید و سالیسیلیک اسید گیاهی القا می‌شود (Ouyang *et al*., 2010). در مقایسه با گیاهان شاهد، گیاهان تراریخت یا تراژن (RNAi*osVTE1*) که در آنها ژن یادشده خاموش شده بود، بیشتر به تنش شوری حساس بودند درحالی‌که تشدید بیان *osVTE1* در گیاهان تراریخت تحمل بیشتری را به تنش شوری ایجاد کرد (Ouyang *et al*.,

1. Lumen
2. Reactive oxygen species
3. Epoxides
4. Quinones
5. Tocopheroxyl
6. Plasmodesmata

2010). در سال ۲۰۰۶ یک بررسی روی تأثیر α-توکوفرول بر پیام‌رسانی درون‌یاخته‌ای با تغییر سطوح اسید جاسمونیک انجام شد (Munne-Bosch *et al.*, 2006). در این بررسی جهش‌یافته‌های *vte1* با نقص تولید توکوفرول، سطوح توکوفرول پایین‌تر، کاهش رشد و افزایش تجمع آنتوسیانین را در مقایسه با گونهٔ وحشی نشان دادند (Munne-Bosch *et al.*, 2006). همچنین سطوح اسید جاسمونیک در گیاه تغییر کرده بود. در نتیجه به تأثیرگذاری‌های بالقوهٔ توکوفرول‌ها روی پیام‌رسانی درون‌یاخته‌ای و تأثیر احتمالی بر رشد گیاه و تجمع آنتوسیانین پی برده شد (Munne-Bosch *et al.*, 2006).

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از گیاهان تراریخت توتون (*Nicotiana tabacum*) دارای ناحیهٔ کدکنندهٔ ژن توکوفرول‌سیکلاز آرابیدوپسیس (accession no. NM119430) که تحت کنترل عمومی راه‌انداز[1] CaMV-35S و خاتمه‌دهندهٔ[2] OCS در ناقل بود، استفاده شد. برای انتقال ژن به گیاه از آگروباکتریوم (سویهٔ LBA4404) استفاده شد. پس از تأیید تراریختی به کمک آزمون‌های PCR و RT-PCR و همچنین کشت بذرهای نسل اول (T_1) روی محیط دارای کانامایسین و مشاهدهٔ مقاومت نمونه‌های تراریخت و سبز ماندن آنها روی این محیط (رعنائیان، ۱۳۹۲) بذرهای این گیاهان مادری تراریخت به نسل بعد (T_2)، در بستر نگهدارندهٔ خاک برده شد تا بررسی‌های فیزیولوژیکی در شرایط تنش خشکی روی آنها انجام گیرد. این بررسی‌ها برای دو رگهٔ (لاین) تراریخت و شاهد، از هر کدام سه تکرار (سه گیاه در سه گلدان جداگانه) و در چهار سطح ۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه (FC)[3] و در مجموع ۲۴ نمونه انجام شد. تنش خشکی در مرحلهٔ هشت‌برگی گیاهان، بر آنها اعمال شد و مدت اعمال تنش هم ده روز بود. ارزیابی روی ویژگی‌های فیزیولوژیکی شامل محتوای سبزینه (کلروفیل)ها و کاروتنوئید، محتوای آمینواسید پرولین، میزان نفوذپذیری نسبی غشا و محتوای آب نسبی گیاه با استفاده از رابطه‌های زیر انجام گرفت. همچنین برای اندازه‌گیری این ویژگی‌ها از بافت برگ استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC)[4] به روش Ritchie *et al.* (1990) انجام گرفت و سپس از رابطهٔ زیر محاسبه شد:

$$RWC = [FW- DW / SW – DW] \times 100$$

FW[5]: وزن تر

DW[6]: وزن خشک

SW[7]: وزن اشباع

همچنین محتوای پرولین با استفاده از روش Bates *et al.* (1973) با کمی تغییر (استفاده از سانتریفیوژ به جای استفاده از قیف شیشه‌ای و کاغذ صافی به منظور صاف کردن نمونه‌ها) اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطهٔ زیر محتوای واقعی آن محاسبه شد:

پرولین (µm) = وزن تر (g) / [(پرولین (µg/µm) / ۱۱۵/۵ × تولوئن (ml)) × پرولین (ml/µg)] / نمونه (g) / ۵

اندازه‌گیری میزان سبزینهٔ a، سبزینهٔ b و کاروتنوئیدها به روش Arnon (1967) ورت گرفت و سپس با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه شد:

