تأثیر ترهالوز بر سیستم آنتی‌اکسیدانت جهش‌یافته‌های *ntrc* و گیاه وحشی آرابیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*)

انیسه نوروزی پور، مهناز اقدسی* و حمیدرضاصادقی پور

ایران، گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۸

چکیده

ترهالوز دی ساکاریدی است که از دو مولکول گلوکز با پیوند ۱و۱- آلفا و آلفا تشکیل شده است. این قند نقشهای بسیار مهمی در رشد و نمو و مقاومت به تنش در گیاهان بازی می‌کند. $NADP^+$- تیوردوکسین ردکتاز C (NTRC) پروتئینی است که در کنترل چندین واکنش مهم کلروپلاستی نقش دارد. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر ترهالوز بر فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانت گیاه است. به این منظور بذر آرابیدوپسیس تالیانا و گیاه جهش یافته *ntrc* (به عنوان گیاه حساس به تنش اکسیداتیو) به مدت ۱۴ روز بر محیط کشت MS حاوی غلظتهای ۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار ساکارز و یا ترهالوز کشت داده شدند. نتایج نشان داد که تیمار ترهالوز سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیمهای پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، و پلی فنول اکسیداز در گیاهچه وحشی و جهش یافته در مقایسه با تیمار شاهد و ساکارز شده است. همچنین میزان فعالیت این آنزیمها در تیمار ترهالوز در گیاهچه وحشی بالاتر از گیاهچه جهش‌یافته بود. تیمار ترهالوز سبب کاهش میزان پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدهید و افزایش فنول و آنتوسیانین در گیاهچه وحشی در مقایسه با تیمار شاهد شده است. همچنین نتایج نشان داد که در تیمار ترهالوز مقدار پراکسیدهیدروژن گیاهچه‌های وحشی کمتر از لاینهای جهش‌یافته بود. این نتایج نشان می‌دهد که ترهالوز با فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدانت سبب پالایش رادیکالهای آزاد می‌شود. نتایج حاضر می‌تواند در درک چگونگی نقش ترهالوز در مقاومت به تنش در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ترهالوز، تیوردوکسین، جهش‌یافته، *ntrc*، آنتی اکسیدانت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۷۳۲۵۴۸۱۵۹، پست الکترونیکی: aghdasi1346@gmail.com، m.aghdasi@gu.ac.ir

مقدمه

در شرایط عادی، گونه‌های فعال اکسیژن به‌صورت محصولات جانبی در متابولیسم سلولی گیاهان (مانند فتوسنتر، تنفس و غیره) تولید می‌شوند و عنوان مولکولهای پیام‌رسان در انتقال پیام ردوکس عمل می‌کنند (۲، ۱۷ و ۱۸). اما از طرف دیگر برای متابولیسم سلولی گیاه مضر می‌باشند. گونه‌های فعال اکسیژن در تنشهای زیستی و غیرزیستی، به عنوان یک پاسخ عمومی گیاهان به شرایط محیطی نامطلوب، تولید می‌شوند (۳۰). زمانی‌که گونه‌های فعال اکسیژن به میزان زیادی در سلولهای گیاه تولید شوند، شرایطی را به وجود می‌آورند که به آن تنش اکسیداتیو گفته می‌شود. تنش اکسیداتیو می‌تواند باعث تخریب و آسیب اجزای سلولی مانند DNA، پروتئین‌ها، و غشاهای لیپیدی شود (۳ و ۳۲). در گیاهان آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت می‌توانند گیاه را از تنش اکسیداتیو محافظت کنند (۳۳). سیستمهای آنتی‌اکسیداتیو شامل مولکولهای آنتی‌اکسیدانت مثل اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، آلفا توکوفرول و کاروتنوئیدها، و آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت مثل آسکوربات پراکسیدازها (APXs)، کاتالازها (CATs)، گلوتاتیون

ردوکتاز (GLRs)، پراکسیدازها (PODs) و سوپراکسیددیسموتازها (SODs) می‌باشند (۳ و ۳۸).

تیوردوکسین‌ها پروتئینهای کوچک با وزن مولکولی ۱۴-۱۲ کیلودالتون بوده که در تنظیم ردوکس بسیاری از فرآیندهای سلولی دخالت دارند (۲، ۱۳ و ۴۸). در گیاهان نوعی تیوردوکسین به نام NTRC (NADPH-dependent thioredoxin reductase C) وجود دارد که حاوی قلمرو C – ترمینال تیوردوکسینی بوده و در کلروپلاست جای دارد (۵۰). پروتئین NTRC قادر است با استفاده از NADPH، آنتی اکسیدانتهای کلروپلاستی از جمله آنزیم۲-سیستئین پراکسی‌ردوکسین (2-Cys-Prxs) را احیاء و فعال کند و سمیت پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) را خنثی نماید (۳۴، ۴۲ و ۴۳). همچنین NTRC در تنظیم آنزیمهای سنتز کلروفیل (۴۴ و ۴۸) و نشاسته (۳۳) نیز نقش دارد.

پاسخ موجودات زنده به انواع تنشها، انباشتگی قندها و دیگر محلولهای سازگار مشترک است (۲۹). این ترکیبات به عنوان محافظت‌کننده‌های اسمزی عمل کرده و در برخی موارد مولکولهای زیستی را پایدار می‌کنند (۲۲ و ۵۳). یکی از این ترکیبات ترهالوز است. ترهالوز دی‌ساکاریدی غیراحیایی است که از دو مولکول گلوکز با پیوند آلفا ۱ و ۱ ساخته شده است (۱۶). این قند در مراحل مختلف رشد و نمو گیاهان نقشهای مهمی را بازی می‌کند. به عنوان مثال می‌توان به نقش آن در رشد و نمو، گلدهی، مصرف کربن و متابولیسم کربوهیدرات، فتوسنتز و مقاومت به تنش اشاره کرد (۱۲، ۴۰، ۴۷ و ۵۲). نقش ترهالوز در تحمل تنش غیرزیستی برای اولین بار در گیاهان رستاخیزی، مانند گونه‌های مختلف علف‌خوک به اثبات رسیده است. این گیاهان در فصول گرم یا تنش خشکی می‌توانند تقریباً به طور کامل بی‌آب شوند و به محض دریافت مجدد آب دوباره احیا شده و زندگی را از سر گیرند (۱۴ و ۲۷). تجمع ترهالوز در تنشهای غیرزیستی تنها محدود به گیاهان رستاخیزی نبوده و بسیاری از گیاهان در هنگام تنش، ترهالوز را در اندام خاصی انباشته می‌کنند (۱۵ و ۲۰). به عنوان مثال چنانچه گیاه آرابیدوپسیس تالیانا به مدت ۴ ساعت تحت تنش گرما (۴۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گیرد، مقدار ترهالوز در آن تا دو برابر افزایش می یابد و چنانچه به مدت ۴ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد میزان این قند تا ۸ برابر افزایش می‌یابد (۲۸). تیمار گیاه برنج با قند ترهالوز به طور معنی‌داری آسیب ناشی از تنش شوری را کاهش می‌دهد (۱۹).

بررسیها نشان داده است که بسیاری از ژنهای درگیر در متابولیسم ترهالوز در آرابیدوپسیس تالیانا به طیف وسیعی از تنشهای غیرزیستی مانند سرما، شوری و UV پاسخ می‌دهند (۲۳). همچنین تیمار گیاهچه‌های آرابیدوپسیس با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز، سبب تحریک بیان ژنهای پراکسیداز، پراکسیداز ۴۲ (PER42)، پرولین اکسیداز (POX)، L- آسکوربات پراکسیداز تیلاکوییدی (tAPX)، و ژنهای مرتبط با متابولیسم ثانویه می‌شود (۱).

