

بررسی تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات بر روی جذب نیترات توسط HATS، در گیاه آراییدوپسیس تالیانا

پرژک ذوفن^{۱*} و منصور شریعتی^۲

^{۱*} گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

چکیده

تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات بین ۰ تا ۱۰۰ میکرومولار به عنوان یک ماده آنالوگ نیترات، بر روی فعالیت سیستم با تمایل بالای نیترات در شرایط بدون نیترات در دو اسیدیته ۶ و ۶/۵ یا همراه با سه غلظت نیترات شامل ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در اسیدیته ۶ در طی دو بخش تحقیقی و با استفاده از لاین‌های آراییدوپسیس تالیانای (*Arabidopsis thaliana*) جهش‌یافته *atnrt2.1*، *atnrt2.4* و *chl1-5* و جهش‌یافته *atnrt2.1* تراریخت شده با ژن *NRT2.1* مطالعه گردید. به دنبال کشت بذرها متعلق به این ژنوتیپ‌ها بر روی محیط کشت جامد حاوی مواد غذایی و انتقال آنها به شرایط رشدی کنترل شده، برای درک بهتر نقش سیستم با تمایل بالا در جذب نیترات، پس از هفت روز درصد برگچه‌های کاملاً باز به عنوان شاخص عملکرد این سیستم بررسی گردید. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، بالاترین میزان مقاومت در برابر غلظت‌های بالای کلرات هم در محیط فاقد و هم در محیط دارای نیترات در جهش‌یافته *atnrt2.1* مشاهده شد. اختلال در بیان ژن‌های *AtNRT2.4* و *AtCHL1* به افزایش مقاومت گیاهچه‌ها در برابر کلرات منجر نگردید. از طرف دیگر، تشدید بیان ژن *NRT2.1* در جهش‌یافته *atnrt2.1* به کاهش معنی‌دار درصد برگچه‌های کاملاً باز در این ژنوتیپ منجر شد. با تکیه بر این نتایج، به نظر می‌رسد که ژن *AtNRT2.1* نقش اصلی و کلیدی را در جذب نیترات از محیط توسط سیستم با تمایل بالا دارد و این نتایج، تحقیقات فیزیولوژیک و مولکولی قبلی در رابطه با عملکرد این ژن را تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آراییدوپسیس، سیستم با تمایل بالا، کلرات، نیترات

مقدمه

می‌شود (Glass et al., 1992). به نظر می‌رسد که انتقال نیترات حتی در غلظت‌های بالا نیز به شیب الکتروشیمیایی یون‌های پروتون و عملکرد پمپ H^+ -ATPase غشای پلاسمایی وابسته است (Miller and Smith, 1992). این

نیترات یکی از مهمترین منابع نیتروژن معدنی برای رشد و نمو گیاهان است. جذب نیترات در گیاهان از طریق غشای پلاسمایی سلول‌های اپیدرمی و پوست ریشه انجام

کلرات (*chl1*) در آراییدوپسیس جداسازی و کلون شد (Tsay *et al.*, 1993). جهش یافته‌های فیزیولوژیک این ژن که دارای نقص در جذب نیترات و کلرات بودند، برای نخستین بار در سال ۱۹۷۸ شناسایی شدند (Doddema *et al.*, 1978).

مطالعات بعدی بیانگر آن بود که این جهش یافته علاوه بر نقص در عملکرد LATS قادر به جذب نیترات توسط HATS نیز نیست (Liu *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998). بنابراین، پیشنهاد شد که CHL1 یک ناقل با تمایل دو گانه نسبت به نیترات است که عمدتاً در بخش‌های جوان ریشه بیان می‌شود (Huang *et al.*, 1999). تصور می‌شود که شرایط غذایی و غلظت نیترات، از مهمترین عوامل کنترل‌کننده تغییر فعالیت ناقل AtNRT1.1 است. بیشتر مطالعات فیزیولوژیک و مولکولی مرتبط با جذب نیترات توسط HATS در گیاه آراییدوپسیس تالیانا و با هدف درک نقش و نحوه کنترل ژن‌های خانواده *NRT2* انجام شده است و این مطالعات نشان می‌دهد که هفت ژن از این خانواده در ژنوم این گیاه حضور دارند (Filleur and Daniel-Vedele, 1999; Zhuo *et al.*, 1999).

در میان خانواده ژنی *AtNRT2* در آراییدوپسیس، ژن *AtNRT2.1* در سطح وسیعی مطالعه شده است و بر اساس این شواهد، پیشنهاد شده است که احتمالاً ژن *NRT2.1* نقش غالب و مهمی در قیاس با دیگر ژن‌های *NRT2* در جذب نیترات توسط HATS دارد. (Cerezo *et al.*, 2001; Filleur *et al.*, 2001) به استثنای ژن *AtNRT2.1* و تا حدودی ژن *AtNRT2.2* عملکرد سایر ژن‌های خانواده *NRT2* در گیاهان هنوز مشخص نشده است. برخی مطالعات بر روی جهش یافته‌های دو گانه *atnrt2a* در گیاه

انتقال همراه با دو پروتون انجام می‌شود. تحقیقات فیزیولوژیک روند جذب نیترات در گیاهان (Crawford and Glass, 1998; Forde and Clarkson, 1999) نشان داده است که حداقل سه سیستم مجزا برای جذب نیترات در ریشه‌ها توسعه یافته است: یک سیستم که تمایل بالایی نسبت به نیترات دارد، در غلظت‌های بسیار کم نیترات در محیط (در حد میکرومولار) عمل می‌کند و روندی اشباع‌پذیر را از خود نشان می‌دهد. به این سیستم HATS (High Affinity Transport System) گفته می‌شود که خود به دو نوع مجزا تقسیم می‌گردد؛ یک سیستم که قویاً در برابر حضور نیترات القایی است و به عنوان سیستم iHATS (inducible HATS) شناخته شده است، در حالی که سیستم cHATS (constitutive HATS) به صورت ساختاری بیان می‌شود و حتی در غیاب نیترات نیز فعال است. سومین سیستم ناقل با عنوان LATS (Low Affinity Transport System) از تمایل پایینی نسبت به تغییرات برخوردار است و به نظر می‌رسد که وقتی غلظت نیترات در محیط بیش از یک میلی‌مولار باشد، این سیستم نقش مهمی را در جذب نیترات ایفاء می‌نماید. (Kronzucker *et al.*, 1995; Seddiqi *et al.*, 1990).

