

پاسخ شاخص کارایی فتوسنتزی (PI_{ABS}) نسبت به کمبود نیتрат در گیاهان تنباکو (*Nicotiana plumbaginifolia*) تراریخته شده با ژن ناقل نیترات *AtNRT2.1* با استفاده از فلئورسنس کلروفیل a

رضا حسامی و منصور شریعتی*

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۸

چکیده

مطالعات بر روی گیاه تنباکو تراریخته شده با ژن *AtNRT2.1* مربوط به سیستم ترابری با تمایل بالا (High Affinity) HATS (Transport System) نشان داده‌است که استفاده از روش اندازه‌گیری وزن تر و خشک از حساسیت کافی برای نشان دادن تفاوت‌های میان گیاهان تراریخته و خودرو برخوردار نیست، ازاین‌رو در این تحقیق از روش حساستر فلئورسنس کلروفیل a استفاده گردید. بدین منظور گیاهان تنباکو خودرو و تراریخته شده با ژن *AtNRT2.1* در محیط هیدروپونیک کشت و نیترات در غلظت کم در محدوده فعالیت سیستم HATS به محیط کشت افزوده شد. گیاهان مورد سنجش وزن تر، کلروفیل نسبی و شاخص کارایی (PI_{ABS}) با استفاده از فلئورسنس کلروفیل a قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در وزن تر و کلروفیل نسبی در گیاه خودرو و تراریخته وجود ندارد. تفاوت معنی‌دار پارامتر شاخص کارایی در گیاهان تراریخته نسبت به گیاه خودرو در ۴ ساعت اول آزمایش نشان می‌دهد که این برتری احتمالاً ناشی از جذب بهتر نیترات در اثر بیان دائمی ژن انتقالی در ساعات اولیه آزمایش باشد.

واژه‌های کلیدی: نیترات، فلئورسنس کلروفیل a، شاخص کارایی، ژن *AtNRT2.1* تنباکو (*N. Plumbaginifolia*)

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۳۲۴۷۲، پست الکترونیکی: mansour_shariati@yahoo.com

مقدمه

فعال ثانویه می‌باشد و مطالعات فیزیولوژیک مدارکی را دال بر جذب نیترات به صورت همراه با پروتون (H^+) ارائه کرده‌اند. بنابراین جذب نیترات وابسته به فعالیت پمپ پروتون ($H^+-ATPase$) می‌باشد (۱۲). بر اساس مطالعات فیزیولوژیکی سه نوع فرایند جذب مختلف برای نیترات یافت شده است، یک سیستم با تمایل پایین بنام LATS (Low Affinity Transport System) که در غلظت‌های بالای نیترات (بیش از ۰/۵ مولار) فعالیت می‌نماید و دو سیستم با تمایل بالا بنام HATS (High Affinity) (Transport System) که در غلظت‌های کم نیترات (کمتر از ۰/۵ مولار) فعالیت می‌نمایند، شامل cHATS که به صورت

نیترژن یک عنصر اساسی برای زندگی می‌باشد، زیرا این عنصر یکی از اجزای ساختمانی دو ماکرومولکول مهم بیولوژیک، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشد (۱۸). نیترژن موجود در خاک به اشکال مختلفی شامل نیترات، آمونیوم، اوره، اسیدهای آمینه و غیره وجود دارد. نیترات (NO_3^-) مهمترین منبع نیترژن معدنی در خاکهای دارای تهویه کافی می‌باشد (۱۲). گیاهان نیترات مورد نیاز خود را از محلول خاک از خلال غشاء پلاسمایی سلولهای اپیدرمی و کورتکس ریشه جذب می‌کنند (۱۲). مطالعات ترمودینامیکی مشخص کرده که حتی در غلظت‌های بالاتر نیترات در خاک، جذب این ترکیب نیازمند یک سیستم

محدوده (HATS) نمی‌تواند از حساسیت لازم برای مقایسه گیاه تراریخته با نوع خودرو برخوردار باشد. از طرفی نتایج نشان داده است (۳) که در برخی حالات گیاه تراریخته میزان کلروفیل نسبی بیشتری نسبت به نوع خودرو دارد. برخی گزارش‌ها حکایت از آن دارد که فتوسیستم II (PSII) نسبت به شرایط مختلف فیزیولوژیکی و تنش گیاه (۶ و ۲۳) از جمله کمبود نیترات (۷، ۹ و ۱۷) حساس است که به نظر می‌رسد با اندازه‌گیری فلئورسنس کلروفیل a مربوط به PSII و تحلیل پارامترهای آن می‌توان به یک راه حل مناسب برای تحلیل شرایط درونی و واکنش‌های گیاهان مختلف در وضعیت‌های مختلف دست یافت. بنابراین به نظر رسید برای بررسی تفاوت گیاه تراریخته شده با ژن *AtNRT2.1* از گیاه آراییدوپسیس نسبت به نوع خودرو از سیستم حساستری مانند شاخص کارایی فتوسنتزی (PI_{ABS}) از طریق اندازه‌گیری غیر تهاجمی فلئورسنس کلروفیل a استفاده گردد، به طوری که در طول آزمایش برخلاف سایر آزمایش‌های معمول فیزیولوژیکی مانند عصاره‌گیری و استخراج ترکیبات سلولی، گیاه آسیب ندیده و کاملاً در شرایط *in vivo* بررسی می‌گردد.