نقش ترهالوز در محافظت در برابر رادیکالهای آزاد اکسیژن به اثبات رسیده است (۳۷). این ویژگی در میکروارگانیسمها و گیاهانی که ترهالوز را به مقدار زیاد انباشته می‌کنند، اهمیت ویژه‌ای دارد (۳۵). شواهد نشان داده است که قند ترهالوز به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت عمل می‌کند. به عنوان مثال زمانی‌که مخمر در معرض پراکسید هیدروژن قرار گیرد مقدار قابل توجهی ترهالوز در درون سلولهای خود انباشته می‌کند که با محافظت از پروتئینها، از آسیب اکسیداتیو جلوگیری خواهد کرد. از طرفی دیگر چنانچه سلولهای مخمر با محلول ۱۰ درصد ترهالوز تیمار شوند، نسبت به H_2O_2 مقاوم‌تر خواهند شد (۷). گیاه گندم نیز زمانی که در معرض تنش گرما قرار گیرد، با افزایش مقدار ترهالوز درونی، رادیکالهای تولید شده را خنثی می‌کند (۲۷). در شرایط *in vitro*، ترهالوز به طور قابل توجهی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع را از طریق

برهمکنش ضعیف با پیوندهای دوگانه، کاهش می‌دهد (۳۹).

در حال حاضر شواهد متناقضی در ارتباط با نقش ترهالوز در زندگی و رشد گیاهان وجود دارد. برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که تیمار گیاهان با ترهالوز سبب تنش اکسیداتیو شده و برخی دیگر از گزارشها به نقش محافظتی ترهالوز در برابر تنشها و ایجاد مقاومت در گیاهان اشاره دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی سیستم آنتی‌اکسیدانت گیاهان در تیمار ترهالوز در رقم وحشی آرابیدوپسیس(Col-0) و جهش‌یافته‌های *ntrc* (به عنوان گیاهان حساس به تنش اکسیداتیو) انجام شده است.

مواد و روشها

شرایط کشت: در این آزمایش از بذرهای *Arabidopsis thaliana* رقم کلمبیا صفر (Col-0) و بذرهای دو لاین جهش‌یافته *ntrc* (۰۹۶۷۷۶ و ۱۱۴۲۹۳) (SALK_096776, SALK_114293)، اهدایی از گروه پروفسور Rintamäki و Lepistö از کشور فنلاند، انجام شده است. جایگاه ورود T-DNA در این دو جهش‌یافته به ترتیب در اینترون ۸ و اگزون ۹ است. بذرها ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در آب ژاول ۲۰ درصد قرار گرفتند. بعد از اتمام مراحل ضدعفونی، بذرها با آب مقطر استریل ۵ بار شستشو داده شده و در ۳ نوع محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) (شاهد)، محیط کشت MS حاوی غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار ساکاروز و محیط کشت MS حاوی غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز کشت داده شدند. در هر پتری ۵۰ بذر و هر تیمار با ۵ تکرار انجام شد. به منظور استراتیفیکاسیون پتری‌های حاوی بذور به مدت سه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند و بعد از آن به اتاقک رشد با دمای ۲± ۲۴ درجه سانتی گراد در شرایط روز بلند (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه انتقال یافتند. پس از گذشت ۱۴ روز گیاهچه‌ها جهت بررسی پارامترهای بیوشیمیایی برداشت شدند.

استخراج و سنجش آنزیمهای آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز محلول و پلی فنول اکسیداز: مقدار ۰/۰۵ گرم بافت گیاهی در هاون چینی سرد با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات مونوسدیک ۰/۱ مولار با اسیدیته ۶/۸ هموژن شد. هموژن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از روشناور (سوپرناتانت) به دست آمده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمها استفاده شد (۲۴).

فعالیت آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز با استفاده از روش Maehly و Chance (۱۹۵۵) و فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز بر اساس روش Mishra و Kar (۱۹۷۶) همراه با تغییراتی اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش آنزیم کاتالاز با حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر، شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۶/۸، آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. با افزودن سوبسترا (H_2O_2) به محیط واکنش، تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم شروع و سپس تغییرات جذب نور محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۱۲۰ ثانیه ثبت شد. در نهایت فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده (ضریب خاموشی $40\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) در دقیقه به ازای گرم وزن تر بافت بیان گردید (۹).

مخلوط واکنش آنزیم گایاکول پراکسیداز با حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با اسیدیته ۶/۸، گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۴۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن آغاز شد. تغییرات جذب نور محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱۲۰ ثانیه ثبت گردید. در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میکرومول تتراگایاکول تشکیل شده (ضریب

خاموشی $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۲۶/۶) در دقیقه به ازای گرم وزن تر بافت بیان گردید (۹).

مخلوط واکنش آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز با حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل بافرفسفات ۲۵ میلی‌مولار با اسیدیته ۶/۸، پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار و۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه و با افزودن پیروگالل به محلول واکنش، فعالیت آنزیمی آغاز شد. تغییرات جذب نور محلول نسبت به شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر برای مدت ۱۲۰ ثانیه ثبت شد. در نهایت فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز بر اساس میکرومول پورپوروگالین تشکیل شده (ضریب خاموشی $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۲/۴۷) در دقیقه به ازای گرم وزن تر بافت بیان شد (۲۵).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش Asada و Nakano (۱۹۸۱) با اندکی تغییرات انجام شد (۳۶). مخلوط واکنش به حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر شامل بافر فسفات مونوسدیک ۲۵۰ میلی مولار (pH= ۷)، اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۱/۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. کاهش جذب نور ناشی از پراکسیداسیون اسید آسکوربیک در طول موج۲۹۰ نانومتر به مدت ۱۲۰ ثانیه ثبت گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی (ε) معادل $۲/۸mmol.L^{-1}.cm^{-1}$ مربوط به آسکوربات محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از ریبوفلاوین و متیونین در حضور نور جهت تولید رادیکالهای سوپراکسید اندازه‌گیری شد. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات مونوسدیک ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷/۸، EDTA ۰/۶۶ میلی‌مولار، متیونین ۱۰ میلی‌مولار، NBT ۳۳ میکرومولار، ریبوفلاوین ۰/۰۰۳۳ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که شاهد در تاریکی و نمونه در معرض تابش نور سفید قرار گرفت. بعد از تابش نور به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نور در طول موج ۵۶۰ نانومتر بر اساس ممانعت از تولید مونوفورمازان (احیای NBT) اندازه‌گیری و اختلاف جذب زمان صفر و ۱۵ دقیقه تعیین شد. میزان مهارکنندگی احیای نوری NBT توسط عصارهٔ آنزیمی هر نمونه در مقایسه با اختلاف جذب نور زمان صفر و ۱۵ دقیقه واکنش شاهد (بدون آنزیم) مطابق فرمول زیر تععین گردید. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معادل با ۵۰ درصد مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم به فورامازون تعریف شد. در نهایت فعالیت آنزیم براساس واحد سوپراکسید دیسموتاز بر دقیقه بر گرم وزن تر گیاه گزارش شد (۶).

$$(Unit)/_{min} = 2(1 - \frac{\Delta A \text{ واکنش هرنمونه}}{\Delta A \text{ واکنش شاهد}})$$

اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن: مقدار پراکسید هیدروژن با استفاده از رنگ‌سنجی و بر طبق روش Sergive و همکاران (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد (۴۹).

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید: اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید با استفاده از اندازه‌گیری مقدار مالون دی آلدهید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید صورت گرفت (۴۴). در نهایت عصاره به دست آمده در مد فتومتریک و در سه طول موج ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و براساس نانومول مالون دی آلدهید تولید شده در یک گرم بافت تر گیاه بیان شد.

اندازه گیری مقدار کلروفیل: اندازه‌گیری کلروفیل به روش Arnon (۱۹۴۹) انجام گرفت (۴). به این منظور مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر بخش هوایی با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. در نهایت قسمت بالایی عصاره جدا شده و حجم نهایی آن به ۸ میلی‌لیتر رسید. سپس میزان جذب آن در دو طول موج ۶۴۵ و ۶۶۳ و ۶۷۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. در نهایت مقدار کلروفیل بر اساس مقدار میلی‌گرم کلروفیل به ازای یک گرم وزن تر گیاه نشان داده شد.