در گیاهان عالی حضور دو نوع از ناقلان نیترات با عنوان NRT1 (Nitrate Transporter 1) و NRT2 به اثبات رسیده است. ناقلان NRT2 به عنوان نماینده سیستم‌های HATS شناخته شده‌اند (Filleur and Daniel-Vedele, 1999). ناقل CHL1 (*AtNRT1.1*) بهترین نمونه مطالعه شده از ناقلان نیترات متعلق به خانواده NRT1 در گیاهان عالی است که با استفاده از جهش یافته‌های T-DNA مقاوم به

تفکیک فنوتیپی و فیزیولوژیک این ژنوتیپ‌ها، زمینه مناسبی برای درک نقش این ژن‌ها فراهم می‌آید. به همین جهت، در این تحقیق تلاش بر این بوده است که با استفاده از لاین‌های جهش‌یافته و تراریخت در برخی ژن‌های دخیل در جذب نیترات نقش این ژن‌ها در عملکرد HATS در غلظت‌های میکرومولاری کلرات (به عنوان آنالوگ نیترات) بررسی گردد. بر همین اساس و با توجه به اینکه تاکنون تأثیر غلظت‌های پایین کلرات به عنوان آنالوگ نیترات بر عملکرد HATS در جذب نیترات مطالعه نشده است و با توجه به این که جذب کلرات و تبدیل آن به کلریت سمی، به ایجاد سمیت در گیاه و عدم جوانه‌زنی و رشد مناسب منجر می‌شود و همچنین جذب بیشتر کلرات می‌تواند بیانگر توانایی بیشتر گیاه در جذب بیشتر نیترات باشد، بنابراین، اثر کلرات در محدوده فعالیت HATS بر روی درصد جوانه‌زنی بذر برخی لاین‌های جهش‌یافته و تراریخته در ژن‌های *NRT* بررسی گردید تا درک بیشتری از نقش این ژن‌ها در عملکرد HATS و جذب نیترات از طریق آن به دست آید.

مواد و روش‌ها

کلیه بذرهاى مورد استفاده در این از تحقیق، از بانک بذر مرکز تحقیقات کشاورزی INRA، مرکز ورسای واقع در کشور فرانسه تأمین شد. برای بررسی تأثیر کلرات بر عملکرد HATS، دو آزمایش جداگانه طراحی گردید. در آزمایش مقدماتی از جهش‌یافته‌های آرابیدوپسیس نظیر جهش‌یافته *atnrt2.1 atnrt2.4* و *chl1-5* به همراه اکوتیپ‌های وحشی (Col) Columbia و Wasselewskija (WS) استفاده شد. در آزمایش دوم

آرابیدوپسیس (این گیاهان دارای حذف کامل ژن *AtNRT2.1* و حذف بخشی از ژن *AtNRT2.2* هستند) بیانگر آن است که بیان ژن *AtNRT2.4* در این جهش‌یافته تشدید می‌شود (Orsel *et al.*, 2004).

همچنین، نتایج حاکی از آن است که بیان ژن *AtNRT2.4* به دنبال برقراری شرایط محرومیت نیتروژن افزایش و در شرایطی غنی از نیتروژن کاهش می‌یابد (ذوفن و همکاران، ۱۳۸۹). بنابراین به نظر می‌رسد که ژن فوق جزو ژن‌های ممانعت‌شونده توسط نیترات باشد. بر اساس برخی تحقیقات، استفاده از گیاهان جهش‌یافته و تراریخته و انجام مطالعات مقایسه‌ای با گیاهان وحشی برای درک بهتر و بیشتر نقش ژن‌های مرتبط با جذب نیترات از کارایی بالایی برخوردار بوده است (Cerezo *et al.*, 2001; Filleur *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). این نتایج یاد شده نشان داده‌اند که حضور چند ژن در یک خانواده ژنی می‌تواند به انعطاف‌پذیری فنوتیپی در پاسخ به شرایط محیطی مختلف منجر گردد و عدم حضور یک ژن می‌تواند با بیان و فعالیت ژن‌های دیگر موجود در آن خانواده ژنی جبران شود. کلرات یک آنالوگ نیترات و یک علف‌کش گیاهی است که توسط سیستم‌های جذب نیترات جذب و با فعالیت نیترات رودکناز به کلریت تبدیل می‌گردد که کلریت برای گیاه بسیار سمی است و به تجزیه کلروفیل و ریزش برگ منجر می‌شود. به همین جهت، این ماده در بررسی‌های اولیه بر روی عملکرد سیستم‌های جذب نیترات توسط LATS استفاده شده است (Tsay *et al.*, 1993). یکی از بهترین راهکارها برای تعیین و تأیید نقش یک ژن، بررسی فیزیولوژیک و مولکولی گیاهان جهش‌یافته و تراریخت و مقایسه آن با گیاهان وحشی است که از طریق