مواد و روشها

بذرهای کاشته شده در این تحقیق از آزمایشگاه پروفیسور Glass از دانشگاه UBC ونکوور کانادا تهیه شدند و شامل بذرهای خودرو فاقد هر گونه ژن انتقالی، دارای ژن *NRT2.1* خودی و بذرهای تراریخته تنباکو لاین B11 (نسل T2) دارای ژن انتقالی *NRT2.1* و *NAR2* از گیاه آراییدوپسیس و مارکر ژنی مقاومت به کانامایسین و تحت کنترل پروموتور 35S از ویروس موزائیک گل کلم (CaMV) می‌باشند، که توسط شریعتی در آزمایشگاه UBC ونکوور کانادا و نیز توسط علمی و همکاران (۱۳۸۷) از نظر انتقال و حضور ژن و هموزیگوسیتی مورد تأیید قرار گرفتند (۲).
شرایط رشد: بذرهای گیاهان خودرو و تراریخته شده لاین B11 گیاه تنباکو در گلدانهای کوچک با قطر ۸ و ارتفاع ۷

دائمی (Constitutive) بیان می‌شود و نوع iHATS که به صورت القاء‌شونده (inducible) با نیترات عمل می‌کند. دو خانواده ژنی *NRT1* (Nitrate transporter1) و *NRT2* (Nitrate transporter2) در گیاهان عالی یافت شده‌اند که به ترتیب مسئول سیستم HATS و LATS می‌باشند. از خانواده ژنی *NRT2* دو ژن *NRT2.1* و *NRT2.2* در جذب نیترات نقش دارند (۲۶). در گیاهان عالی ژن‌های خانواده *NRT2* در آراییدوپسیس (۱۱ و ۳۰)، جو (۲۵ و ۲۸)، تنباکو (۲۲)، گندم (۲۹) و سویا (۴) شناسایی شده‌اند. در تنباکو یک یا دو ژن از خانواده *NRT2* وجود دارد که در ریشه‌ها بیان بالایی دارد (۲۲). در گیاه آراییدوپسیس که بیشتر مطالعات مربوط به جذب نیترات از طریق HATS در آن انجام شده، هفت ژن از خانواده *NRT2* جداسازی شده است که با نامهای *AtNRT2.1*، *AtNRT2.2*، *AtNRT2.3*، *AtNRT2.4*، *AtNRT2.5*، *AtNRT2.6* و *AtNRT2.7* نامگذاری شده‌اند (۱۴ و ۳۰). در این بین *NRT2.1* اهمیت بیشتری در جذب نیترات از طریق سیستم iHATS دارد (۲۱). پروتئین *NRT2.1* به تنهایی در فرایند جذب نیترات عمل نمی‌کند، بلکه به یک پروتئین دیگر بنام *NAR2* که اخیراً *AtNRT3.1* (Nitrate transporter 3) نامیده شده است، نیاز دارد؛ که این موضوع در آراییدوپسیس (۲۰ و ۲۱) نشان داده شده است. گزارش‌ها حکایت از آن دارد که بیان زیاد ژن *NRT2.1* در گیاه تراریخته شده تنباکو با ژن *NpNRT2.1* (۱۳) و افزایش میزان mRNA مربوط، باعث جذب زیاد نیترات نشده است. از طرفی تحقیقات بر روی گیاه تنباکو تراریخته شده با ژن *AtNRT2.1* از گیاه آراییدوپسیس (۱، ۲ و ۳۱) حکایت از آن دارد که گیاه تراریخته فقط در دو تا سه ساعت اول، نسبت به نوع خودرو جذب بیشتری دارد و پس از آن تفاوت معنی‌داری در میزان جذب نیترات بین دو نوع گیاه مشاهده نشد. همچنین مقایسه وزن خشک و وزن تر عدم تفاوت معنی‌داری را نشان داد که به نظر می‌رسد مقایسه تغییرات وزن در میزان کم نیترات ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرو مولار (در

ترازو اندازه‌گیری و ثبت شد. این عمل در ۳ تکرار جداگانه و هر کدام شامل ۶ گیاه برای هر لاین انجام شد.

طیف‌سنجی فلئورسنس کلروفیل a: برای انجام طیف‌سنجی کلروفیل a از اندازه‌گیری فلئورسنس به روش nonmodulated بسیار سریع با دقت زمان ۱۰ میکروثانیه و به مدت ۱ ثانیه استفاده شد. قبل از اندازه‌گیری فلئورسنس ابتدا بخشی از برگ گیاه که مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد با استفاده از گیره‌های مخصوص برای ۱۵ دقیقه در تاریکی (dark adapted) قرار گرفته تا همه سیستم‌های نوری از انرژی (الکترون) تخلیه گردند. برای تعیین زمان قرارگیری در تاریکی، گیاهان به مدت صفر، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفته و میزان Fv/Fm (بازده کوانتومی اولین واکنش‌های فتوشیمیایی) اندازه‌گیری گردید (۱۶) و با توجه به اینکه پس از ۱۵ دقیقه میزان Fv/Fm ثابت باقی ماند، این زمان انتخاب گردید. برای اندازه‌گیری فلئورسنس با استفاده از لامپ‌های LED دستگاه HandyPEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, UK) نور قرمز فوق اشباع فتوسیستم‌ها به مقدار ۳۲۰۰ میکرومول فوتون در مترمربع در ثانیه با طول موج ۶۵۰ نانومتر به سطح نمونه تابانیده و همزمان فلئورسنس تابیده شده از برگ اندازه‌گیری شد. سپس داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار BiolyzerHP3 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و شاخص کارایی سیستم فتوستزی (Performance Index per Absorbance) PI_{ABS} گیاهان تراریخته و خودرو با استفاده از اندازه‌گیری شاخص‌های بازده جذب نور (RC/ABS) (Reaction Centre / Absorbance)، کارایی کوانتومی فتوشیمیایی اولیه (TR₀/ABS) (Trapping per Absorbance) و کارایی کوانتومی انتقال الکترون (ET₀/TR₀) (Electron Transport per Trapping) تا آخرین پذیرنده الکترون اندازه‌گیری و از فرمول زیر (۱۵) محاسبه گردید.