اندازه‌گیری مقدارآنتوسیانین: به روش Mita و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد (۳۱). مقدار ۰/۰۲ گرم بافت تازه گیاه در ازت مایع خرد شده و سپس ۴ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد اسید کلریدریک در متانول به آن اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. جذب نور در فاز رویی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موجهای ۵۳۰ و 576 نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر، میزان نسبی آنتوسیانین تعیین شد.

$A= A_{550}- (0.25\ A_{657})$

A= میزان نسبی آنتوسیانین

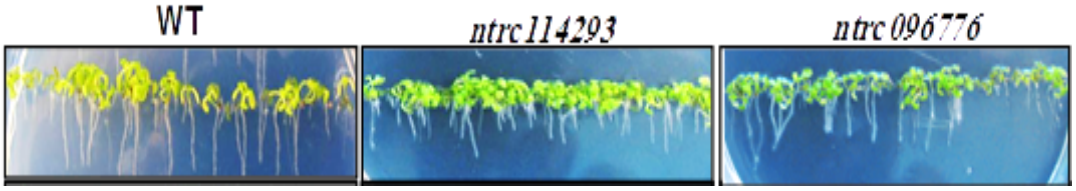
A_{530} و A_{657} به ترتیب جذب نور نمونه در طول موجهای ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر است.

اندازه‌گیری فنول محلول: میزان فنول کل در عصاره‌های استخراج شده با استفاده از معرف فولین‌سیوکالتیو (Folin-CiocalteuReagent) تعیین شد (۱۸). ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج‌شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر از فیلتر میلی‌پور (۰/۴۵ µm) عبور داده شده و با ۱/۲۵ میلی لیتر از معرف فولین‌سیوکالتیو ۰/۲ مولار مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه قرارگیری در دمای محیط، یک میلی لیتر محلول Na_2CO_3 (۷/۵ گرم در لیتر) به آنها اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط مجدداً انکوبه شد. سپس جذب محلول در طول موج nm ۷۶۰ خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد غلظتهای مختلفی از اسید گالیک (۲ ،۱/۵، ۱ ، ۰/۵ ، ۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه و طول موج آن در در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان فنول کل عصاره‌های استخراج شده بر مبنای میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره استخراج شده محاسبه شد.

تجزیه و تحلیلهای آماری: آزمایشها با ۴ تکرار و در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با نرم افزار SAS مورد بررسی قرار گرفت و میانگینها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

در این مطالعه از گیاه وحشی آرابیدوپسیس لاین Col-0 و دو لاین جهش‌یافته *ntrc* ۰۹۶۷۷۶ و ۱۱۴۲۹۳ استفاده شد- و جایگاه ورود T-DNA در آنها به ترتیب در اینترون ۸ و اگزون ۹ است. فنوتیپ بارز این جهش‌یافته‌ها رنگ سبز پریده و سرعت رشد در آنها کمتر از گیاهچه‌های وحشی آرابیدوپسیس بود (شکل ۱).



شکل۱- فنوتیپ گیاهچه‌های ۱۴ روزه وحشی (WT) و دو لاین جهش یافته *ntrc* (۰۹۶۷۷۶ و ۱۱۴۲۹۳) رشد یافته در محیط کشت پایه MS .

اثر تیمار ترهالوز بر فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانتی در جهش‌یافته‌های *ntrc* و گیاه وحشی آرابیدوپسیس: گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی رشدیافته بر روی محیط کشت پایه MS (شاهد) و یا محیط کشت حاوی ساکاروز تفاوت معنی‌داری را در فعالیت آنزیم کاتالاز نشان ندادند. در تیمار ترهالوز فعالیت آنزیم کاتالاز در جهش‌یافته‌های *ntrc* نسبت به گیاه وحشی ۴۰ درصد افزایش نشان داد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ترهالوز و در همه گیاهان وحشی و جهش‌یافته، در مقایسه با تیمار شاهد و ساکاروز بالاتر بود (شکل ۲-الف). همچنین نتایج تجزیه

واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که فاکتور تیمار در سطح کمتر از ۱ درصد، و فاکتور رقم و اثر متقابل تیمار و رقم در سطح کمتر از ۵ درصد تأثیر معنی‌داری را در فعالیت آنزیم ایجاد کردند (جدول ۱).

همچنین نتایج حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در بین گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی رشدیافته بر روی محیط کشت پایه MS تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد. در تیمار ساکاروز نیز میزان فعالیت آنزیم در گیاهچه‌های وحشی و جهش‌یافته‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. در حالی‌که تیمار ترهالوز سبب افزایش ۳۰ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در گیاهچه‌های مورد بررسی در مقایسه با تیمار شاهد شد. این در حالی است که در جهش‌یافته‌های *ntrc* فعالیت این آنزیم نسبت به گیاه وحشی کمتر بود (شکل ۲–ب).نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول نیز نشان داد که فاکتور تیمار در سطح کمتر از ۵ درصد و اثر متقابل تیمار و رقم گیاهی تأثیر معنی‌داری در سطح در فعالیت آنزیم نشان ندادند (جدول ۱).

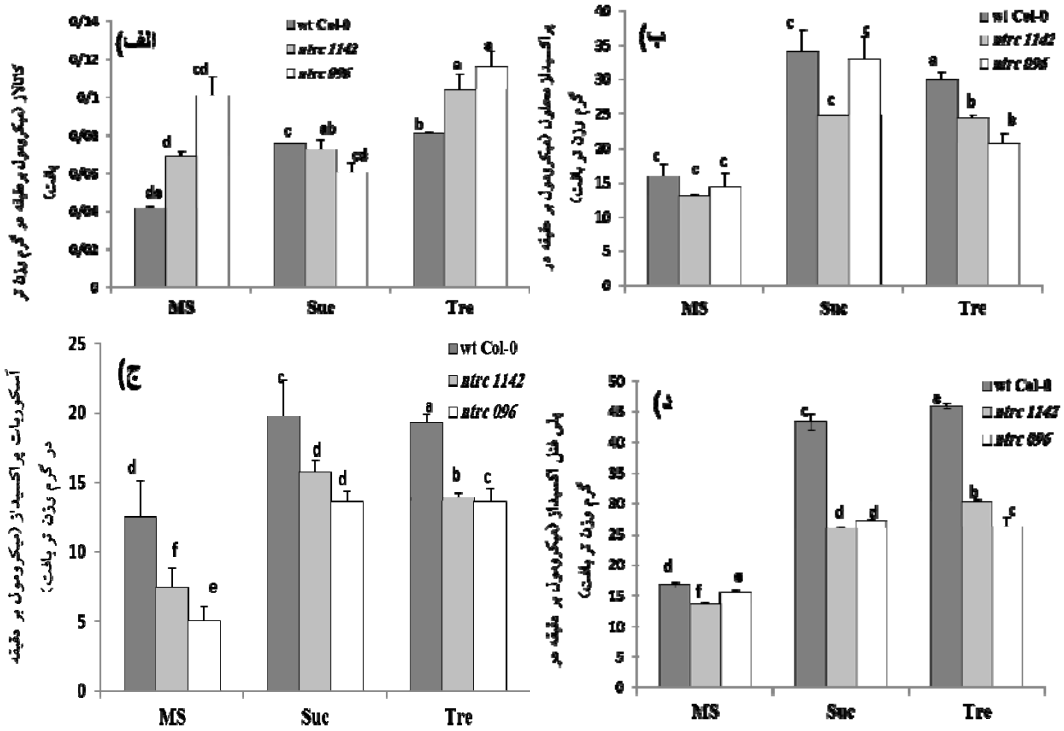
در گیاهچه‌های جهش‌یافته *ntrc* رشد یافته در محیط کشت Ms، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در نسبت به گیاهچه‌های وحشی پایین‌تر بود. اما کاهش معنی دار فعالیت آنزیم تنها در جهش‌یافته لاین ۰۹۶۷۷۶ مشاهده شد. تیمار ساکاروز تفاوت معنی‌داری را در فعالیت آنزیم، بین گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی ایجاد نکرد. تیمار ترهالوز سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه‌های مورد بررسی در مقایسه با تیمار شاهد و ساکاروز شد. اما در لاینهای جهش‌یافته میزان فعالبت آنزیم به طور معنی‌داری کمتر از گیاهچه‌های وحشی بود (شکل ۲–ج). همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد که تنها اثر فاکتور رقم در سطح کمتر از ۱ درصد تأثیر معنی-داری در فعالیت آنزیم دارد (جدول ۱).