سبزینهٔ A = (۱۹/۳ × A۶۶۳ – ۰/۸۶ × A۶۴۵) V / ۱۰۰ W

سبزینهٔ B = (۱۹/۳ × A۶۴۵ – ۳/۶ × A۶۶۳) V / ۱۰۰ W

کاروتنوئیدها = ۱۰۰ (A۴۷۰) –۳/۲۷ (mg chl. a)–۱۰۴ (mg chl. b)/۲۲۷

V= حجم محلول صاف‌شده (محلول بالایی ناشی از سانتریفیوژ)

A= جذب نور در طول‌موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر

W= وزن تر نمونه بر حسب گرم

1. Promoter
2.Terminator
3. Field capacity
4. Relative water content
5. Fresh weight
6. Dry weight
7. Saturation weight

اندازه‌گیری نفوذپذیری نسبی غشا (EL) به روش Zhao *et al.* (1992) انجام شد و سپس از رابطهٔ زیر به منظور محاسبهٔ آن استفاده شد:

$$EL: \frac{\text{قابلیت هدایت الکتریکی پس از جذب آب توسط نمونه (EC1)}}{\text{قابلیت هدایت الکتریکی پس از گرما دیدن نمونه (EC2)}} \times ۱۰۰$$

روش سنجش آماری داده‌ها

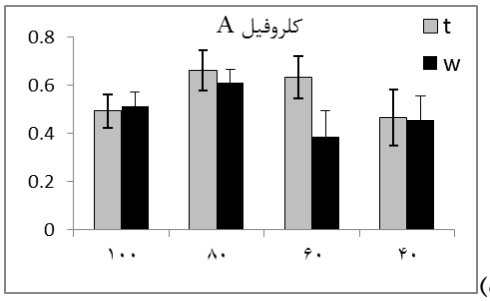
به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها در این تحقیق از نرم‌افزارهای Excel و SAS 9.2 استفاده شد. همچنین به منظور مقایسهٔ میانگین‌ها از آزمون LSD و در سطح ۵ درصد استفاده کردیم.

نتایج و بحث

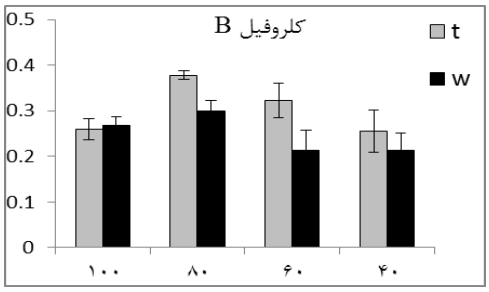
سنجش سبزینه و کاروتنوئیدها در گیاهان تراریخت و شاهد در شرایط تنش خشکی

در فرایند نورساخت مولکول‌های زیانبار بالقوهٔ چندی تولید می‌شوند که گونه‌های فعال اکسیژن نامیده می‌شوند. برای حفاظت دستگاه نورساختی در برابر آسیب اکسایشی نوری (فتواکسیداتیو)، ویتامین E (به‌ویژه آلفاتوکفرول) می‌تواند خاموشی فیزیکی یا پاکسازی شیمیایی اکسیژن مولکولی منفرد، که در فرایند نورساخت تولید می‌شود را انجام دهد (Foote *et al.*, 1974). به منظور بررسی تأثیر تشدید بیان ژن TC در گیاهان تراریخت بر حفاظت دستگاه نورساختی، محتوای سبزینه‌ها و کاروتنوئید در شرایط متفاوت تنش و غیرتنش در گیاهان تراریخت و شاهد اندازه‌گیری شد که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است.

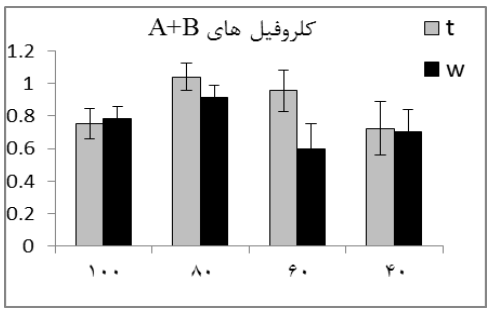
همان‌طور که در شکل ۲- الف مشخص است اختلاف معنی‌داری بین رگهٔ تراریخت و شاهد در محتوای سبزینهٔ A در ظرفیت زراعی مزرعه (۱۰۰ درصد) نیست. در سطح ۸۰ درصد اختلاف بین رگهٔ تراریخت و شاهد مشاهده می‌شود ولی معنی‌دار نیست. تنها در سطح تنش ۶۰ درصد اختلاف این دو معنی‌دار شده است. در این سطح تنش محتوای سبزینهٔ رگهٔ تراریخت بیشتر از شاهد است که ممکن است به دلیل افزایش میزان توکوفرول در گیاهان تراریخت باشد.