$$PI_{ABS} = (RC/ABS) \cdot [(ET_0/TR_0)/1 - (ET_0/TR_0)] \cdot [ET_0/ABS/1 - (ET_0/TR_0)]$$

سانتی‌متر بر روی خاک تجاری پیت ماس حاوی ۱/۵ گرم کود NPK با نسبت ۱۴/۷-۵-۱۲/۴ کشت شدند. سپس گلخانه‌ها به اتافک کشت با شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای $27 \pm 1^\circ C$ روز و $24 \pm 1^\circ C$ شب منتقل شدند. ده روز پس از کشت بذرها طی عمل جوانه‌زنی گیاهچه‌ها ظاهر شدند. گیاهچه‌ها به مدت یک ماه در این شرایط رشد کردند تا از لحاظ اندازه و استقامت ساقه برای انتقال به محیط هیدروپونیک به حد مناسب برسند.

محیط هیدروپونیک: در این آزمایش از محیط کشت هیدروپونیک تعدیل شده با غلظت ۰/۱ جاسون (۱۰) با ترکیبی شامل $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (۴۰۰ میکرو مولار)، H_3BO_3 (۲/۵ میکرو مولار)، $MnSO_4 \cdot H_2O$ (۰/۲ میکرو مولار)، $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (۰/۲ میکرو مولار)، $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (۰/۰۵ میکرو مولار)، $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (۰/۰۵ میکرو مولار)، $FeSO_4 \cdot 7H_2O - EDTA$ (۲ میکرو مولار)، $7H_2O$ (۱۰۰ میکرو مولار)، KH_2PO_4 (۲۰۰ میکرو مولار)، K_2SO_4 (۴۰۰ میکرو مولار) و $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (بر حسب نیاز) در تانک‌هایی به گنجایش ۱۵ لیتر استفاده شد. pH محیط هیدروپونیک مذکور در حدود ۶/۵ نگهداری شد. منبع تأمین ازت مورد نیاز گیاهان، نترات کلسیم $Ca(NO_3)_2$ بود که برای آزمایش‌های محدود HATS مقدار ۲۰۰ میکرو مولار و آزمایش‌های محدود LATS مقدار ۵ میلی مولار در نظر گرفته شد.

بررسی وزن تر: قبل از افزودن نترات به محیط کشت در محدوده HATS و بعد از انجام آزمایش‌های مربوط به فلئورسنس، گیاهان از محلول غذایی خارج شدند و بعد آب موجود بر روی سطح ریشه‌ها توسط کاغذ صافی خشک گردید و گیاهان مورد اندازه‌گیری وزنی قرار گرفتند. بدین صورت که وزن تر هر گیاه جداگانه توسط

پس از افزودن نیترا، ۴ و ۲۴ ساعت اندازه‌گیری گردید. داده‌های فلئورسنس کلروفیل a مربوط به هر دو شرایط HATS و LATS بوسیله نرم‌افزار BiolyzerHP3 بررسی گردید.

اندازه‌گیری کلروفیل نسبی: برای بررسی اثر جذب نیترا بر روی محتوای کلروفیل نسبی در گیاهان تراریخته در قیاس با گیاهان خودرو، پس از اندازه‌گیری فلئورسنس کلروفیل a، گیاهان توسط دستگاه اندازه‌گیری محتوای کلروفیل مدل Minolta - SPAD-502(Japan) مورد بررسی محتوای کلروفیل نسبی قرار گرفتند. برای این منظور کلروفیل نسبی در سه نقطه از هر برگ برای ۵ برگ از هر گیاه اندازه‌گیری شد. میانگین اعداد مربوط به محتوای کلروفیل نسبی سه نقطه یک برگ به‌عنوان میانگین کلروفیل نسبی برگ و میانگین اعداد مربوط به کلروفیل ۵ برگ یک گیاه به‌عنوان محتوای کلروفیل نسبی هر گیاه محاسبه شد. این عمل برای سه تکرار مستقل هر کدام برای دو تانک حاوی سه گیاه از هر لاین انجام شد.

نتایج

بررسی تأثیر جذب نیترا بر روی وزن تر در شرایط HATS: بررسی اثر جذب نیترا (در غلظت ۲۰۰ میکرومولار در محدوده HATS) بر وزن تر گیاهان خودرو و تراریخته در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد، نتایج حکایت از عدم تفاوت معنی‌داری بین گیاهان دارای ژن انتقالی (تراریخته) و گیاهان فاقد این ژن (خودرو) از نظر وزن تر دارد.

مطالعه شاخص کارایی (PI_{ABS}) سیستم فتوستزی در شرایط کمبود نیترا در محدوده iHATS: شکل ۲ مقایسه شاخص کارایی سیستم فتوستزی در گیاهان تنباکو تراریخته و خودرو در شرایط کمبود نیترا در محدوده iHATS را در غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیترا نشان می‌دهد. نتایج حکایت از آن دارد که به فاصله ۴ ساعت

در این مرحله از هر گیاه ۵ برگ به‌ترتیب از بالا (برگ شماره ۱) به پایین (برگ شماره ۵) مورد طیف‌سنجی قرار گرفت و میانگین ۵ برگ به‌عنوان مقدار مربوط به هر گیاه در نظر گرفته شد.