HATS، بر اساس درصد برگچه‌های کاملاً باز بعد از هفت روز از آغاز کشت انجام گردید. شایان ذکر است که با توجه به اینکه در شرایط معمولی (بدون کلرات) برای تهیه این محیط از نیترات پتاسیم و کلسیم به عنوان منبع تأمین‌کننده نیتروژن استفاده می‌شود، بنابراین، در شرایط آزمایش کنونی، کمبود عناصر پتاسیم و کلسیم با افزودن غلظت‌های مناسبی از محلول KCl و CaCl_2 جبران شد. کلیه آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق، در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی در حداقل سه تکرار طراحی گردید. آنالیز داده‌های حاصل از این تحقیق با نرم‌افزار آماری Sigma Stat و از طریق مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار با احتمال $P \leq 0.05$ صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

۱- آزمایش مقدماتی برای بررسی تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات

الف- بررسی تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات در اسیدیته‌های مختلف

بر اساس شکل ۱-الف و ب، در محیط فاقد کلرات یا حاوی ۱۰ میکرومولار کلرات با اسیدیته ۶ در اکثر موارد اختلاف معنی‌داری در درصد برگچه‌های کاملاً باز بین ۶ ژنوتیپ ذکر شده وجود ندارد، به استثنای جهش یافته *atnrt2.1* و تیپ وحشی Col در ۱۰ میکرومولار کلرات که به لحاظ این شاخص با سایر ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند (شکل ۱-ب). همان‌طور که در شکل ۱-ج و د مشاهده می‌گردد، با افزایش غلظت کلرات در محیط این شاخص در شش ژنوتیپ فوق کاهش

جهش یافته *atnrt2.1* جهش یافته *atnrt2.1* ترا ریخته شده با ژن *NpNRT2* از *Nicotiana plumbaginifolia* به صورت (*atnrt2.1* RoID::*NpNRT2*) و آراییدوپسیس ترا ریخته شده با *AtNRT2.1* RoID:: انتخاب شدند که همگی دارای زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS بودند. صرف‌نظر از مرحله آزمایش، ابتدا کلیه بذرها با محلول ژاول-تانول ۹۵ درصد استریل شدند و بعد از شستشو با اتانول ۹۵ درصد و تخلیه آن، به مدت ۲ ساعت در زیر هود لامینار قرار گرفتند تا اتانول باقی‌مانده کاملاً تبخیر شود. سپس در شرایط کاملاً استریل در هر پتری‌دیش حاوی محیط کشت جامد ۵۰ بذریه از هر ژنوتیپ با فواصل منظم و در سه تکرار کاشته شد. برای کشت بذرها از محیط کشت جامد مطابق با روش Little و همکاران در ۲۰۰۵ استفاده گردید. در مرحله مقدماتی، چهار غلظت کلرات پتاسیم، شامل ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در دو اسیدیته ۶ و ۶/۵ بدون حضور نیترات در محیط و در آزمایش بعدی سه غلظت مختلف کلرات پتاسیم شامل ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در ترکیب با سه غلظت مختلف نیترات پتاسیم شامل ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در اسیدیته ۶/۵ به کار برده شد. هر مرحله از این مطالعه در سه تکرار انجام گردید. برای تنظیم pH از محلول ۱۴ درصد MES (Morpholino-ethanesulfonic acid) و ۰/۱۶ BCP در صد (Bromocresol) استفاده شد. بعد از کشت، کلیه پتری‌دیش‌های حاوی بذریه به مدت ۴۸ ساعت به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی، دمای شبانه‌روزی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰ درصد و شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه انتقال یافتند. بررسی و ارزیابی تأثیر کلرات بر روی عملکرد

جهش یافته *atnrt2.4* (با زمینه ژنتیکی اکوتیپ Col) استفاده شد. جهش یافته *atnrt2.1* به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های پایین کلرات بر جذب آن به واسطه HATS انتخاب شد. با توجه به این که مطالعات قبلی حاکی از تشدید بیان ژن *AtNRT2.4* در فقدان عملکرد ژن *AtNRT2.1* است (Orsel et al., 2004)، جهش یافته *atnrt2.4* برای تعیین نقش ژن *AtNRT2.4* در جذب غلظت‌های میکرومولاری کلرات استفاده گردید.

همچنین، برخی مطالعات (Lie et al., 1999; Wang et al., 1998) بیانگر آن است که ژن *CHL1* یک ناقل با تمایل دوگانه LATS و HATS را برای جذب نیترات کد می‌کند، بنابراین جهش یافته *chl1-5* استفاده شد تا تأثیر غلظت‌های پایین کلرات بر این جهش یافته بررسی گردد.

بر اساس مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۳ توسط Okamoto و همکاران، پیشنهاد شده است که ژن *AtNRT2.4* در گروه ژن‌های القا شونده توسط نیترات قرار می‌گیرد، در حالی که بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات ذوفن و همکاران در سال ۱۳۸۹ با استفاده از گیاهان آرابیدوپسیس جهش یافته و تراریخت در این ژن، به نظر می‌رسد که ژن مذکور جزو ژن‌های ممانعت‌شونده توسط نیترات باشد؛ به طوری که بیان آن در شرایط غنی از نیترات کاهش و با برقراری شرایط محرومیت از نیتروژن افزایش می‌یابد. با وجود این، نقش دقیق ژن *AtNRT2.4* در جذب غلظت‌های پایین نیترات در گیاهان هنوز مشخص نشده است. با توجه به کاهش معنی‌دار درصد برگچه‌های کاملاً باز در جهش یافته *atnrt2.4* در مقایسه با جهش یافته *atnrt2.1* (شکل ۱- ج و د، شکل ۲- ج و د) در دو اسیدیته ۶ و ۶/۵ و نتایج حاصل از بررسی میزان جذب