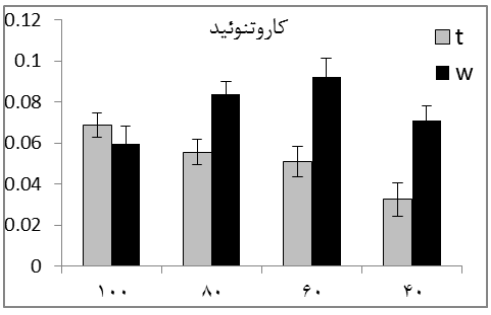
الف)



ب)



ج)



د)

شکل ۲. الف) نمودار میزان سبزینهٔ A در گیاهان تراریخت و شاهد در سه سطح تنش (۸۰ ، ۶۰ و ۴۰ درصد) و یک سطح بدون تنش (۱۰۰ درصد). ب) نمودار میزان سبزینهٔ B در گیاهان تراریخت و شاهد در سه سطح تنش (۸۰ ، ۶۰ و ۴۰ درصد) و یک سطح بدون تنش (۱۰۰ درصد). ج) مجموع سبزینه‌های A+B در گیاهان تراریخت و شاهد در سه سطح تنش (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد) و یک سطح بدون تنش (۱۰۰ درصد). د) میزان کاروتنوئید در گیاهان تراریخت و شاهد در سه سطح تنش (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد) و یک سطح بدون تنش (۱۰۰).

T: تراریخت (Transgenic) و w: شاهد (wild type)

این موضوع به‌احتمال به دلیل نقش ضداکسندگی آن و دفع گونه‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از آسیب به دستگاه نورساختی، باعث ایجاد آسیب کمتر در رگهٔ تراریخت نسبت به شاهد باشد (Havaux *et al*., 2005; Maeda *et al*., 2005; Trebst *et al*., 2002). در مورد شکل ۲- ب اختلافی بین رگهٔ تراریخت و شاهد در محتوای سبزینهٔ B در ظرفیت زراعی مزرعه (۱۰۰ درصد) نیست اما در سطح ۸۰ و ۶۰ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد و همان‌طور که مشخص شده با افزایش فشار تنش میزان سبزینهٔ B در هر دو رگهٔ شاهد و تراریخت کاهش یافته است. این کاهش در رگهٔ تراریخت کمتر است بدین معنی که آسیب واردشده به سبزینهٔ B در آنها کمتر است که ممکن است به دلیل گفته‌شده برای سبزینهٔ A باشد. مجموع سبزینهٔ A و B نیز در ظرفیت زراعی مزرعه (۱۰۰ درصد) تفاوتی بین رگهٔ شاهد و تراریخت نشان نمی‌دهد. در سطح ۸۰ درصد گرچه بین شاهد و تراریخت تفاوت وجود دارد ولی معنی‌دار نیست. در سطح ۶۰ درصد اختلاف معنی‌داری بین این دو مشاهده می‌شود که افزایش میزان آن در رگهٔ تراریخت نسبت به شاهد مشهود است. در تحقیق انجام‌گرفته در سال ۲۰۰۷ همچنین مشخص شد که در شرایط تنش خشکی در گیاهان علف تالی که *HPT* در آنها خاموش شده بود (*HPT* یکی دیگر از آنزیم‌های کلیدی در مسیر ساخت ویتامین E است)، سطوح سبزینه‌ها در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد کمتر است. در واقع مشاهده شد که در نبود ویتامین E به‌عنوان ضداکسنده در شرایط تنش تخریب سبزینه‌ها بیشتر صورت خواهد گرفت که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق همخوانی دارد (Abbasi *et al*., 2007). در شکل ۲- ج میزان کاروتنوئید بین رگهٔ شاهد و تراریخت در سطح بدون تنش اختلاف اندکی را نشان می‌دهد که معنی‌دار نیست، اما در دیگر سطوح اختلاف معنی‌دار است و در رگهٔ شاهد بیشتر از تراریخت است که به‌احتمال به دلیل همبستگی منفی بین ضداکسنده‌هاست که با افزایش یکی، دیگری کاهش می‌یابد و در رگهٔ تراریخت مورد نظر به دلیل افزایش در توکوفرول‌ها، میزان کاروتنوئیدها کاهش یافته است (Munne-bosch, 2005). در رگهٔ شاهد، در آغاز یک افزایش وجود داشته (تا سطح تنش ۶۰ درصد) که ممکن است به دلیل نقش ضداکسندگی کاروتنوئید (Trebst *et al*., 2002; Trebst, 2003) باشد. گیاهان شاهد میزان آن را تا سطح تنش ۶۰ درصد بالا برده‌اند، اما در سطح تنش ۴۰ درصد به دلیل سنگین بودن تنش ممکن است به کاروتنوئیدها هم آسیب وارد شده باشد که میزان آن کاهش یافته است. در گیاهان تراریخت میزان کاروتنوئید یک روند کاهشی را نشان داد که ممکن است به دلیل افزایش میزان ضداکسندهٔ توکوفرول در گیاهان تراریخت بوده و باعث کاهش ساخت ضداکسنده‌های دیگر مانند کاروتنوئیدها شود (Munne-bosch, 2005). درحالی‌که در بعضی بررسی‌ها مانند پژوهش Abbasi *et al.* (2007) دیده شد که میزان کاروتنوئیدها در حالت‌های خاموشی ژن *HPT* در شرایط تنش خشکی هم روند کاهشی را نشان داد.