شرایط HATS: گیاهان خودرو و تراریخته شده لاین B11 به صورت مشترک به تانک‌های ۱۵ لیتری دارای محیط هیدروپونیک یک دهم جانشون حاوی ۵۰۰ میکرومولار نیترا منتقل شدند. گیاهان به مدت یک هفته در این شرایط قرار داده شدند و بعد به محیط هیدروپونیک تازه دارای همه ترکیبات غذایی بجز نیترا منتقل شدند تا با ایجاد شرایط محرومیت از نیترا هم ذخایر ازت گیاهان کاهش یابد و هم سیستم القایی iHATS خاموش گردد. بعد از یک هفته، گیاهان برای انجام آزمایش‌های اصلی مجدداً به محیط کشت تازه فاقد نیترا منتقل و یک روز به منظور سازگاری در محیط جدید قرار داده شدند. سپس ۲۰۰ میکرومولار نیترا (غلظت مورد نیاز فعالیت سیستم HATS) به محیط کشت اضافه و در زمانهای صفر (بلافاصله پس از افزودن نیترا)، ۴ و ۲۴ ساعت از گیاهان طیف فلئورسنس گرفته شد. این مرحله در ۳ تکرار جداگانه و هر تکرار شامل ۲ تانک ۱۵ لیتری محیط هیدروپونیک هر کدام شامل ۳ گیاه خودرو و ۳ گیاه تراریخته (در مجموع هر تکرار جداگانه شامل ۶ گیاه خودرو و ۶ گیاه تراریخته) انجام گردید.

شرایط LATS: علاوه بر آزمایش‌های انجام شده در محدوده HATS به‌عنوان مطالعات اضافه و تکمیلی، آزمایشها در محدوده LATS تکرار گردید. بدین منظور پس از انجام آزمایش‌های محدوده HATS، گیاهان برای مدت یک هفته به محیط بدون نیترا انتقال یافتند. سپس یک روز قبل از انجام آزمایش به یک محیط هیدروپونیک تازه منتقل شدند. سپس نیترا به غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار (غلظت مورد نیاز فعالیت سیستم LATS)، به محیط اضافه و فلئورسنس کلروفیل a در زمانهای صفر (بلافاصله

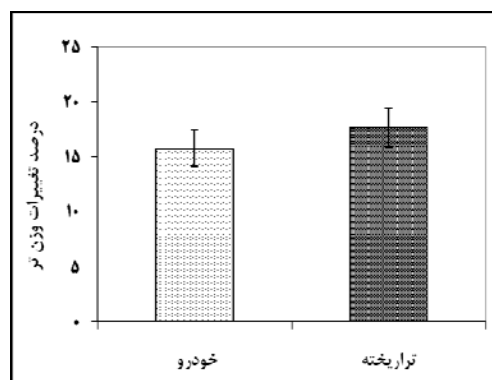
شکل ۲- مقایسه درصد تغییرات نسبت به زمان صفر PI_{ABS} (مقدار کارایی سیستم فتوسنتزی تا آخرین پذیرنده الکترون نسبت به واحد جذب نور) بین گیاهان خودرو و تراریخته، ۴ و ۲۴ ساعت پس از افزودن ۲۰۰ میکرو مولار نیترات (در محدوده HATS)

مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون t -test به صورت دو به دو جداگانه و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار ۵ درصد انجام شده است. *: بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

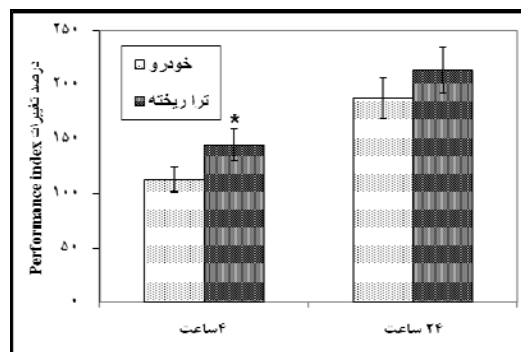
بررسی تغییرات شاخص کارایی (PI_{ABS}) در طول گیاه از برگ‌های ۱ تا ۵ (از بالا به پایین): شکل ۳ نشان‌دهنده میزان شاخص کارایی (PI_{ABS}) در طول گیاه از برگ‌های بالایی به پایینی (شماره ۱ تا ۵) در گیاهان خودرو و تراریخته می‌باشد. همانطور که ملاحظه می‌گردد در تمام زمانهای مورد بررسی بطور کلی از برگ‌های ۱ تا ۵ از بالا به پایین میزان PI_{ABS} کاهش می‌یابد. از طرفی در تمامی برگ‌ها با گذشت زمان میزان PI_{ABS} افزایش می‌یابد. علاوه بر این در برگ‌های بالایی تفاوت بیشتری در مقادیر PI_{ABS} بین زمانهای صفر، ۴ و ۲۴ ساعت مشاهده می‌شود، بدین صورت که در زمان صفر در برگ اول مقدار PI_{ABS} حدود ۳۰ می‌باشد، در ادامه با افزودن نیترات در زمان ۴ ساعت مقدار شاخص PI_{ABS} به حدود ۵۰ و در زمان ۲۴ ساعت به حدود ۶۵ رسیده است. اما در برگ پنجم دامنه تغییرات این شاخص نسبت به زمان کمتر می‌باشد و از حدود ۱۰ در زمان صفر به حدود ۲۰ در زمان ۲۴ ساعت می‌رسد. از طرفی در برگ ۳ گیاهان تراریخته میزان PI_{ABS} نسبت به گیاهان خودرو در تمام زمانهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری دارد. همین روند در برگ ۴ نیز (بجز در زمان صفر) مشاهده می‌شود.