در تمامی تیمارهای مورد بررسی، فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در گیاهچه‌های وحشی به طور معنی‌داری بیشتر از لاین جهش‌یافته بود. تیمار ترهالوز باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم در گیاهچه‌های وحشی و جهش‌یافته نسبت به تیمار شاهد و ساکاروز شد. اما میزان فعالیت این آنزیم در جهش‌یافته‌ها نصف فعالیت آن در گیاهچه‌های وحشی بود. در کل فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در هر سه تیمار مورد مطالعه، در دو لاین جهش‌یافته به طور معنی‌داری کمتر از گیاه وحشی بود (شکل ۲–د). نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز نشان داد که اثر فاکتورهای رقم و نوع تیمار و نیز اثر متقابل رقم و تیمار تأثیر معنی‌داری در سطح کمتر از ۱ درصد بر فعالیت آنزیم داشتند (جدول ۱).

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تیمار شاهد، تفاوت معنی‌داری را بین گیاهچه‌های وحشی و لاینهای جهش‌یافته *ntrc*، نشان نداد. همین نتیجه در تیمار ساکاروز نیز مشاهده شد. گیاهچه‌های وحشی و لاینهای جهش‌یافته *ntrc* رشد یافته در محیط کشت MS و یا محیط حاوی ۱۰۰ میلی مولار ساکارز تفاوت معنی‌داری از نظر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نداشتند. اما تیمار ترهالوز باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گیاهچه‌های وحشی شد و جهش‌یافته‌های *ntrc* به طور معنی‌داری فعالیت کمتری را نشان دادند. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گیاهچه‌های وحشی تیمار شده با ترهالوز در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی شاهد و گیاهچه-های وحشی تیمار شده با ساکاروز به طور معنی‌داری بیشتر بود. (شکل ۳–الف). همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نشان داد که اثر فاکتور رقم و تیمار بر فعالیت آنزیم تأثیری نداشت، اما اثر متقابل رقم و تیمار تأثیر معنی‌داری در سطح کمتر از ۱درصد بر فعالیت آنزیم داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس فاکتورهای اندازه‌گیری شده مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدانتی در گیاهچه‌های ۱۴ روزه وحشی و جهش‌یافته‌های *ntrc* رشد یافته در محیط کشت MS با و یا بدون غلظت ۱۰۰ میلی-مولار ساکارز و یا ترهالوز.

Dependent variable	DF	Polyphenol 0xidase	catalase	Ascorbate peroxidase	Gaiacol peroxidase	Superoxide desmutase	phenol	Lipid peroxidation	Peroxide hydrogen	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll total	Carotenoid &xantophyll	anthocyanin
Trt	2	72.0232**	0.002755**	6.88480ns	603.247435**	225.159273ns	11.071511ns	210.09321**	0.24183204**	0.01107342**	0.00224126**	0.02284568**	0.18265788*	169.1616**
Type	2	723.032**	0.001611*	127.8624**	82.169323ns	224.745045ns	127.105685**	20.542512*	0.00084739ns	0.00384125*	0.00163669**	0.01034602*	0.16018459ns	158.8641**
Trt*typ	4	15.8264**	0.001110*	7.10306ns	34.144270ns	523.542746**	9.8095914*	7.171192ns	0.09419752**	0.01394916**	0.00170238**	0.02530692**	0.53522703**	158.8596**
Error	18	1.736298	0.000098	7.9176526	10.429901	113.646982	4.2930057	3.934505	0.01181924	0.00130183	0.00021851	0.00251656	0.04872696	1.242281
Total	26													



شکل ۲- مقایسه فعالیت آنزیم الف)کاتالاز، ب) پراکسیداز، ج) آسکوربات محلول و د) پلی فنول اکسیداز در گیاهچه‌های ۱۴ روزه وحشی (WT) و دو لاین جهش یافته *ntrc* (۰۹۶۷۷۶ و ۱۱۴۲۹۳) رشدیافته در محیط کشت پایه MS ، محیط کشت MS حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار ساکاروز و یا ۱۰۰ میلی مولار ترهالوز. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± خطای معیار هستند. حروف یکسان، بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است. ستونهای دارای حداقل یک حرف مشترک، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ($P < 0/05$).

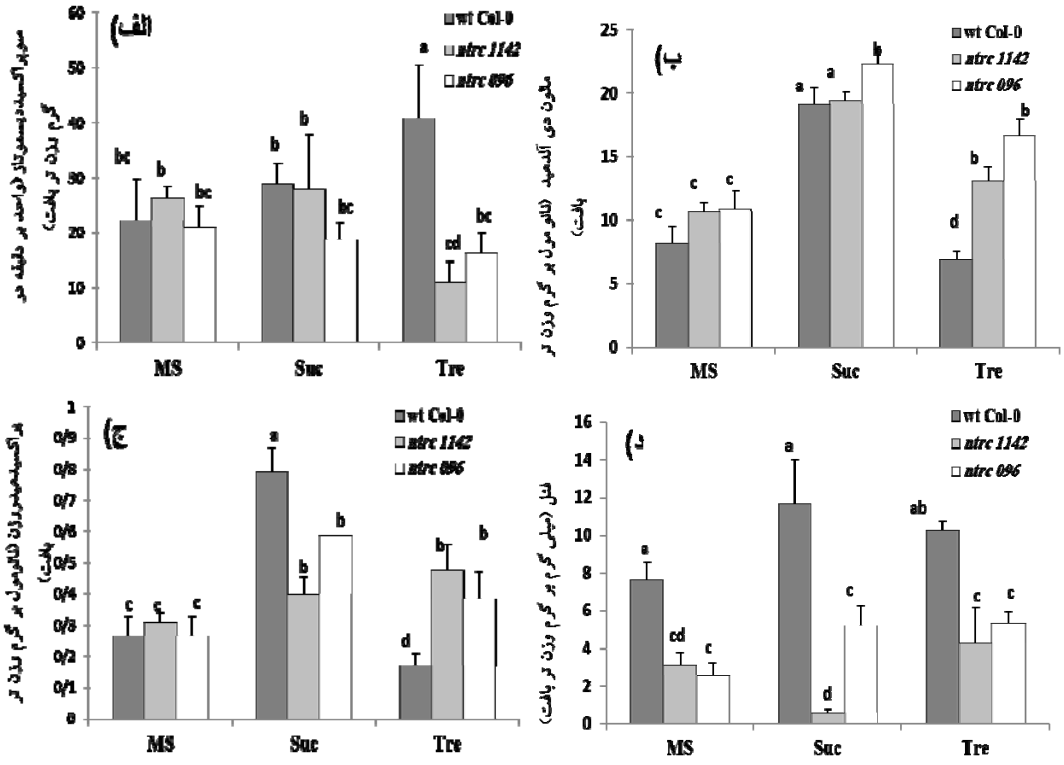
میزان مالون‌دی‌آلدهید تولید شده در طی پراکسیداسیون لیپید تفاوت معنی‌داری را بین گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی در تیمار شاهد و ساکاروز، نشان ندادند. اما در تیمار ترهالوز، میزان پراکسیداسیون لیپید در جهش‌یافته‌های *ntrc* دو برابر بیشتر از گیاهچه‌های وحشی بود. همچنین تیمار ترهالوز باعث کاهش معنی‌دار میزان پراکسیداسیون لیپید در گیاه وحشی، درمقایسه با گیاهچه‌های وحشی تیمارهای شاهد و ساکاروز شد (شکل ۳-ب). از طرفی نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به پراکسیداسیون لیپید نشان داد که اثر فاکتور تیمار و رقم به طور مجزا به ترتیب در سطح کمتر از ۱درصد و کمتر از ۵ درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان پراکسیداسیون لیپید داشتند و اثر متقابل بین دو فاکتور اثری بر مقدار پراکسیداسیون لیپید نداشت (جدول ۱).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بین لاینهای جهش‌یافته و وحشی رشد یافته در محیط کشت MS (تیمار شاهد) تفاوت معنی‌داری در مقدار پراکسیدهیدروژن تولید شده وجود نداشت. در تیمار ساکاروز مقدار پراکسیدهیدروژن در دو لاین جهش‌یافته نسبت به گیاهچه‌های وحشی کاهش معنی‌داری نشان داد. اما در تیمار ترهالوز، میزان پراکسیداسیون هیدروژن در جهش‌یافته‌های *ntrc* دو برابر بیشتر از گیاهچه‌های وحشی بود. همچنین مقایسه بین تیمارها نشان داد که میزان پراکسیدهیدروژن در تیمار ترهالوز و در گیاهچه‌های وحشی نسبت به تیمار ساکاروز و شاهد کمتر بود (شکل ۳-ج). همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به پراکسید هیدروژن نشان داد که اثر فاکتور تیمار به طور مجزا و اثر متقابل دو فاکتور تیمار و رقم در سطح کمتر از ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر مقدار