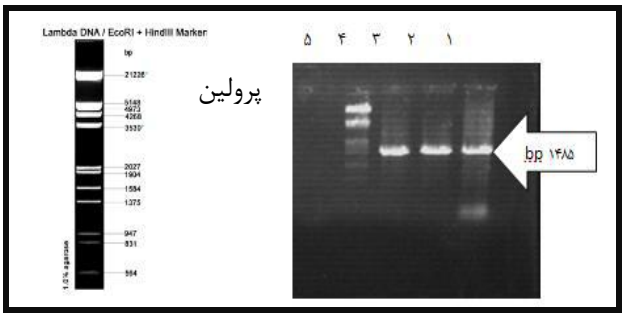
مقایسهٔ RWC در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد در شرایط تنش

برای اندازه‌گیری میزان آب گیاه می‌توان از پتانسیل آب گیاه (Ψ_w) و محتوای آب نسبی (RWC) استفاده کرد. میزان و سرعت کاهش محتوای آب نسبی در شرایط تنش در ارقام مختلف متفاوت است. در بسیاری از آزمایش‌ها در شرایط تنش خشکی ارقام مقاوم نسبت به تنش خشکی دارای محتوای آب نسبی بالاتری بودند (Chandrasekar *et al*., 2000). همان‌طورکه در شکل ۳- ج نشان داده شده است محتوای آب نسبی در شرایط بدون تنش (۱۰۰ درصد) در هر دو گیاه تراریخت و شاهد یکسان بوده و اختلافی ندارند. در سطح تنش ۸۰ درصد اختلاف مشاهده می‌شود ولی معنی‌دار نیست. ولی در سطح تنش ۶۰ و ۴۰ درصد اختلاف معنی‌داری بین شاهد و تراریخت مشاهده می‌شود. در هر دو سطح تنش ۶۰ و ۴۰ درصد کاهش محتوای آب نسبی گیاه در رگهٔ تراریخت کمتر است. به عبارتی محتوای آب نسبی در شرایط تنش در گیاه تراریخت بیشتر از شاهد است. این احتمال وجود دارد که به دلیل

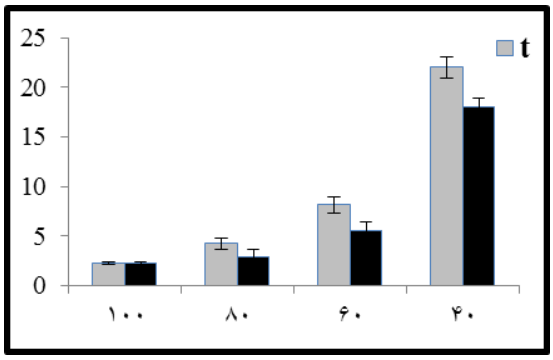
همبستگی مثبت توکوفرول‌ها با هورمون‌های تنش مانند اسید آبسیزیک، اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک با افزایش میزان توکوفرول‌ها و اثرگذاری آن روی میزان اسید آبسیزیک موجب بسته شدن بیشتر روزنه‌ها در گیاهان تراریخت می‌شود (Munne-bosch, 2005).