مطالعه شاخص کارایی فلئورنس کلروفیل a (PI_{ABS}) در اثر تیمار با نیترات در محدوده LATS: شکل ۴ درصد تغییرات شاخص کارایی (PI_{ABS}) گیاهان تنباکو لاین‌های خودرو و تراریخته در زمانهای صفر، ۴ و ۲۴

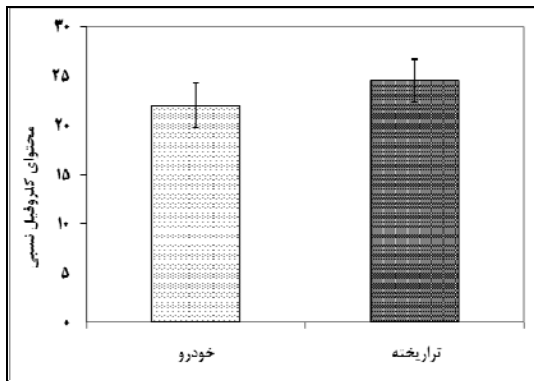
پس از افزودن نیترات میزان شاخص PI_{ABS} در گیاهان تراریخته نسبت به زمان صفر آزمایش حدود ۱۴۵ درصد افزایش نشان داده است، که این مقدار در گیاهان خودرو حدود ۱۱۰ درصد می‌باشد. این تفاوت معنی‌دار بوده و نشان‌دهنده افزایش بیشتر کارایی سیستم فتوسنتزی به میزان تقریبی ۳۲ درصد در گیاهان تراریخته در قیاس با گیاهان خودرو در زمان ۴ ساعت می‌باشد. البته در زمان ۲۴ ساعت این شاخص در گیاهان تراریخته نسبت به خودرو تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد، بنابراین کارایی سیستم فتوسنتزی در دو نوع گیاهان برابر شده است. از طرفی PI_{ABS} هر دو لاین در زمان ۲۴ ساعت نسبت به زمان ۴ ساعت افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد، به طوری که این افزایش در حدود ۳۵ درصد می‌باشد.



شکل ۱- مقایسه وزن تر بین گیاهان خودرو و تراریخته در اثر جذب نیترات. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون t -test به صورت دو به دو جداگانه و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار ۵ درصد انجام شده است. *: بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



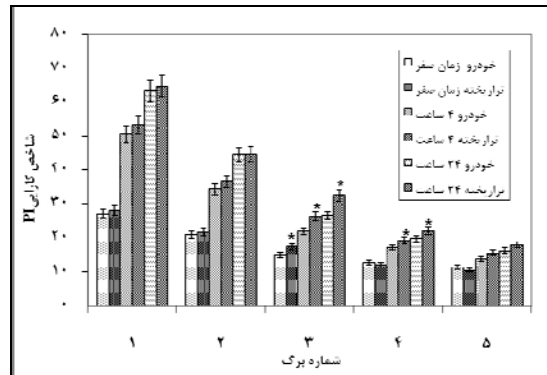
PI_{ABS} مشاهده می‌شود، اما اختلاف معنی‌داری بین گیاهان تراریخته و خودرو از نظر کارایی سیستم فتوسنتزی وجود ندارد. نتایج مربوط به زمان ۲۴ ساعت نیز حکایت از عدم تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخته و خودرو از نظر افزایش کارایی سیستم فتوسنتزی دارد. علاوه بر این، در زمان ۲۴ ساعت نسبت به زمان صفر حدود ۵۰ درصد و نسبت به زمان ۴ ساعت حدود ۴۰ درصد افزایش در PI_{ABS} گیاهان تراریخته و خودرو مشاهده می‌شود.



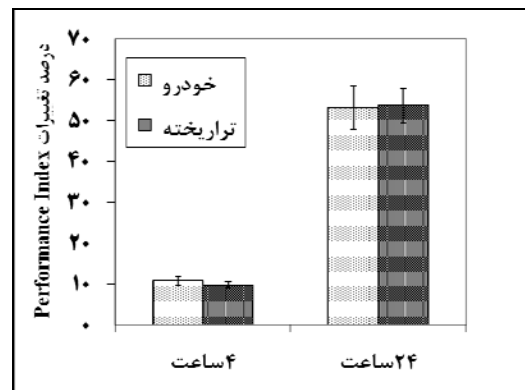
شکل ۵- مقایسه محتوای کلروفیل نسبی در گیاهان تراریخته در قیاس با گیاهان خودرو تنباکو در پاسخ به جذب نیترات در محدوده LATS (با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار) مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون t-test به صورت دو به دو جداگانه و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار ۵ درصد انجام شده است. *: بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل نسبی در گیاهان خودرو و تراریخته در اثر جذب نیترات در محدوده LATS: شکل ۵ مقایسه محتوای کلروفیل نسبی گیاهان تراریخته و خودرو را نشان می‌دهد. همانگونه که ملاحظه می‌گردد، گیاهان تراریخته محتوای کلروفیل نسبی افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاهان خودرو نشان نمی‌دهد. شکل ۶ نشان‌دهنده محتوای کلروفیل نسبی در طول گیاه از برگهای بالایی به پایینی پس از افزودن نیترات به محیط غذایی گیاهان در محدوده LATS می‌باشد. همانطور که ملاحظه می‌گردد محتوای کلروفیل نسبی در طول گیاهان تراریخته و خودرو از بالا به پایین از برگهای ۱ تا ۵ کاهش می‌یابد

ساعت پس از افزودن نیترات به مقدار ۵ میلی‌مولار (در محدوده LATS) به محلول غذایی آنها را نشان می‌دهد.