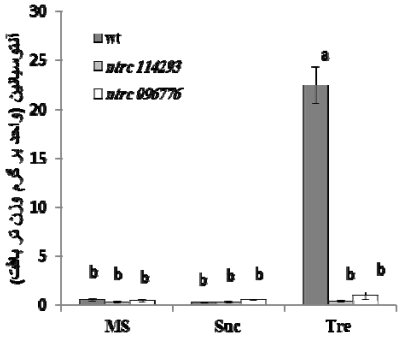
پراکسید هیدروژن داشتند و فاکتور رقم در سطح کمتر از ۵ درصد بر میزان پراکسید هیدروژن اثر داشت (جدول ۱).

در تیمار شاهد مقدار فنول تولید شده در لاینهای جهش-یافته دو برابر کمتر از گیاهچه‌های وحشی بود. همین طور در تیمار ساکاروز و ترهالوز مقدار فنول تولید شده در جهش‌یافته‌های *ntrc* در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی به طور معنی‌داری کمتر بود (شکل ۳-د). همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مقدار فنول نشان داد که اثر فاکتور رقم به طور مجزا و اثر متقابل دو فاکتور به ترتیب در سطح کمتر از ۱ درصد و کمتر از ۵ درصد تأثیر معنی‌داری بر مقدار فنول داشته و فاکتور تیمار اثری بر مقدار فنول نداشت (جدول ۱).

اثر تیمار ترهالوز بر میزان آنتوسیانین در جهش‌یافته‌های *ntrc* و گیاه وحشی: مقدار آنتوسیانین در گیاهچه‌های وحشی و جهش‌یافته‌های *ntrc* در تیمارهای شاهد و ساکاروز بسیار اندک بوده و تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند. درحالی که در تیمار ترهالوز مقدار آنتوسیانین در گیاهچه‌های وحشی ۲۵ برابر بیشتر از لاینهای جهش-یافته افزایش یافت. اما تیمار ساکاروز و ترهالوز اثر معنی-داری بر میزان آنتوسیانین در جهش‌یافته‌های *ntrc* نداشتند (شکل ۴). نتایج تجزیه واریانس داده های مربوط به مقدار آنتوسیانین نشان داد که اثر هر سه فاکتور تیمار، رقم و اثر متقابل دو فاکتور در سطح کمتر از ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان آنتوسیانین داشتند (جدول ۱).



شکل ۳– الف) فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، ب) مقدار مالون در آلدهید، ج) پراکسید هیدروژن و د) فنول محلول در گیاهچه‌های ۱۴ روزه وحشی (WT) و دو لاین جهش یافته *ntrc* (۰۹۶۷۷۶ و ۱۱۴۲۹۳) رشد یافته در محیط کشت پایه MS ، محیط کشت MS حاوی غلظت ۱۰۰ میلی مولارساکاروز و یا ترهالوز. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± خطای معیار هستند. حروف یکسان، بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است. ستونهای دارای حداقل یک حرف مشترک، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ($P < 0/05$).



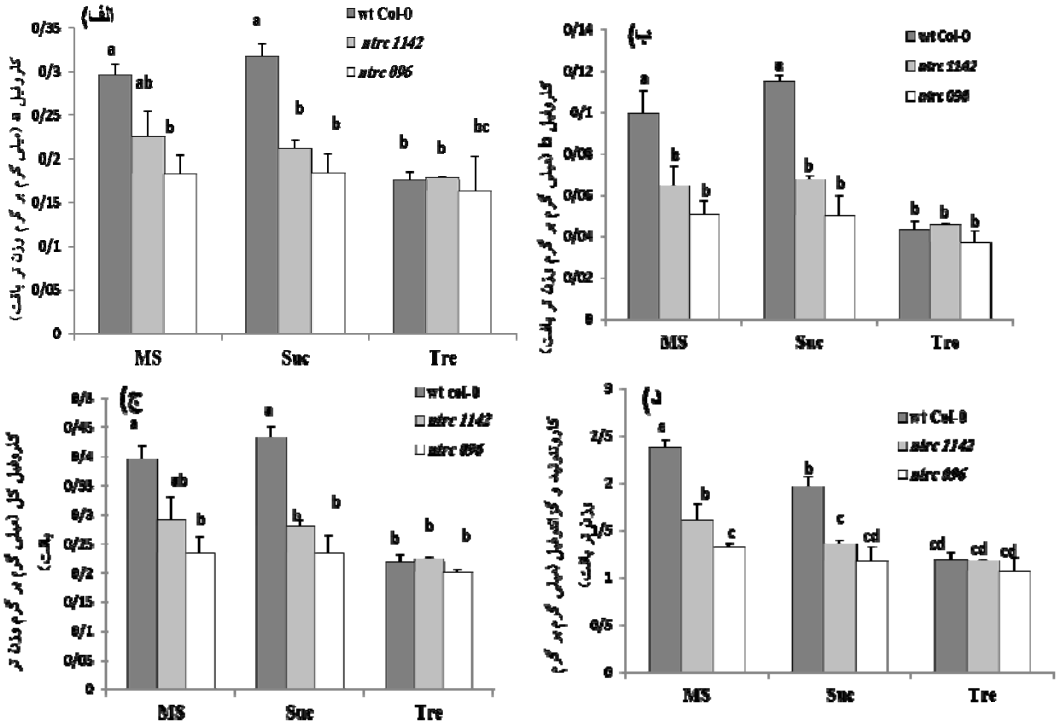
شکل ۴- میزان آنتوسیانین در گیاهچه‌های ۱۴ روزه وحشی (WT) و دو لاین جهش یافته *ntrc* (۰۹۶۷۷۶ و ۱۱۴۲۹۳) رشد یافته در محیط کشت پایه MS، محیط کشت MS حاوی غلظت ۱۰۰ میلی مولارساکاروز و یا ترهالوز. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± خطای معیار هستند. حروف یکسان، بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ > P است. ستونهای دارای حداقل یک حرف مشترک، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ($P < 0/05$).