سنجش پرولین در گیاهان تراریخت در شرایط تنش خشکی

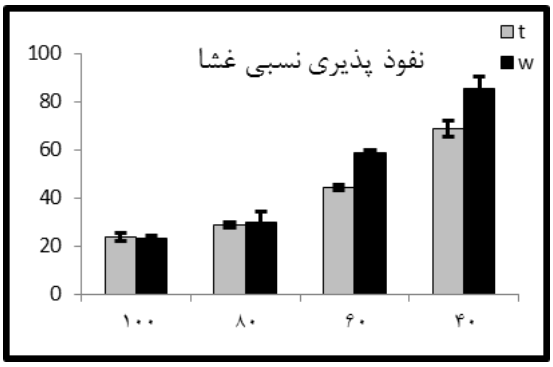
پرولین به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اسمولیت‌ها، پتانسیل اسمزی مطلوبی را بین یاخته و محیط اطراف آن حفظ می‌کند (Pollard & Wn Jones, 1979). افزون بر تنظیم اسمزی گیاهان در شرایط تنش، نقش‌های پیشنهادی دیگری برای پرولین از جمله حذف رادیکال‌های هیدروکسیل، پایداری غشا و ساختار پروتئین‌ها، به عنوان منبعی برای کربن و نیتروژن برای ترمیم تنش و تعدیل پتانسیل اکسایش و احیای یاخته در شرایط تنش گزارش شده است (Smirnoff & Cumbes, 1989; Ashraf & Foolad, 2007). همان‌طورکه در شکل ۳- الف نشان داده شده است بین رگهٔ شاهد و تراریخت در شرایط بدون تنش (۱۰۰درصد) اختلافی وجود ندارد. در سطح ۸۰درصد به‌رغم اختلاف بین این دو این اختلاف معنی‌دار نیست. اختلاف بین رگهٔ شاهد و تراریخت از نظر محتوای پرولین در سطح ۶۰ و ۴۰ درصد معنی‌دار است و با افزایش فشار تنش میزان آن در هر دو رگه افزایش می‌یابد (۴۰ درصد بیشتر از ۶۰ درصد) که این افزایش در رگهٔ تراریخت بیشتر است. این افزایش بیشتر رگهٔ تراریخت نسبت به شاهد ممکن است به دلیل تأثیر احتمالی توکوفرول بر اسید آبسیزیک و بسته شدن روزنه‌ها باشد (Munne-Bosch, 2005). همچنان‌که در بررسی نتایج شاخص RWC مشخص شد، میزان CO_2 ورودی به گیاه در شرایط تنش با بسته شدن روزنه‌ها کاهش یافته و در نتیجه میزان ATP و NADPH تولیدی چرخهٔ انتقال الکترون برای اینکه در مسیر تولید رادیکال و دادن الکترون به اکسیژن مولکولی قرار نگیرند، وارد مسیر تولید پرولین می‌شود (Delauney & Verma, 1993; Kavi kishor *et al.*, 2005). به همین دلیل محتوای پرولین رگهٔ تراریخت بیش از شاهد است. همچنین گزارش شده است که اسمولیت‌های آلی مانند پرولین و گلایسین بتائین ۲۴-۱۹ درصد در ایجاد پتانسیل اسمزی نقش دارند، درحالی‌که نقش یون‌های غیرآلی ۹۷-۵۶ درصد بود و پرولین به عنوان یکی از مهم‌ترین اسمولیت‌های اولیه در تولید پتانسیل اسمزی به تنهایی ۶۰-۴۰ درصد پتانسیل اسمزی را نسبت به دیگر ترکیبات آلی تأمین می‌کند (Lee *et al.*, 2007, 2008). گونه‌های فعال اکسیژن که موجب از دست رفتن ساختار غشا و مرگ یاخته‌ای می‌شوند، توسط اسمولیت‌های آلی (اسموپروتکتانت) از بین می‌روند (Bohnert & Jensen, 1996). افزایش تحمل به تنش خشکی در گیاهان تراریخت، با تجمع بالای مانیتول (Shen *et al.*, 1997; Abebe *et al.*, 2003)، گلیسین بتائین (Holmstrom *et al.*, 2000)، پرولین (Zhu *et al.*, 1998) و کربوهیدرات‌های محلول (Kereps & Galiba, 2002) گزارش شده است. بررسی‌های ژنتیکی نشان می‌دهد که ژن‌های درگیر در زیست‌ساخت حفاظت‌کننده‌های اسمزی، در شرایط تنش‌های خشکی و شوری به‌طور افزایشی تنظیم شده (Xiong *et al.*, 2001) و موجب افزایش تحمل به تنش در گیاهان نیز می‌شوند (Bohnert *et al.*, 1995; Zhu, 2001). با کنترل محتوای هیدروپراکسی در کلروپلاست‌ها، توکوفرول‌ها ممکن است به‌طور مستقیم سطوح هورمون گیاهی درونی مانند اسید جاسمونیک در برگ‌ها را تنظیم کنند و به‌احتمال تأثیرش بر اسید جاسمونیک از طریق بیان ژن مربوط به آن است (Munne-Bosch, 2005). بنابراین به یقیق پیام‌رسانی یاخته‌ای در گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از آنجایی‌که توکوفرول‌ها در انتقال پیام در شرایط تنش با تنظیم هورمون‌های تنش مانند اسید جاسمونیک نقش دارند، در نتیجه انتقال ژن TC و در نتیجه افزایش ضداکسنده و در پی آن افزایش اسید جاسمونیک، ممکن است در زمینهٔ پیام‌رسانی برای افزایش تجمع اسمولیت‌های آلی مانند پرولین مؤثر باشد و موجب افزایش تجمع پرولین شود (Munne-Bosch *et al.*, 2007).