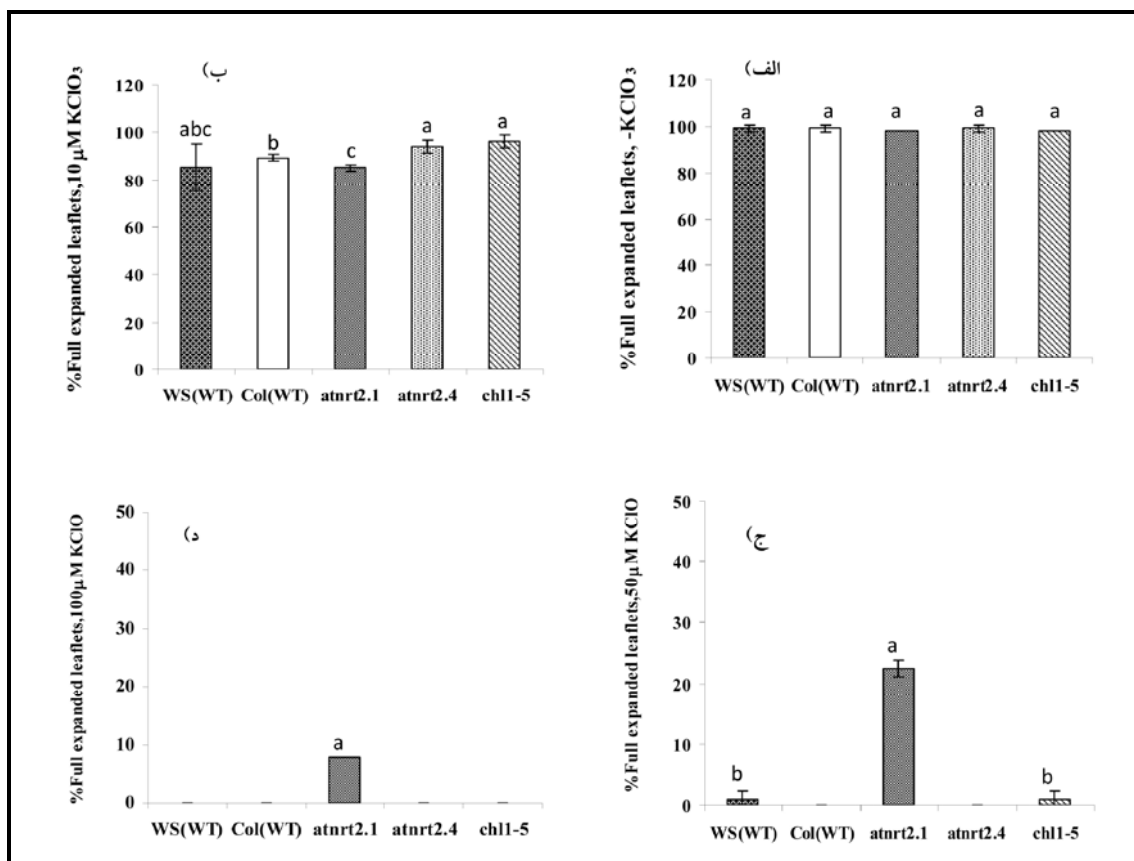
می‌یابد (مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف کلرات در آزمایش مقدماتی، همچنین غلظت‌های مختلف کلرات و نیترات در آزمایش نهایی از طریق آزمون دانکن انجام، ولی نتایج آن ارائه نشده است). با وجود این، در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرات جهش یافته *atnrt2.1* بالاترین میزان این شاخص را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد. همان طور که در شکل ۲- الف تا د مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت کلرات در محیط دارای اسیدیته ۶/۵ درصد برگچه‌های کاملاً باز کاهش معنی‌داری را برای همه ژنوتیپ‌های مورد اشاره نشان می‌دهد (نتایج آماری مربوط به این مقایسه ارائه نشده است). با وجود این، در غلظت‌های بالاتر کلرات (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) جهش یافته *atnrt2.1* افزایش معنی‌داری را در این شاخص در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر از خود ارائه می‌نماید (شکل ۲- ج و د). علاوه بر این، در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرات درصد برگچه‌های کاملاً باز در تیپ وحشی WS بعد از جهش یافته *atnrt2.1* دارای افزایش معنی‌داری است.

کلرات یک علف‌کش و یک ماده برگ‌ریز و تجزیه‌کننده کلروفیل است که در مطالعات اولیه فیزیولوژی جذب نیترات به عنوان یک آنالوگ نیترات، به ویژه در غلظت‌های بالا بسیار مؤثر بوده است. کلرات برای اولین بار برای شناسایی جهش یافته‌های مقاوم به غلظت‌های بالای کلرات با عنوان *chl1* در گیاه آرابیدوپسیس استفاده شد (Tsay et al., 1993). این تحقیقات نشان داد که ژن *CHL1* (که به آن ژن *AtNRT1.1* نیز گفته می‌شود) احتمالاً یک ناقل LATS را برای جذب کلرات (نیترات) کد می‌نماید. در این بخش از تحقیق، از جهش یافته‌های *atnrt2.1*، *chl1-5* (با زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS) و