اثر تیمار ترهالوز بر میزان کلروفیل و کاروتنوئید و گزانتوفیل: مقدار کلروفیل a، b، و کل در جهش‌یافته *ntrc* لاین ۰۹۶۷۷۶ در تیمار شاهد و ساکاروز نسبت به گیاهچه‌های وحشی کاهش معنی‌داری را نشان دادند، اما در تیمار ترهالوز تفاوت معنی‌داری از نظر محتوای کلروفیل بین گیاهچه‌های جهش‌یافته و وحشی دیده نشد. محتوای کلروفیل a ، b، و کل در گیاهچه‌های وحشی در تیمار ترهالوز در مقایسه با تیمار شاهد و ساکاروز کاهش معنی-دار یافت. بررسی مقدار کلروفیل در لاینهای جهش‌یافته نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود ندارد (شکل ۵-الف، ب و ج). همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مقدار کلروفیل نشان داد که فاکتور اثر تیمار به طور مجزا در سطح کمتر از ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر مقدار کلروفیل a، b، و کل داشت. و فاکتور رقم به طور مجزا در سطح کمتر از ۱درصد بر کلروفیل b و کمتر از ۵ درصد بر کلروفیل a و کل نشان داد. اثر متقابل دو فاکتور نیز در سطح کمتر از ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر هر سه کلروفیل a، b، و کل نشان داد (جدول ۱).

محتوای کاروتنوئید و گزانتوفیل در لاینهای جهش‌یافته *ntrc* در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی رشد یافته در محیط کشت MS (تیمار شاهد) کاهش معنی‌داری نشان دادند (۳۵ درصد کاهش). نتایج مشابهی درگیاهچه‌های تیمار شده با ساکاروز دیده شد. اما در تیمار ترهالوز تفاوت معنی‌داری بین گیاهچه‌های وحشی و لاینهای جهش‌یافته مشاهده نشد. مقدار کاروتنوئید و گزانتوفیل گیاهچه‌های وحشی در تیمار ترهالوز در مقایسه با تیمار شاهد و ساکاروز کاهش معنی‌داری نشان داد. درحالی‌که جهش‌یافته‌ها تفاوت قابل توجهی را در تیمارهای مختلف نشان ندادند (شکل ۵-د). همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مقدار کاروتنوئید و گزانتوفیل نشان داد که اثر فاکتور تیمار به طور مجزا در سطح کمتر از ۵ درصد تأثیر معنی‌داری بر مقدار کاروتنوئید و گزانتوفیل داشت. و فاکتور رقم به طور مجزا اثری بر فعالیت آنزیم نداشت. اثر متقابل دو فاکتور در سطح کمتر از ۱درصد تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم نشان داد (جدول ۱).

بحث

تاکنون گزارشهای متعددی از ویژگیهای شیمیایی و فیزیکی ترهالوز و نیز نقش آن در پاسخهای دفاعی در مخمر، قارچها، باکتریها و گیاهان منتشر شده است (۲۳، ۳۶، ۴۲ و ۴۵). از طرفی دیگر نقش پروتئین NTRC در کنترل واکنشهای مهم چندگانه کلروپلاستی از جمله احیای پروکسی‌ردوکسین و محافظت در مقابل تنش اکسیداتیو به اثبات رسیده است. این پژوهش با هدف بررسی اثر تیمار ترهالوز بر فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانت دو لاین جهش-یافتهٔ *ntrc* (۱۱۴۲۹۳ و ۰۹۶۷۷۶) و گیاهچه‌های وحشی آرابیدوپسیس انجام شده است.



شکل ۵- مقدار الف) کلروفیل a، ب) کلروفیل b، ج) کلروفیل کل و د) کاروتنویید و گزانتوفیل در گیاهچه‌های ۱۴ روزه وحشی (WT) و دو لاین جهش یافته *ntrc* (۰۹۶۷۷۶ و ۱۱۴۲۹۳) رشد یافته در محیط کشت پایه MS، محیط کشت MS حاوی غلظت ۱۰۰ میلی مولارساکاروز و یا ترهالوز. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± خطای معیار هستند. حروف یکسان، بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است. ستونهای دارای حداقل یک حرف مشترک، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ($P < 0/05$).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تیمار ترهالوز سبب افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، و سوپراکسید دیسموتاز در گیاهچه-های وحشی و لاینهای جهش‌یافته (به استثنای سوپراکسید دیسموتاز) نسبت به تیمار شاهد و ساکاروز شده است.

از طرفی فعالیت این آنزیمها (به استثنای کاتالاز) در گیاهچه‌های وحشی تحت تیمار ترهالوز نسبت به جهش-یافته‌ها بالاتر بود. همچنین در تیمار ترهالوز مقدار پراکسید هیدروژن تولید شده در گیاهچه‌های وحشی نسبت به تیمار شاهد و ساکاروز کاهش یافت. علاوه بر این مقدار پراکسیدهیدروژن گیاهچه‌های وحشی کمتر از لاینهای جهش‌یافته بود. این نتایج بیانگر نقش مؤثر آنزیمهای آنتی اکسیدانت در پالایش پراکسیدهیدروژن است. به عبارتی تیمار ترهالوز منجر به کاهش مقدار پراکسیدهیدروژن در گیاهچه وحشی شده و به دنبال آن پراکسیداسیون لیپید نیز کاهش یافته است. اندازه‌گیری مقدار پراکسیداسیون لیپید نشان داد که تیمار ترهالوز در مقایسه با تیمار شاهد و ساکاروز، باعث کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدهید در گیاهچه-های وحشی شده و نیز میزان پراکسیداسیون لیپید گیاهچه-های وحشی در مقایسه با لاینهای جهش‌یافته‌ها کمتر بود. در شرایط *in vitro*، ترهالوز به طور قابل توجهی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع را از طریق برهمکنش ضعیف با پیوندهای دوگانه، کاهش می‌دهد. ترهالوز با یک پیوند دوگانه با اسید چرب غیر اشباع برهمکنش نشان داده و یک کمپلکس پایدار تشکیل می‌دهد که منجر به کاهش معنی‌دار در سطوح اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌گردد (۳۹). در مخمر در شرایط تنش کم آبی، ترهالوز سطح پراکسیداسیون لیپید را کاهش می-

دهد (۴۱). از طرفی تیمار سلولهای مخمر با ترت بوتیل هیدروپراکسید (پراکسید آلی که غشای پلاسمایی را مورد هدف قرار می‌دهد) نشان داد که وجود ترهالوز در دو طرف دو لایه لیپیدی برای حفاظت از غشاء مورد نیاز است (۲۲). همچنین در بسیاری از موجودات، ترهالوز به عنوان یک پایدار کننده بهتر نسبت به سایر قندها برای محافظت از غشاها و مولکولهای زیستی و یک محلول سازگار گزارش شده است (۵، ۱۱ و ۱۶). یکی از اصلی‌ترین پیامدهای تنش از جمله تنش اکسیداتیو، افزایش مقدر گونه‌های فعال اکسیژن و به دنبال آن تخریب پروتئینها، غشاها و افزایش پراکسیداسیون لیپید است (۳ و ۳۲). نتایج این پژوهش نیز نشان داده که بین فعالیت آنزیمهای پالاینده پراکسیدهیدروژن و مقدار پراکسیدهیدروژن و نیز میزان پراکسیداسیون لیپید هماهنگی وجود دارد. به نظر می‌رسد نقص در پروتئین NTRC، احتمالاً سیستم کنترل ردوکس برخی آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت را تحت تأثیر قرار داده است. گزارشهای دیگر نیز نشان داده که برخی از آنزیمهای آنتی اکسیدانت از جمله، کاتالاز، و آسکوربات پراکسیداز از اهداف بالقوه تیوردوکسین‌ها می‌باشند (۲). نتایج حاضر نشان داد که جهش یافته‌های *ntrc* در مقایسه با گیاهچه-های وحشی مقدار پراکسید هیدروژن کمتری را در تیمار ترهالوز پالایش کرده‌اند. به همین دلیل مقدار پراکسید هیدروژن در جهش‌یافته ها با تیمار ترهالوز نسبت به تیمار شاهد و نیز در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی بیشتر بوده است. گزارشهای دیگر نیز نقش NTRC را در سمیت‌زدایی پراکسیدهیدروژن نشان داده‌اند (۴۲). اما مقدار پراکسید هیدروژن جهش‌یافته‌ها در تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را با گیاهچه‌های وحشی نشان نداد. در تیمار ساکاروز نیز مقدار پراکسید هیدروژن جهش‌یافته‌ها کمتر از نمونه - وحشی بود. به نظر می‌رسد در جهش‌یافته‌های *ntrc* با خاموش‌شدن سیستم 2-Cys Prxs وابسته به NTRC، سیستمهای سوپراکسید دیسموتاز وابسته به آسکوربات و آسکوربات پراکسیداز در سمیت‌زدایی H_2O_2 در این گیاهان نقش جبرانی داشته باشند (۲۶).