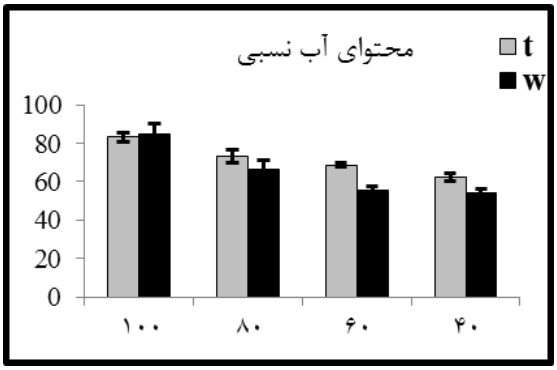
الف)



ب)



ج)



د)

شکل۳. الف) آزمون PCR به منظور تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از DNA ژنگانی (ژنومی)، چاهک۱. محصول PCR گیاه تراریخت. چاهک۲. محصول PCR کلنی آگروباکتریوم نوترکیب. چاهک ۳. محصول PCR پلاسمید نوترکیب (کنترل مثبت). چاهک ۴. نشانگر وزن مولکولی (DNA فاژ لاندا). چاهک۵. محصول PCR گیاه غیرتراریخت (کنترل منفی). ب) نمودار محتوای پرولین درگیاهان تراریخت و شاهد در سه سطح تنش (۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد) و یک سطح بدون تنش (۱۰۰ درصد)، ج) میزان نفوذپذیری نسبی غشا درگیاهان تراریخت و شاهد در سه سطح تنش (۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد) و یک سطح بدون تنش (۱۰۰ درصد)، د) محتوای آب نسبی گیاه درگیاهان تراریخت و شاهد در سه سطح تنش (۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد) و یک سطح بدون تنش (۱۰۰ درصد).

T: تراریخت (Transgenic) و w: شاهد (wild type)

مقایسهٔ میزان نشت یونی در گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان شاهد تحت تنش خشکی

به منظور بررسی تأثیر افزایش محتوای توکوفرول بر آسیب غشا، نشت یونی از گیاهان تراریخت و شاهد آزمایش شد. نشت یونی با قابلیت رسانایی الکتریکی محلول اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل ۳- ب مشخص شده است در سطح بدون تنش (۱۰۰ درصد) رگهٔ شاهد و تراریخت اختلافی از نظر محتوای پرولین با یکدیگر ندارند. در سطح تنش ۸۰ درصد اختلاف مشاهده می‌شود ولی معنی‌دار نیست. در سطح تنش ۶۰ و ۴۰ درصد اختلاف معنی‌داری بین شاهد و تراریخت مشاهده شد که نشان می‌دهد میزان نشت یونی در رگهٔ شاهد بیشتر از تراریخت است. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش توکوفرول‌ها به واسطهٔ انتقال ژن TC به‌احتمال منجر به کاهش آسیب غشا از طریق جلوگیری از پراکسیداسیون چربی گیاهان تراریخت می‌شود (Havaux *et al*., 2005; Maeda *et al*., 2005; Trebst *et al*., 2002). از آنجا که یکی از نقش‌های اصلی توکوفرول‌ها به عنوان یک ضداکسنده در غشاهای زیستی از بین بردن گونه‌های رادیکالی اسید چرب غیراشباع تولیدی در فرایند پراکسیداسیون چربی است (Foyer, 1992; Munne-Bosch, 2002)، در نتیجه ممکن است میزان نشت یونی در گیاهان تراریخت که محتوای توکوفرول بیشتری دارند، در شرایط تنش نسبت به گیاه شاهد کمتر باشد، همچنان که در نمودار مشاهده می‌شود (شکل۳- ب).