شکل ۳- تغییرات PI_{ABS} (شاخص کارایی) در طول گیاه از برگهای بالا به پایین در گیاهان خودرو و تراریخته، در زمان صفر، ۴ و ۲۴ ساعت پس از افزودن ۲۰۰ میکرومولار نیترات (در محدوده HATS) مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون t-test به صورت دو به دو جداگانه و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار ۵ درصد انجام شده است. *: بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

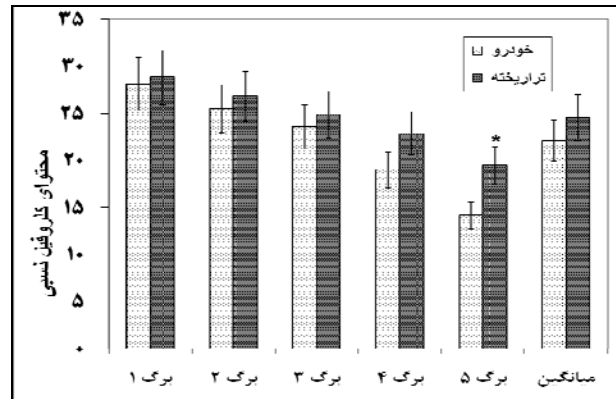


شکل ۴- مقایسه درصد تغییرات نسبت به زمان صفر PI_{ABS} (مقدار کارایی سیستم فتوسنتزی تا آخرین پذیرنده الکترون نسبت به واحد جذب نور) بین گیاهان خودرو و تراریخته در اثر تیمار با ۵ میلی‌مولار نیترات (در محدوده LATS) مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون t-test به صورت دو به دو جداگانه و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار ۵ درصد انجام شده است. *: بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

مطابق این شکل در زمان ۴ ساعت در هر دو لاین نسبت به زمان صفر آزمایش حدود ۱۰ درصد افزایش در شاخص

بین دو لاین مشاهده نمی‌گردد، به طوری که میانگین همه برگهای گیاهان تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

که از برگ ۳ به بعد مشهودتر است. مطابق این شکل فقط در برگ ۵ اختلاف معنی‌داری بین گیاهان خودرو و تراریخته وجود دارد و در برگهای ۱ تا ۴ تفاوت معنی‌داری



شکل ۶- مقایسه محتوای کلروفیل نسبی در طول گیاه از برگهای ۱ تا ۵ از بالا به پایین در اثر تیمار با نیترات در محدوده LATS (با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار) مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون t-test به صورت دو به دو جداگانه و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار ۵ درصد انجام شده است. *: بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بحث

گرفتن نیترات در اختیار گیاهان، فرصت کافی برای جذب مقادیر مورد نیاز نیترات برای افزایش قابل توجه در وزن گیاهان نسبت به ابتدای شروع آزمایش وجود نداشته است، که آزمایش‌های ما نیز آنرا تأیید می‌کنند.

با توجه به وجود ارتباط بین تغذیه با نیترات و میزان کلروفیل گیاهان (۵)، برای مطالعه مقدار حرکت نیترات در طول گیاه و مقایسه گیاهان خودرو و تراریخته از این نظر، از روش مطالعه محتوای کلروفیل نسبی استفاده شد. بررسی مقدار کلروفیل در طول گیاهان از برگهای بالا به پایین حکایت از مقادیر بیشتر کلروفیل در برگهای جوان بالایی گیاهان نسبت به برگهای پایینی دارد، که این تغییرات با نحوه حرکت نیتروژن در گیاهان به‌عنوان یک ترکیب تند حرکت که بیشتر و زودتر به برگهای بالایی و جوانتر تخصیص می‌یابد، و این حقیقت که علائم کمبود نیتروژن ابتدا در برگهای مسن پایینی مشاهده می‌شود، به خوبی مطابقت دارد. عدم تفاوت در میزان کلروفیل نسبی در محدوده LATS حکایت از آن دارد که ورود ژن *AtNRT2.1* همانطور که انتظار می‌رفت، دخالتی در جذب نیترات در محدوده LATS ندارد.

از آنجا که جذب نیترات با افزایش بیوماس در گیاهان ارتباط مستقیمی دارد (۸) و با توجه به گزارش‌های قبلی (۲، ۳۱) مبنی بر افزایش جذب نیترات در گیاهان تنباکو تراریخته شده با ژن *AtNRT2.1* در مقایسه با گیاهان خودرو، فقط در ۲ تا ۳ ساعت اول آزمایش و برابر شدن مقدار جذب پس از آن، تأثیر میزان اندک جذب نیترات در محدوده HATS بر میزان وزن تر گیاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اندازه‌گیری وزنی حکایت از آن داشت که تفاوت معنی‌داری در وزن تر بین گیاهان خودرو و تراریخته تحت تأثیر جذب نیترات مشاهده نشد. در مطالعات قبلی جذب نیترات در محدوده iHATS در گیاه تراریخته تنباکو عدم تفاوت معنی‌داری را در بیوماس در مقایسه با گیاهان خودرو گزارش کرده است (۲، ۳) و اینطور تفسیر نموده‌اند که جذب نیترات در مقیاس بسیار اندک در محدوده iHATS و در مقادیر میکرومولار نمی‌تواند منجر به تغییرات قابل اندازه‌گیری در بیوماس و وزن تر شود. از طرفی به علت مدت زمان کوتاه قرار

نه ناقل (LATS) به گیاهان تراریخته، عدم تفاوت در جذب نیترات در محدوده LATS قابل انتظار بوده و با پیش‌بینی‌های قبلی همخوانی داشته است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از فلئورسنس کلروفیل a در شرایط iHATS و LATS و مقایسه آن با نتایج مربوط به کلروفیل نسبی، و گزارش‌های قبلی مبنی بر نحوه جذب نیترات در گیاهان تراریخته و خودرو، به نظر می‌رسد که شاخص PI_{ABS} به خوبی نشان‌دهنده وضعیت گیاه از نظر نیترات می‌باشد و از آنجا که شاخص PI_{ABS} دربرگیرنده سه شاخص بازده جذب نور (RC/ABS)، کارایی کوانتومی فتوشیمیایی اولیه (TR_0/ABS) و کارایی کوانتومی انتقال الکترون (ET_0/TR_0) تا آخرین پذیرنده الکترون، در سیستم فتوستتزی می‌باشد (۱۵)، بنابراین به نظر می‌رسد جذب نیترات با تأثیر بر محتوای کلروفیل نسبی، بازده جذب نور را افزایش داده و افزایش این شاخص به همراه افزایش کارایی فتوشیمیایی اولیه و کارایی کوانتومی انتقال الکترون منجر به افزایش شاخص کارایی شده است.