مقدار فنول در گیاهچه‌های وحشی تحت تیمار ترهالوز در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی شاهد افزایش یافت. افزایش محتوای فنول می‌تواند دلیل دیگری بر افزایش مقاومت گیاه وحشی در تیمار ترهالوز باشد. فنولها از ترکیبات دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانتی می‌باشند و به عنوان عوامل دهنده الکترون یا هیدروژن، سلولها را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند و باعث پایداری غشای سلولی می‌شوند (۸ و ۵۱). گیاهچه‌های جهش‌یافته از نظر مقدار فنول، تفاوت معنی‌داری را در تیمار ترهالوز نسبت به جهش‌یافته‌های شاهد نشان ندادند. همچنین در تمامی تیمارهای مورد بررسی مقدار فنول در جهش‌یافته‌ها کمتر از گیاهچه‌های وحشی بود. نقش پروتئین NTRC در تنظیم ردوکس اولین آنزیم مسیر شیکیمات (DAHP) در تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنولی به اثبات رسیده است (۲۵)، بنابراین دلیل کاهش مقدار ترکیبات فنولی در جهش‌یافته‌های *ntrc* می‌تواند همین امر باشد. ترکیبات فنولی به عنوان آنتی‌اکسیدانتهای طبیعی در گیاه بوده و با دارا بودن ویژگیهای ردوکس (۲۱) مقادیر بهینه آن می‌تواند حاکی از وضعیت مطلوب تر ردوکس سلولی باشد.

نتایج مربوط به اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین نشان داد که مقدار آن در گیاهچه‌های وحشی و در تیمار ترهالوز به شدت افزایش یافته در حالی‌که در سایر تیمارها و در گیاهچه‌های جهش‌یافته میزان آن پایین بود. جهش‌یافته‌های *ntrc* احتمالاً به دلیل نقص در NTRC قادر به سنتز آنتوسیانین نمی‌باشند. فقدان NTRC، هموستازی مسیرهای متابولیکی که از مسیر شیکیمات مشتق می‌شوند را تغییر داده و منجر به تجمع اسیدهای آمینه آروماتیک می‌شود و متابولیتهای ثانویه مانند آنتوسیانینها را کاهش می‌دهد. NTRC اولین آنزیم در مسیر شیکیمات، ۳-دأُکسی-د-آرابینو-هپتولوسونات-۷-فسفات سنتاز (DAHP سنتاز) که

تولید ۳-دهیدروکوییناتها را از فسفوانول‌پیروات و اریتروز-۴-فسفات کاتالیز می‌کند را فعال می سازد. گزارشها نشان داده که گیاهچه‌های جهش‌یافته *ntrc*، قادر به انباشتن آنتوسیانین در پاسخ به درجه حرارت پایین و پیری نبوده و مقدار آنتوسیانین در این گیاهان کاهش یافت. بالا بودن مقدار آنتوسیانین در گیاهچه‌های وحشی و در تیمار ترهالوز نمی‌تواند تنها به دلیل داشتن NTRC فعال باشد و احتمالاً ترهالوز از طریق افزایش قندهای محلول به طور غیرمستقیم در توانسته بیان ژن بیوسنتز آنتوسیانین را تحریک کند. در بسیاری از گونه‌های گیاهی نظیر انگور تجمع آنتوسیانین به وسیلهٔ قندها القاء می‌شود (۲۶).

ارزیابی میزان کلروفیل و کارتنوئید در گیاهچه‌های وحشی و جهش‌یافته *ntrc* نشان داد که در تیمار شاهد و ساکاروز، میزان کلروفیل a، b و کلروفیل‌کل و کارتنوئید و گزانتوفیل در گیاهچه‌های جهش‌یافته نسبت به گیاه وحشی کاهش یافت. پیش از این نقش تیوردوکسین‌ها در نمو کلروپلاست، کارآیی دستگاه فتوسنتزی، محتوی رنگیزه‌ها از جمله کلروفیل، کارتنوئیدها و گزانتوفیل به اثبات رسیده است (۱۰، ۱۶ و ۵۰). همچنین NTRC در کنترل چندین واکنش مهم کلروپلاستی شرکت می‌کند. به عنوان مثال، NTRC به صورت مستقیم بر روی پایداری و فعالیت وابسته به ردوکس آنزیمهای مسیر سنتز کلروفیل مانند منیزیم پوروتوپورفیرین متیل ترانسفراز (CHLM) و گلوتامیل ترانسفر RNA ردوکتاز (GluTR) اثر داشته است.

در جهش‌یافته‌های *ntrc* فعالیت این آنزیمها کاهش یافته که در نتیجه منجر به کاهش بیوسنتز کلروفیل و در نهایت کم شدن محتوای کلروفیلی گیاه می شود (۴۶). بنابراین فنوتیپ رنگ پریدگی مشاهده شده در گیاهچه‌های جهش-یافته مورد آزمایش به دلیل کاهش سنتز کلروفیل می‌باشد.

نتیجه‌گیری

اگرچه گزارشها نشان داده‌اند که ترهالوز در بسیاری از موجودات در پاسخ به تنش نقش دارد، اما نقش دقیق آن در گیاهان هنوز مشخص نیست. نتایج حاضر نشان داد که تیمار ترهالوز سبب افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی (نظیر کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، و سوپراکسیددیسموتاز) و غیرآنزیمی (نظیر فنول، آنتوسیانین، کاروتنوئید و گزانتوفیل) می‌شود که در نتیجه منجر به کاهش میزان پراکسیدهیدروژن و پراکسیداسیون لیپید در گیاهچه‌های وحشی می‌گردد. به نظر می‌رسد تیمار ترهالوز با تغییر الگوی بیان ژنها نقش مهمی در مقابله گیاهان با تنش داشته باشد. مطالعات بیشتری جهت روشن شدن نقش دقیق ترهالوز در ایجاد مقاومت و تحمل تنش در گیاهان نیاز می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه گلستان به سبب حمایت مالی پژوهش حاضر تشکر و قدردانی دارند.

منابع

1- Aghdasi, M. 2007. Analysis of trehalose-6-phosphate control over carbon allocation and growth in plants. PhD Thesis, Utrecht University.

2- Alkhalfioui F, Renard M, Vensel WH, Wong J, Tanaka CK, Hurkman WJ, Buchanan BB and Montrichard, B, 2007. Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. Plant Physiol. 144: 1559–1579.

3- Apel K and Hirt H, 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Bio. 55:373–399.

4- Arnon DI, 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.

5- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E and Iturriaga G, 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. BMC Evol Biol. 6: 109–113.

6- Beauchamp C and Fridovich I, 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem. 44: 276-287.

7- Benaroudj N, Lee DH and Goldberg AL, 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals, J Biol Chem. 276: 24261–24267.

8- Burguieres EP, McCXue Y, Kwon and Shelty K, 2006. Effect of vitamin c and folic acid on seed vigour response and phenolic linked antioxidant activity. Bioresource Technol. 95: 1393-1404.

9- Chance B and Maehly AC, 1955. Assay of catalase and peroxidases. Molecular in Enzymology. 11: 755-764.

10- Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz KJ and Issakidis-Bourguet E, 2004. Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new y-type. Plant Physiol. 136:4088 –4095.

11- Crowe JH, 2007. Trehalose as a ‘‘chemical chaperone’’: fact and fantasy. Adv Exp Med Biol. 594: 143–158.