نتیجه‌گیری

در تحقیق انجام گرفته از گیاهان تراریخت توتون که ژن توکوفرول سیکلاز (TC)، یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر زیست‌ساخت ویتامین E و یکی از ضداکسنده‌های مؤثر در گیاهان برای رویارویی با تنش اکسایشی است، در آنها تشدید بیان یافته بود، استفاده شد. همچنین تراریختی گیاهان یادشده با تجزیهٔ PCR و همچنین کشت و رشد بذرهای تراریخت این گیاهان روی محیط دارای کانامایسین، تأیید شده بود (Raanaian *et al*., 2013). سپس بذرهای نسل اول کشت و گیاهان به نسل بعد منتقل شدند تا ویژگی‌های فیزیولوژیکی روی این گیاهان در شرایط تنش خشکی انجام گیرد. این بررسی‌ها به نقش توکوفرول‌ها در حفاظت چربی‌های غشا از گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین نقش احتمالی انتقال پیام توکوفرول‌ها و تنظیم هورمون‌های تنشی مانند اسید جاسمونیک و همین‌طور حفاظت دستگاه نورساختی و سبزینه‌ها از آسیب اکسایشی و گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده و در نتیجه بدون کاهش ظرفیت نورساختی اشاره کرد. در نتیجه به‌طورکلی انتقال این ژن به گیاه به‌احتمال موجب افزایش مقاومت گیاه در شرایط تنش می‌شود.

REFERENCES

1. Rahnama, A., Munns, A., Poustini, K. & Watt, M. (2011). A screening method to identify genetic variation in root growth response to a salinity gradient. *Journal of Experimental Botany*, 62(1) 69-77.
2. Raanaian, N., Abbasi, A.R. & Zeinali, H. (2013). Overexpression tochopherol cyclase (At.TC) in tabacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Crop Biotechnology*, 4, 149-156
3. Abebe, T., Guenzi, A. C., Martin, B. & Cushman, J. C. (2003). Tolerance of Mannitol Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and Slinity. *Plant Phsiol*, 131, 1748-1755.
4. Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23, 112-121.
5. Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 601-39.
6. Ashraf, M. & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycin betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot*, 59, 207-216.
7. Bates, L. S., Waldern, R. P. & Tear, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant soil*, 39, 205-207.
8. Bohnert, H. J., Nelson, D. E. & Jensen, R. G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 7, 1099-1111.
9. Bohnert, H. J. & Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*, 14, 89-97.
10. Burton, G. W., Cheng, S. C., Webb, A. & Ingold, K. U. (1986). Vitamin E in young and old human red nlood cells. *Biochim Biophys Acta*, 860, 84-90.

11. Chandrasekar, V., Sairam, R. K. & Srivastava, G. C. (2000). Physiological and Biochemical Responses of Hexaploid and Tetraploid Wheat to Drought Stress. *J Agron Crop Sci*, 185, 219-222.
12. Delauney, A. J. & Verma, D. P. S. (1993). Prolin biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*., 4, 215-223.
13. Demmig-Adams, B. & Adams, III. WW. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci*, 1, 21-6.
14. Fahrenholzt, S. R., Doleiden, F. H., Tozzolo, A. M. & Lamola, A. A. (1974). On the quenching of singlet oxygen by a-tocopherol. *Photochem Photobiol*, 20, 505-9.
15. Foote, C. S., Ching, T. Y. & Geller, G. G. (1974). Chemistry of singlet oxygen. XVlll. Rates of reaction and quenching of alpha-tocopherol and singlet oxygen. *Photochem Photobiol*, 20, 511-513.
16. Foyer, M. V. (1992). The antioxidant effects of thylakoid vitamin E. *Plant cell inviron*, 15, 381-392.
17. Hofius, D., Hajirezaeim, M., Geiger, M., Tschierschh, H., Melzer, M. & Sonnewald, U. (2004). RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiol*, 135, 1256-68.
18. Holmstrom, K. O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, E. T. & Welin, B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temoerature in transgenic tobacco producing glycin betaine. *J. Exp. Bot*, 51, 177-185.
19. Kavi Kishor, P. B., Sangam, S., Amrurha, R. N., Sri Laxmi, P., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Sreenath Rao, Reddy, K. J., Theriappan, P. & Sreenivasulu, N. (2005) Regulation of prolin biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88, 3-10
20. Kerepsi, I. & Galiba, G. (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Sci*, 40, 482-487.
21. Lee, G., Carrow, R. N., Duncan, R. R., Eiteman, M. A. & Rieger, M. W. (2008). Synthesis of organic osmolytes and salt tolerance mechanisms in *Paspalum vaginatum*. *Environ Exp Bot*, 63, 19-27.
22. Lee, G. J., Duncan, R. R. & Carrow, R. N. (2007). Nutrient uptake responses and inorganic ion contribution to solute potential under salinity stress in halophytic seashore paspalums. *Crop Sci*, 47, 2410-2419.
23. Maeda, H., Song, W., Sage, T. L. & DellaPenna, D. (2006). Arabidopsis vitamin E deficient mutants exhibit a cold sensitive phenotype independent of photooxidative damage and suppressed by alterations in membrane polyunsaturated fatty acids. *Plant Cell*, 18, 2710-2732.
24. Munne-Bosch, S. (2002). The function of tocopherol and tocotrienol in plants. *Crit. Rev. Plant Sci*, 21, 31-57.
25. Munne- Bosch, S. (2005). The role of a-tocopherol in plant stress tolerance. *Plant Physiol*, 162, 743-748.
26. Munne´-Bosch, S. & Alegre, L. (2002 a). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 21, 31-57.
27. Munne-Bosch, S., Weiler, E., Alegre, L., Muller, M., Duchting, P. & Falk, J. (2007). A-Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta*, 225, 681-691.
28. Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. & Nakamura, K. (1990). Construction and expression in tabacco of a b-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol*, 31, 805-813.
29. Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Bjorkman, O. & Leegod, R. (1997). Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci*, 2, 119-20.
30. Ouyang, S., He, S., Liu, P., Zhang, W., Zhang, J. & Chen, S. (2010). The role of tocopherol cyclase in salt stress tolerance of rich (*Oryza sativa*). *China Life Sci*, 54, 181-188.
31. Pollard, A. & Wn Jones, R. G. (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta*, 144, 291-298.
32. Ritchie, S. W., Nguyen, H. T. & Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas exchanges parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Sci*, 30, 105-111.
33. Russin, W. A., Evert, R. E., Vanderveer, P. J., Sharkey, T. D. & Briggs, S. P. (1996). Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in a sucrose export defective1 maize mutant. *Plant Cell*, 8,645-58.
34. Sattler, S. E., Gilliland, L. U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M. & DellaPenna, D. (2004). Vitamin E i s essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*, 16, 1419-32.
35. Shen, B., Jensen R. G. & Bohnert, H. J. (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol*, 115, 527-532.
36. Smirnoff, N. & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1057-1060.
37. Trebst, A. (2003). Function of b-carotene and tocopherol in photosystem II. *Z Naturforsch*, 58c, 609-20.