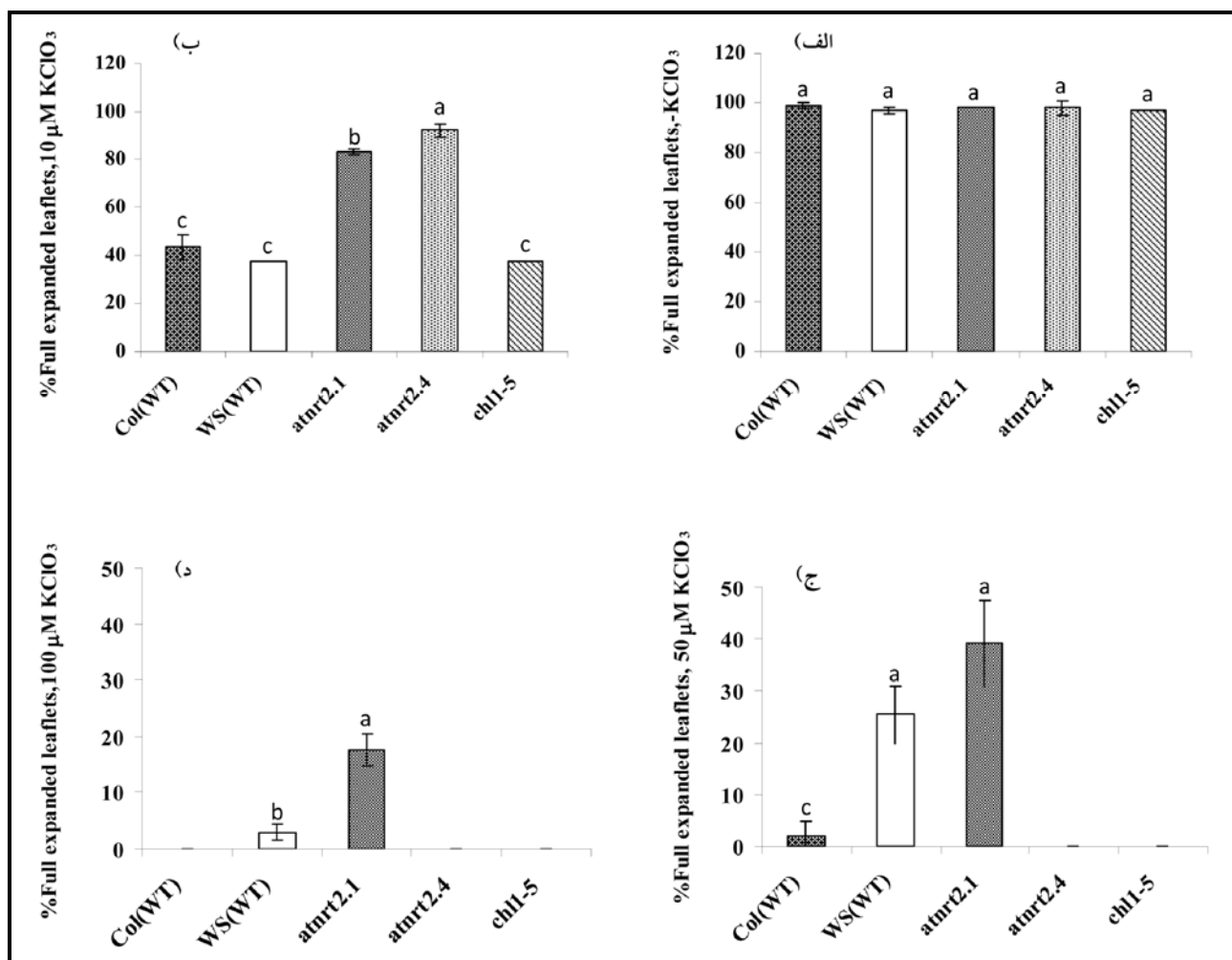
تیپ وحشی است (شکل ۱- ج و د، شکل ۲- ج و د). بنابراین، با تکیه بر این نتایج تصور می‌شود که ژن *AtNRT2.1* نقش اصلی و کلیدی را در عملکرد HATS ایفا می‌نماید؛ به طوری که ایجاد جهش در ژن *AtCHL1* یا ژن *AtNRT2.4* نمی‌تواند به ایجاد مقاومت در ژنوتیپ‌های مربوطه در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولاری کلرات منجر گردد، در حالی که اختلال در بیان ژن *AtNRT2.1* با ممانعت از جذب کلرات به ایجاد مقاومت در برابر کلرات، بروز سمیت کمتر و در نتیجه درصد جوانه‌زنی بالاتر منجر می‌گردد.

$^{15}\text{NO}_3$ در لاین‌های این جهش‌یافته که با ژن *AtNRT2.4* تراریخت شده‌اند (ذوفن، ۱۳۸۷)، به نظر می‌رسد که احتمالاً پروتئین حاصل از بیان ژن *AtNRT2.4* در جذب مستقیم غلظت‌های پایین نترات توسط ریشه‌ها به عنوان یک سیستم HATS مشارکت ندارد.

اگرچه پیشنهاد شده است که ناقل *CHL1* یک ناقل با تمایل دوگانه LATS و HATS است (Huang *et al.*, 1999)، با این حال، اختلال در بیان ژن *AtCHL1-5* درصد برگچه‌ها را در قیاس با جهش‌یافته *atnrt2.1* به شدت کاهش می‌دهد و این کاهش در سطح قابل مشاهده برای



شکل ۱- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف) ۱۰؛ ب) ۱۰۰؛ ج) ۵۰ و د) ۱۰۰ میکرومولار کلرات در محیط بدون نترات با اسیدیته ۶ در آراییدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی اکوتیپ Col و WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار \pm SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۲- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف) ۰؛ ب) ۱۰؛ ج) ۵۰ و د) ۱۰۰ میکرومولار کلرات در اسیدیته ۶/۵ در آراییدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی دو اکوتیپ Col و WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار \pm SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

توانایی ژن *AtNRT2.1* در جذب کلرات به شکل دقیق‌تری بررسی گردد. کلیه ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این قسمت از تحقیق دارای زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS بودند. از طرف دیگر، نتایج آزمایش مقدماتی بیانگر آن بود که اسیدیته ۶ در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرات مقاومت کمتری را در جهش یافته *atnrt2.1* و تیپ وحشی WS در مقایسه با اسیدیته ۶/۵ نشان می‌دهد. بنابراین، برای تعیین و درک بهتر نقش ژن *AtNRT2.1* در جذب کلرات تصمیم

۲- تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات به همراه غلظت‌های پایین نیترات