12- Crowe JH, Hoekstra FA and Crowe LM, 1992. Anhydrobiosis. Annu Rev Plant Physiol. 54: 579–599.

13- De Dios Barajas-Lopez J, Serrato AJ, Olmedilla A, Chueca A and Sahrawy M, 2007. Localization in roots and flowers of *Pea* chloroplastic thioredoxin *f* and thioredoxin *m* proteins reveals new roles in non photosynthetic organs. Plant Physiol. 145: 946–960.

14- Drennan PM, Smith MT, Goldsworthy D and Van Staden J, 1993. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. J Plant Physiol. 142:493 –496.

15- El-Bashiti T, Hamamc H, Hüseyin, Öktem A and Yucel M, 2005. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. Plant Science. 169: 47-54.

16- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I and Carroll D, 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology. 13:17–27.

17- Foyer CH and Noctor G, 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. New Phytol. 146: 359–388.

18- Fukuda, T. Ito, H. and Yoshida, T. 2003 Antioxidative polyphenols from Walnuts (*Juglans regia L.*). Phytochemistry. 63:795-801.

19- Garcia AB, Engler JDA, Iyer S, Gerats T, Montagu V and Caplan AB, 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. Plant Physiol. 115: 159–169.

20- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV and Wu RJ, 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc Natl Acad Sci. 99:15898 –15903.

21- Halliwell B, Rafter J and Jenner A, 2005. Health ptomotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? Am J Clin Nutr. 81:268S-276S.

22- Hare PD, Cress WA and Van Staden J, 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environ. 21: 535 –553.

23- Iordachescu M and Imai R, 2008. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. J. Integr Plant Biol. 50: 1223–1229.

24- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DK and Guy CL, 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. Plant Physiol. 136: 4159–4168.

25- Kar M and Mishra D, 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol. 57: 315 -319.

26- Lepisto A, Kangasjarvi S, Luomala EM, Brader G, Sipari N, Keranen M, Keinanen M and Rintamaki E, 2009. Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 149: 1261–1276.

27- Liu MS, Chien CT and Lin TD, 2008. Constitutive components and induced gene expression are involved in the desiccation tolerance of *Selaginella tamariscina*. Plant and Cell Physiol. 49: 653–663.

28- Luo Y, Li WM and Wang W, 2008. Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress. Environ Exp Bot. 63:78–384.

29- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ and Geigenberger P, 2009. NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. PNAS. 106: 9908-9913.

30- Miller G, Shulaev V and Mittler R, 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. Physiologia Plantarum. 133: 481–489.

31- Mita S, Murano N, Akaike M and Nakamura K, 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that is inducible by sugars. Plant J. 11: 841-851.

32- Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Sci. 7: 405–410.

33- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M and Van Breusegem F, 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Sci. 9: 490–498.

34- Moon JC, Jang HH, Chae HB, Lee JR, Lee SY, Jung YJ, Shin MR, Lim HS, Chung WS, Yun DJ, Lee KO and Lee SY, 2006. The C-type *Arabidopsis* thioredoxin reductase ANTR-C acts as an electron donor to 2-Cys peroxiredoxins in chloroplasts. Biochem Biophys Res Commun. 348:478–484.

35- Muller J, Boller T, Wiemken A, 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. Plant Sci. 112: 1–9.

36- Nakano Y and Asada K, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22: 867-880

37- Nery DCM, da Silva CG, Mariani D, Fernandes PN, Pereira MD, Panek AD and Eleutherio ECA, 2008. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. Biochem Biophys Acta. 1780: 1408–1411.

38- Noctor G and Foyer CH, 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Bio. 49: 249–279.

39- Oku K, Watanabe H, Kubota M, Fukuda S, Kurimoto M, Tsujisaka Y, Komori M, Inoue Y and Sakurai M, 2003. NMR and quantum chemical study on the $OH^{\cdots\pi}$ and $CH^{\cdots O}$ interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. J Am Chem Soc. 125:12739 –12748.

40- Pellny Tk, Ghannoum O, Conroy JP, Schlupmann, H, Smeekens S, Andralojc J, Krause KP, Goddijn O and Paul MJ, 2004. Genetic modification of photosynthesis with *E.coli* genes for trehalose synthesis. Plant Biotech J. 2: 71 -82.

41- Pereira EJ, Panek AD and Eleutherio ECA, 2003. Protection against oxidation during dehydration of yeast. Cell Stress Chaperones. 8: 120–124.

42- Perez-Ruiz , J.M., Maria Cristina Spinola, M.C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M. and Cejudoa, F.J. 2006. Rice NTRC Is a High-Efficiency Redox System for Chloroplast Protection against Oxidative Damage. The Plant Cell. 18: 2356–2368.

43- Pérez-Ruiz JM and Cejudo FJ, 2009. A proposed reaction mechanism for rice NADPH thioredoxin reductase C, an enzyme with protein disulfide reductase activity. FEBS Lett. 583: 1399–1402.

44- Prochazkova D, Haisel D and Wilhelmova N, 2009. Content of carotenoids during ageing and senescence of tobacco leaves with genetically modulated life-span. Photosynthetica. 47:409-414.

45- Resende MLV, Nojosa GBA, Cavalcanti LS, Aguilar MAG, Silva LHCP, Perez JO, Andrade GCG, Carvalho GA and Castro RM, 2002. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *verticillium dahliae* by acibenzolar-s-methyl (ASM). Plant P athol. 51:621-628.

46- Richter AS, Peter E, Rpthbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamaki E and Grimm B, 2013. Posttranslational Influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. Plant Physiol.162: 63–73.

47- Schluepmann H, Van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M and Smeekens S, 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. Plant Physiol. 135:879 –890.

48- Schurmann P and Jacquot JP, 2000. Plant thioredoxin systems revisited. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 51: 371–400.

49- Sergive I, Alexieva V and Karanov E, 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogeneus protective systems and stress markers in plants. Compt Rend Acad Bulg Sci. 51: 121-124.

50- Serrato A, Perez-Ruiz JM, Spinola MC and Cejudo FJ, 2004. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic

stress in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem. 279: 43821–43827.

51- Stankovic MS, Niciforovic N, Mihailovic V, Topuzovic M and Solujic S, 2012. Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucium Polium* L. subsp. *Polium*. Acta Societatis Botanni Poloniae. 81:117 -122.

52- Van Dijken AJH, Schluepmann H and Smeekens SCM, 2004. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. Plant Physiol. 135:969–977.

53-Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD and Somero GN, 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science. 217: 1214–1222.

The effect of trehalose feeding on antioxidant system of *Arabidopsis thaliana ntrc* mutant

Noroozipoor A., Aghdasi M. and Sadeghipour H.R.

Dept. of Biology, faculty of Science, Golestan University, Gorgan, I.R. of Iran.

Abstract

Trehalose is the alpha, alpha-1,1-linked glucose disaccharide which plays pivotal roles in plants growth, development and resistance to stress. The NADPH-dependent thioredoxin reductase **C** (NTRC) acts as redox regulatory factor and involved in different chloroplastic processes. The aim of present study was to gain further insight into the effect of trehalose on plant antioxidant system activity. For this purpose, the seeds of *Arabidopsis thaliana* (WT) and *ntrc* mutant plants (as sensitive plants to stress) were grown on MS medium with or without 100 mM sucrose and/or trehalose for 14 days. The results showed that trehalose treatment induced peroxidase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase in both mutant lines and WT seedlings, compared to control and sucrose treatment. Meanwhile these enzyme activities were higher in WT seedlings than that of *ntrc* mutants. Trehalose treatment decreased hydrogen peroxide and malon dialdehyde content in WT seedlings but increased phenol and anthocyanin content, compared to control. Also, the amount of hydrogen peroxide in WT seedlings was lower than mutant seedlings by trehalose feeding.The results revealed that trehalose eliminates reactive oxygen species by inducing plant antioxidant system. The obtained data can be useful to understand the role of trehalose in plant stress resistance.

Key words: Trehalose, thioredoxin, mutant, *ntrc,* antioxidant