جمع‌بندی نهایی: با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد در ساعات اولیه آزمایش به علت بیان دائمی ژن انتقالی در گیاهان تراریخته، بلافاصله پس از افزودن نیترات به محیط، جذب شروع می‌شود و منجر به افزایش بیشتر شاخص PI_{ABS} می‌گردد، در حالیکه القاء بیان ژن *NRT2.1* خودی و شروع جذب و در نتیجه افزایش شاخص PI_{ABS} در گیاهان تنباکو (*Nicotiana plumbaginifolia*) خودرو حدود ۳ تا ۴ ساعت زمان می‌برد. بنابراین به نظر می‌رسد شاخص PI_{ABS} می‌تواند به خوبی شرایط حاکم بر سیستم‌های فتوستتزی گیاهان را تحت شرایط تنشی از جمله کمبود نیترات نشان دهد و استفاده از طیف‌سنجی فلئورسنس کلروفیل a مخصوصاً شاخص کارایی، می‌تواند برای بررسی‌های مشابه بکار رود.

سپاسگزاری

برخی مطالعات حکایت از تأثیر کمبود نیتروژن بر سیستم‌های فتوستتزی دارند، از جمله این اثرات کاهش بازده کوانتومی، انتقال الکترون و حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II هستند (۱۹، ۲۷). چنین گزارش‌هایی پیشنهاد می‌کنند که کمبود نیتروژن برخی آسیب‌ها را به فتوسیستم II (PSII) القاء می‌کند (۱۶). بنابراین به نظر رسید می‌توان با اندازه‌گیری فلئورسنس کلروفیل a مربوط به فتوسیستم II و تحلیل شاخص کارایی (PI_{ABS}) مربوط به آن به یک راه حل مناسب برای تحلیل تأثیر انتقال و بیان ژن مربوط به ناقل نیترات (*AtNRT2.1*) بر سیستم فتوستتزی گیاه از نظر جذب نیترات دست یافت. از این رو به نظر می‌رسد نتایج حاصل از این مطالعات بر روی شاخص‌های فلئورسنس کلروفیل a حکایت از تأثیر ژن انتقالی بر جذب نیترات در محدوده iHATS در ۴ ساعت ابتدایی آزمایش و در نتیجه افزایش معنی‌دار شاخص کارایی فلئورسنس کلروفیل a در گیاهان تراریخته در قیاس با گیاهان خودرو دارد. این تفاوت در ساعات بعدی طی ۲۴ ساعت مشاهده نشده و حکایت از برابر بودن جذب نیترات و در نتیجه برابر بودن شاخص کارایی در دو لاین گیاهان مورد آزمایش دارد، که به نظر می‌رسد ناشی از شروع بلافاصله جذب نیترات در گیاهان تراریخته، و در گیاهان خودرو حدود ۳ ساعت پس از افزودن نیترات به محلول غذایی می‌باشد. علاوه بر این، مقایسه روند تغییرات PI_{ABS} و محتوای کلروفیل در طول گیاهان (اشکال ۳ و ۶)، حکایت از کاهش شاخص کارایی به موازات کاهش مقدار کلروفیل از برگ‌های بالا به پایین دارد، که به خوبی با نحوه حرکت نیترات در گیاه به‌عنوان یک ترکیب تند حرکت تطابق دارد. نتایج مربوط به مطالعه شاخص کارایی فلئورسنس کلروفیل a در شرایط LATS (شکل ۴) حکایت از عدم تفاوت بین گیاهان تراریخته و خودرو در زمانهای صفر، ۴ و ۲۴ ساعت، از نظر جذب نیترات در غلظت‌های بالا (در محدوده LATS) دارد، که با توجه به انتقال ژن *AtNRT2.1* (که مربوط به ناقل iHATS می‌باشد

می‌گردد. نویسندگان مقاله از دست‌اندرکاران قطب تنش‌های گیاهی در دانشگاه اصفهان نیز تشکر و قدردانی می‌نمایند.

بدین‌وسیله از مسولان محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به دلیل حمایت مالی در انجام این تحقیق قدردانی