با توجه به اینکه نتایج حاصل از آزمایش مقدماتی نشان داد که جهش یافته *atnrt2.1* بالاترین میزان مقاومت به کلرات را به ویژه در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار هم در اسیدیته ۶ و هم در اسیدیته ۶/۵ دارد، بنابراین، در آزمایش دوم از جهش یافته *atnrt2.1*، جهش یافته *atnrt2.1* تراریخته شده با ژن *NpNRT2.1* از تنباکو و آراییدوپسیس تراریخته شده با ژن *AtNRT2.1* استفاده شد تا نقش و

غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار از خود افزایش نشان می‌دهد. بخش دوم این تحقیق با هدف درک بهتر نقش ژن *NRT2.1* و تکمیل نتایج به دست آمده از بخش اول انجام گردید. نتایج حاصل از بخش مقدماتی نشان می‌دهد که احتمالاً ژن *AtNRT2.1* عملکرد اصلی را در جذب نیترات از این طریق دارد (شکل‌های ۱ و ۲). جهش یافته *atnrt2.1* ترا ریخت شده با ژن *NpNRT2.1* از گیاه تنباکو، باعث کاهش قابل توجه مقاومت گیاهچه‌های آراییدوپسیس تالیانا، به ویژه در غلظت ۵۰ میکرومولار کلرات همراه با غلظت‌های ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار نیترات می‌گردد، به طوری که این کاهش در سطح مشاهده شده برای تیپ وحشی است (شکل‌های ۳، ۴ و ۵ موارد ب و ج).

بنابراین، به نظر می‌رسد که احیای بیان ژن *NRT2.1* در جهش یافته *atnrt2.1* با فعال کردن سیستم HATS و جذب کلرات، شرایط را برای کاهش شاخص فوق فراهم نموده است. با وجود این، بر اساس برخی از نتایج به دست آمده از این تحقیق تشدید بیان ژن *AtNRT2.1* تحت کنترل پروموتور RoID در گیاه آراییدوپسیس تالیانا منجر به جذب بیشتر کلرات و در نتیجه کاهش درصد برگچه‌های کاملاً باز نشده است (شکل ۳-ج). با توجه به تأیید بیان ژن انتقالی *NpNRT2.1* در جهش یافته *atnrt2.1* در سطح کپی‌برداری و ترجمه (مکاتبه شخصی با Daniel-Vedele)، تصور می‌شود که عوامل درونی ناشناخته‌ای در سطوح بعد از کپی‌برداری (برای مثال، افزایش بیش از حد کپی‌های ژن بر اثر بیان مداوم ژن انتقالی) از بیان پروتئین عملکردی و فعال تحت شرایط آزمایش کنونی ممانعت می‌نمایند؛ به طوری که بیان مداوم ژن انتقالی منجر به کاهش درصد برگچه‌های کاملاً باز در اکثر موارد، به ویژه در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار نیترات نمی‌گردد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵

گرفته شد که در آزمایش دوم فقط اسیدیتته ۶/۵ به محیط کشت اعمال گردد. علاوه بر این، آزمایش اول بیانگر آن بود که غلظت ۱۰۰ میکرومولار کلرات تقریباً برای همه ژنوتیپ‌ها به استثنای جهش یافته *atnrt2.1* گذشته است. همچنین، به نظر می‌رسید که عدم حضور نیترات در محیط باعث از بین رفتن سریع‌تر گیاهچه‌ها توسط کلرات می‌گردد. بنابراین، در بخش دوم این تحقیق و در یک طراحی جدید حداکثر غلظت کلرات ۵۰ میکرومولار و به همراه سه غلظت مختلف نیترات شامل ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار نیترات انتخاب شد.

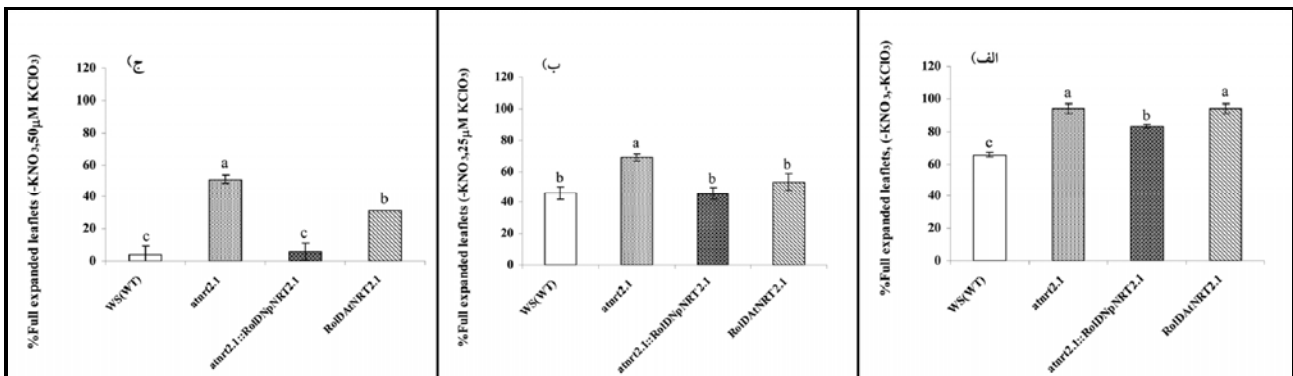
همان‌طور که در شکل ۳-الف، ب و ج مشاهده می‌شود، در محیط فاقد نیترات با افزایش غلظت کلرات درصد برگچه‌های کاملاً باز در همه ژنوتیپ‌ها از خود کاهش نشان می‌دهد. با این حال، این کاهش در جهش یافته *atnrt2.1* به طور معنی‌داری کمتر است. در محیط حاوی ۵۰ میکرومولار کلرات، تشدید بیان ژن *NpNRT2.1* در جهش یافته *atnrt2.1* به کاهش شدید شاخص ذکر شده در سطح مشاهده شده برای تیپ وحشی منجر می‌شود (شکل ۳-ج).