38. Trebst, A., Depka, B. & Hollander-Czytko, H. (2002). A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in Chlamydomonas reinhardtii. *FEBS Lett*, 43, 2157-62.
39. Wagner, P. & Heinecke, J. W. (1997). Copper ions promote peroxidation of low density lipoprotein lipid by binding to histidin residues of apolipoprotein B100, but they are reduced at other sites on LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 3338-3346.
40. Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H. & Zhu, J. K. (2001). The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stressand osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, 13, 2063-2083.
41. Zhao, Y., Aspinall, D. & Paleg, L. G. (1992). Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycinebetaine against the effects of freezing. *Journal of Plant Physiology*, 140, 541-543.
42. Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sci*, 6, 66-71.
43. Zhu, B., Su, J., Chang, M., Verma, D. P. S., Fan, Y. L. & Wu, R. (1998). Overexpression of Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Sci*, 139, 41-48.

Iranian Journal of Filed Crop Science, Vol. 46, No. 3, Autumn 2015

Investigation of Tocopherol cyclase gene overexpression effects on the drought stress tolerance by using of tabacco (*Nicotiana tabacum*) transgenic plants

Nahid Ranaeian[1], Alireza Abbasi[2*] and Hassan Zeinali Khanghah[3]
1, 2, 3. M. Sc. Student, Assistant Professor and Associate Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jun. 22, 2014 - Accepted: Jun. 10, 2015)

ABSTRACT

Environmental stresses trigger a wide variety of plant responses, such as altered gene expression to changes in cellular metabolism and growth. The several plant reactions exist to circumvent the potentially harmful effects caused by light, drought, salinity, pathogen infections and other stresses. a-Tocopherol is the major vitamin E compound found in leaf chloroplasts. This antioxidant deactivates photosynthesis-derived reactive oxygen species and prevents the propagation of lipid peroxidation by scavenging lipid peroxyl radicals in thylakoid membranes. In this study, we used the tabacco plants containing of pBin: At.TC construct that overexpressed the tocopherol cyclase gene. For analysis effect of overexpressed this gene, the transgenic plants were subjected to drought stress and were studied number of physiologic parameters such as, chlorophyls and carotenoid, proline amino acid content, relative water content, membrane permeability, in transgenic and wild type plants in normal and drought stress condition. The results indicated that transgenic plants have increased chlorophyl, proline and relative water content and decreased membrane Permeability in 40 and 60 stress levels, in comparison to wild type plants. Therefore the overexpression of tocopherol cyclase gene in tabacco plants maybe cause increased plant tolerance under drought stress conditions.

Keywords: antioxidant, droght stress, Lipid peroxidation, reactive oxygen species, tocopherol cyclase.

* Corresponding author E-mail: rezabbasi@ut.ac.ir Tel: +98 912 4128709