منابع

۱. ذوفن، پ. و شریعتی، م. ۱۳۸۷. فیزیولوژی جذب نیترات توسط ناقل NRT2.1 در گیاه ترانسژنی تنباکو (*Nicotiana plumbaginifolia*). پایان نامه دکتری، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
۲. علمی، ز. شریعتی، م. و ذوفن، پ. ۱۳۸۷. بررسی جذب نیترات (iHATS) در گیاه تراریخت یافته تنباکو (*Nicotiana glauca*). پایان نامه دکتری، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
۳. نظری، ع. و شریعتی، م. ۱۳۸۷. مطالعه جذب نیترات (در محدوده HATS) در گیاه تنباکو (*Nicotiana glauca*). تراویخته شده به صورت مفرد و مضاعف با ژن *AtNRT2.1*. پانزدهمین کنفرانس زیست‌شناسی ایران. دانشگاه تهران.
4. Amarasinghe, B. H., de Bruxelles, G. L., Braddon, M., Onyeocha, I., Forde, B. G. and Udvardi, M. K. 1998. Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta*. 206, 44-52.
5. Buapet, P., Hiranpam, R., Ritche, R. J. and Prathep, A. 2008. Effect of nutrient inputs on growth, chlorophyll, and tissue nutrient concentration of *Ulva reticulata* from a tropical habitat. *Science Asia*. 34, 245-252.
6. Bussotti, F., Strasser, R. J. and Schaub, M. 2007. Photosynthetic behavior of woody species under high ozone exposure probed with the JIP-test. *Environmental Pollution*. 147, 430-437.
7. Calatayud, A., Gorbe, E., Roca, D. and Martinez, P. F. 2008. Effect of two nutrient solution temperatures on nitrate uptake, nitrate reductase activity, NH_4^+ concentration and chlorophyll a fluorescence in rose plants. *Environmental and Experimental Botany*. 64, 65-74.
8. Chen, B. M., Wang, Z. H., Li, S. X., Song, H. X. and Wang, X. N. 2004. Effect of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*. 167, 635-643.
9. Ciompi, S., Gentili, E., Guidi, L. and Soldatini, G. F. 1999. The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. *Plant Science*. 118, 177-184.
10. Epstein, E. 1972. Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives, John Wiley & Sons Inc, New York.
11. Filleur, S. and Daniel-Vedele, F. 1999. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* 207, 461-469.
12. Forde B. G. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465, 219-235.
13. Fraiser, V., Gojan, A., Tillard, P. and Daniel-Vedele, F. 2000. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana glauca*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *The Plant Journal*. 23, 489-496.
14. Glass, A. D. M., Britto, D. T., Kaiser, B. N., Kinghorn, J. R., Kronzucker, H. J., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M. Y. and Unkles, S. E. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53, 855-864.
15. Gonzalez-Mendoza, D., Gil, F. E., Santamaria, J. M. and Zapata, P. 2007. Multiple Effects of Cadmium on the Photosynthetic Apparatus of *Avicennia germinans* L. as Probed by OJIP Chlorophyll Fluorescence Measurements. *Naturforsch*. 62, 265-272.
16. Lu, C. and Zhang, J. 2000. Photosynthetic CO_2 assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. *Plant Science*. 151, 135-143.
17. Lu, C., Zhang, J., Zhang, Q., Li, L. and Kuang, T. 2001. Modification of photosystem II photochemistry in nitrogen deficient maize and wheat plants. *Journal of Plant Physiology*. 158, 1423-1430.
18. Moreno, C. 1999. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of Bacteriology*. 181, 6573-6584.
19. Nunes, M. A., Ramalho, J. C. and Dias, M. A. 1993. Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from

- coffee plants exposed to bright light. *Journal of Experimental Botany*. 262, 893-899.
20. Okamoto, M., Kumar, A., Li, W., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Crawford, N. M. and Glass, A. D. 2006. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the *NAR2*-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiology*. 142, 1304-1317.
 21. Orsel, M., Chopin, F., Leleu, O., Smith, S. J., Krapp, A., Daniel-Vedele, F. and Miller, A. J. 2006. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiology*. 142, 1304-1317.
 22. Quesada, A., Krapp, A., Trueman, L. J., Daniel-Vedele, F., Fernandez, E., Forde, B. G. and Caboche, M. 1997. PCR identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Molecular Biology*. 34, 265-274.
 23. Strauss, A. J., Kruger, G. H. J., Strasser, R. J. and Van Heerden, P. D. R. 2006. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environmental and Experimental Botany*. 56, 147-157.
 24. Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. *Plant physiology*. 3rd edition, Sinaur Associates, Inc. Publishers, Sunderland.
 25. Trueman, L. J., Richardson, A. and Forde, B. G. 1996. Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*. 175, 223-231.
 26. Tsay, Y. F., Chiu, C. C., Tsai, C., Cheng, B. and Hsu, P. 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters*. 581, 2290-2300.
 27. Verhoeven, A. S., Demmig-Adams, B. and Adams W. W. 1997. Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiology*. 113, 817-824.
 28. Vidmar, J. J., Zhuo, D., Siddiqi, M. Y., Schjoerring, J. K., Touraine, B. and Glass, A. D. 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology*. 123, 307-318.
 29. Yin, L. P., Wen, B., Li, P., Taylor, D. and Berry, J. O. 2007. Characterization and expression of high affinity nitrate system transporter gene (*TaNRT2.1*) from wheat roots and its evolutionary relationship to other *NRT2* genes. *Plant Science*. 172, 621-631.
 30. Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J. J. and Glass, A. D. 1999. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;IA1*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 17, 563-568.
 31. Zoufan, P. and Shariati, M. 2011. Effect of *AtNRT2.1* transgene on HATS nitrate uptake in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia*. *Progress in Biological Sciences*. 1, 1-9.

Study of the response of photosynthetic performance index (PI_{ABS}) in *AtNRT2.1* transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to nitrate deficiency using chlorophyll a fluorescence

Hesami R. and Shariati M.

Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Study of tobacco plant transformed with *AtNRT2.1* gene, which belongs to HATS (High Affinity Transporter System), indicated that using wet and dry weight measurements is not sensitive enough to show the differences between transgenic tobacco plants and the wild types. Thus, in this study, chlorophyll a fluorescence measurement, a more sensitive method, was performed. For this purpose, the plants were grown in hydroponic media, and nitrate was applied in low concentration (in HATS activity range). Then fresh weight, relative chlorophyll content and chlorophyll a fluorescence and performance index (PI_{ABS}) were measured. Results showed there is no significant difference in fresh weight and relative chlorophyll content of wild type in comparison with transgenic plants. It seems that significant difference in performance index (PI_{ABS}) of transgenic plants in comparison with wild type plants in 4 hours after commencement of the experiment is due to better absorption of nitrate by overexpression of transformed gene at first hours of experiment.

Key words: nitrate, chlorophyll a fluorescence, performance index, *Nicotiana plumbaginifolia*, *AtNRT2.1* gene.