با افزودن ۲۵ میکرومولار نیترات به محیط، افزایش غلظت کلرات به کاهش درصد برگچه‌های کاملاً باز در همه ژنوتیپ‌ها منجر می‌گردد (شکل ۴-الف، ب و ج). با وجود این، جهش یافته *atnrt2.1* بالاترین درصد شاخص رشدی فوق را نشان می‌دهد.

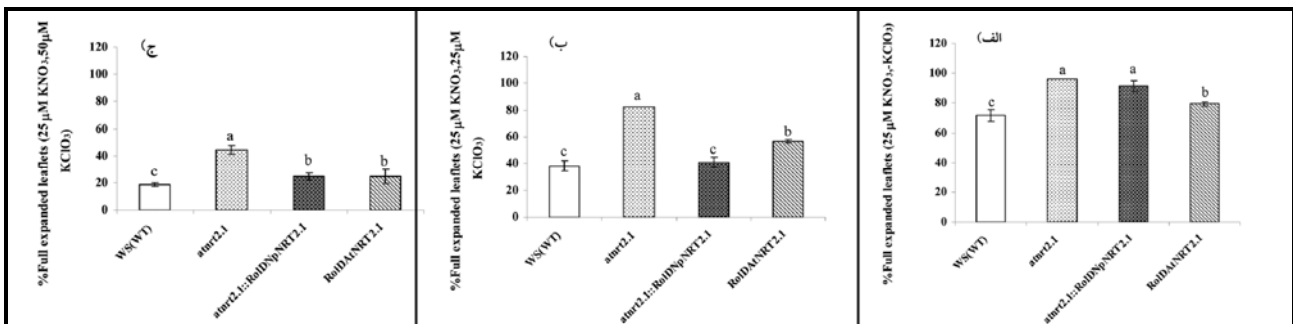
بر اساس شکل ۵-الف، ب و ج، درصد برگچه‌های کاملاً باز در جهش یافته *atnrt2.1* و گیاهان ترا ریخت شده با ژن *AtNRT2.1* در مقایسه با تیپ وحشی و جهش یافته ترا ریخت شده با ژن *NpNRT2.1* در محیط حاوی ۵۰ میکرومولار نیترات با سه غلظت مختلف کلرات، به ویژه در

و جذب نیترات می‌تواند تا حدودی از آثار مخرب کلرات بر شاخص رشدی مذکور جلوگیری نماید. در یک جمع‌بندی کلی و با تکیه بر نتایج به دست آمده از تأثیر غلظت‌های میکرومولاری کلرات بر روی سیستم HATS، مجدداً نتایج مطالعات فیزیولوژیک و مولکولی انجام شده (Cerezo *et al.*, 2001; Chopin *et al.*, 2007; Fraiser *et al.*, 2000; Nazoa *et al.*, 2003; Orsel *et al.*, 2003 مبنی بر مشارکت مستقیم ژن *NRT2.1* در جذب غلظت‌های پایین نیترات به واسطه HATS تأیید می‌گردد.

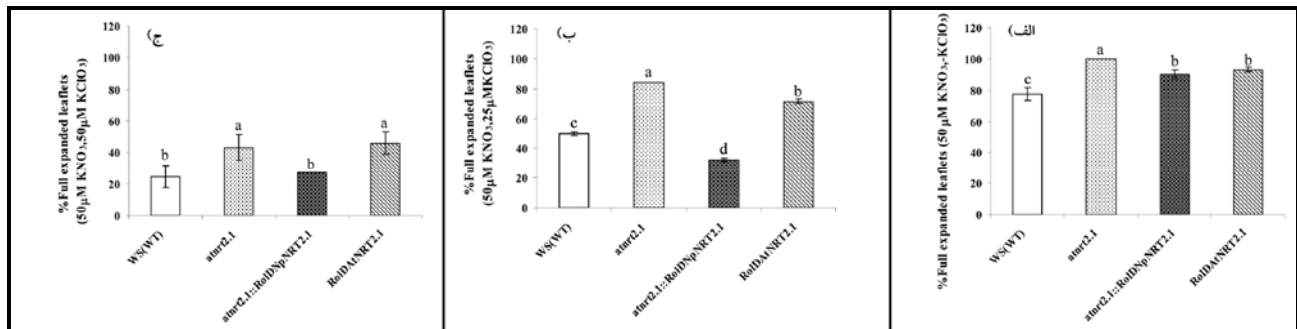
موارد ب و ج). همان‌طور که در نتایج حاصل از بخش دوم مشاهده می‌شود، اعمال نیترات به محیط در حضور کلرات، از کاهش بیش از حد شاخص رشدی مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های ذکر شده ممانعت می‌نماید؛ به طوری که با افزایش غلظت نیترات در محیط، حتی تیپ وحشی نیز اندکی مقاومت در برابر غلظت‌های میکرومولاری کلرات از خود نشان می‌دهد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵).
با توجه به اینکه کلرات به عنوان یک آنالوگ نیترات عمل می‌کند، به نظر می‌رسد که نیترات و کلرات در رقابت با یکدیگر توسط یک سیستم ناقل مشترک جذب می‌شوند



شکل ۳- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف) ۵۰، ب) ۲۵ و ج) ۵۰ میکرومولار کلرات در محیط بدون نیترات با اسیدیته ۶/۵ در آراییدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار \pm SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۴- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف) ۵۰، ب) ۲۵ و ج) ۲۵ میکرومولار کلرات در محیط دارای ۲۵ میکرومولار نیترات با اسیدیته ۶/۵ در آراییدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار \pm SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۵- درصد برگچه‌های کاملاً باز در غلظت‌های الف) ۵۰، ب) ۲۵ و ج) ۵۰ میکرومولار کلرات در محیط دارای ۵۰ میکرومولار نیترات با اسیدیته ۶/۵ در آراییدوپسیس تالیانا با زمینه ژنتیکی اکوتیپ WS. مقادیر بیانگر میانگین حداکثر سه تکرار \pm SD است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام گرفته و حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات کشاورزی INRA واقع در کشور فرانسه جهت تأمین منابع بذری قدردانی می‌گردد.

منابع

ذوفن، پ.، شریعتی، م. و دنیل - ودل، ف. (۱۳۸۹) پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی ناقل AtNRT2.4 به شرایط محرومیت نیتروژن در گیاه *Arabidopsis thaliana*. مجله زیست‌شناسی ایران ۲۳: ۹۴-۱۰۸.

ذوفن، پ. (۱۳۸۷) فیزیولوژی جذب نیترات توسط ناقل NRT2.1 در گیاه ترانسژنی تنباکو (*Nicotiana plumbaginifolia*). پایان‌نامه دکتری، دانشگاه اصفهان، اصفهان.

Cerezo, M., Tillard, P., Filleur, S., Munos, S., Daniel-Vedele, F. and Gojon, A. (2001) Major alterations of the regulation of root NO₃ uptake are associated with the mutation of *NRT2.1* and *NRT2.2* genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 262-271.

Chopin, F., Wirth, J., Dorbe, M. F., Lejay, L., Krapp, A., Gojon, A. and Daniel-Vedele F. (2007) The *Arabidopsis* nitrate transporter ATNRT2.1 is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 630-635.

Crawford, N. M. and Glass, A. D. M. (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3: 389-395.

Doddema, H., Hofstra, J. J. and Feenstra, W. J. (1978) Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. I. Effect of nitrogen source during growth on uptake of nitrate and chlorate. *Physiologia Plantarum* 43: 343-350.

Fraisier, V., Gojon, A., Tillard, P. and Daniel-Vedele, F. (2000) Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *Plant Journal* 23: 489-496.

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.
- Filleur, S., Dorbe, M. F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A. and Daniel-Vedele, F. (2001) An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *NRT2* genes is impaired in nitrate uptake. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 489: 220-224.
- Forde, B. G. and Clarkson, D. T. (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research* 30: 1-90.
- Glass, A. D. M., Shaff, J. E. and Kochian, L. V. (1992) Studies of nitrate uptake in barley. IV: electrophysiology. *Plant Physiology* 99: 456-463.
- Huang, N. C., Liu, K. H., Lo, H. J. and Tsay, Y. F. (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant Cell* 11: 1381-1392.
- Kronzucker, H. G., Siddiqi, M. Y. and Glass, A. D. M. (1995) Kinetics of NO_3 influx in spruce. *Plant Physiology* 109: 319-326.
- Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N. M., Siddiqi, M. Y. and Glass, A. D. M. (2007) Dissection of the *AtNRT2.1*: *AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiology* 143: 425-433.
- Little, D. Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A. and Malamy, J. E. (2005) The putative high-affinity nitrate transporter *NRT2.1* represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 102: 13693-13698.
- Liu, K. H., Huang, C. Y. and Tsay, Y. F. (1999) *CHL1* is a dual-affinity nitrate uptake. *The Plant Cell* 11: 865-874.
- Miller, A. J. and Smith, S. J. (1992) The mechanisms of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells. *Planta* 187: 554-557.
- Nazoa, P., Vidmar, J. J., Tranbarger, T. J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P., Zhou, D., Glass, A. D. M. and Touraine, B. (2003) Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Molecular Biology* 52: 689-703.
- Okamoto, M., Vidmar, J. J. and Glass, A. D. M. (2003) Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiology* 44: 304-317.
- Orsel, M., Eulenburg, K., Krapp, A. and Daniel-Vedele, F. (2004) Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* 219: 714-721.
- Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J. and Rufty, T. (1990) Studies of the uptake of nitrate in barley: I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3$ influx. *Plant Physiology* 93: 1426-1432.
- Tsay, Y. F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A. and Crawford, N. M. (1993) The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72:705-713.
- Wang, R., Liu, D. and Crawford, N. M. (1998) The *Arabidopsis* *CHL1* protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95: 1248-1254.
- Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J. J. and Glass, A. D. M. (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2:1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 17: 563-568.

The effect of chlorate micromolar concentrations on HATS nitrate uptake in *Arabidopsis thaliana*

Parzhak Zoufan^{*1} and Mansour Shariati²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz

² Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan

Abstract

The effect of chlorate different concentrations between 0 to 100 μM on high affinity transport system activity using *Arabidopsis thaliana* mutants *atnrt2.1*, *atnrt2.4* and *chl1-5* and transformants in *NRT2.1* gene in two research sections was studied. In the first section, two pH 6 and 6.5 were used in a medium of free nitrate. 3 different nitrate and chlorate concentrations including 0, 25 and 50 μM with pH 6.5 were selected during second section. All seeds were cultured on solid medium and maintained in a controlled-environment condition. After 7 days, in order to gain further insight into the role of nitrate high affinity transport system, percentage of full expanded leaflets as indicator of high affinity transport system activity was investigated. The results showed the superiority of *atnrt2.1* mutant in comparison with the other genotypes, especially on higher concentrations of chlorate, either with nitrate or without nitrate. Deregulation of *AtNRT2.4* and *AtCHL1* genes was not conducive to significant resistance. On the other hand, upregulation of *NpNRT2.1* gene in *atnrt2.1* mutant decreased percentage of full expanded leaflets. Based on these results, it was confirmed that *AtNRT2.1* gene had key and important role in nitrate uptake by high affinity transport system.

Key words: *Arabidopsis*, High affinity transport system, Chlorate, Nitrate