ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٥
صفحه ٥٤٦ - ٥٣٩

مطالعه بیان ژن *GTP* سیکلوهیدرولاز I تحت تنش‌های غیرزیستی در انگور (*Vitis vinifera*. L)

Expression Analysis of *GTP* Cyclohydrolase I Gene under Abiotic Stresses in Grape (*Vitis vinifera* L.)

نادیا اسلامی بجنوردی[1]، رحیم حداد*[1]، قاسمعلی گروسی[1]، سعید نواب‌پور[2]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه گرگان، گرگان، ایران

Eslami Bojnordi N[1], Haddad R[*1], Garousi Gh[1], Navabpour S[2]

1- Graduated MSc Student, Associate Professors, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University, Gorgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raheemhaddad@yahoo.co.uk

(تاریخ دریافت: ۹٤/۱/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲٦)

چکیده

GTP سیکلوهیدرولاز I از طریق مجموعه‌ای از واکنش‌ها، تبدیل GTP به دی‌هیدرونئوپترین تری‌فسفات و فوماریک اسید را کاتالیز می‌کند. این واکنش اولین مرحله در بیوسنتز تتراهیدروفولات (FH_4) در گیاهان و میکروارگانیسم‌ها و تتراهیدروبیوپترین (BH_4) در پستانداران می‌باشد. فولات‌ها از یک واحد پارا- آمینو بنزوئیک اسید (pABA) متصل به یک حلقه پترین، مشتق از GTP، و تعدادی واحد گلوتامات تشکیل شده‌اند. در این پژوهش، بیان ژن Vv*gtpch* I تحت تنش‌های غیرزیستی و اکسیداتیو با روش RT-PCR نیمه‌کمی در بافت برگ گیاه انگور مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که این ژن تحت تنش‌های غیرزیستی به‌طور متفاوتی القا می‌شود. سطح رونوشت ژن Vv*gtpch* I تحت تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری و گرما در مقایسه با گیاه شاهد کاهش یافت. همچنین تحت تیمارهای دی‌آمید (Diamide)، آلومینیوم و هورمون‌های آبسیزیک اسید (ABA) و سالیسیلیک اسید (SA) میزان رونوشت ژن Vv*gtpch* I با کاهش مواجه شده در حالی‌که بیان این ژن تحت تیمار با آب اکسیژنه (H_2O_2)، سولفات مس ($CuSO_4$) و فلزات سنگین همچون کادمیوم ($CdCl_2$) و کبالت ($CoCl_2$) افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی

بررسی بیان ژن
تنش اکسیداتیو
تنش غیرزیستی
GTP سیکلوهیدرولاز I
RT-PCR نیمه‌کمی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.7.6]

مقدمه

GTP سیکلوهیدرولاز I[1] از طریق مجموعه‌ای از واکنش‌ها، تبدیل GTP به دی‌هیدرونئوپترین تری‌فسفات[2] و فوماریک اسید[3] را کاتالیز می‌کند که اولین مرحله در بیوسنتز تتراهیدروفولات[4] (FH_4) در گیاهان و میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (Burg and Brown 1968). تتراهیدروفولات و مشتقات دیگر آن جزئی از خانواده‌ی گسترده پلی گلوتامات‌های (معمولاً پنج تا هفت واحد گلوتامیل) اسید پتروئیک محسوب می‌شوند. فولات‌ها، کوفاکتورهای ضروری برای انجام واکنش‌های انتقال تک‌کربنه در همه میکروارگانیسم‌ها محسوب شده و در بیوسنتز پورین‌ها، پیریمیدین‌ها، پانتوتنات، تیمیدیلات و هم‌چنین در متابولیسم چندین اسید آمینه از قبیل متیونین، سرین و گلیسین نقش دارند (Storozhenko et al. 2005). فولات‌ها از سه بخش پترین، پارا-آمینو بنزوئیک اسید[5] (p-ABA) و گلوتامات تشکیل شده‌اند. پارا-آمینو بنزوئیک اسید از کوریسمات در پلاستیدها سنتز می‌شود (Basset et al. 2004) در صورتی که پترین در سیتوزول و توسط GTP سیکلوهیدرولاز I سنتز می‌شود (Basset et al. 2002). سپس پترین و پارا-آمینو بنزوئیک اسید به‌عنوان اجزای تشکیل‌دهنده فولات وارد میتوکندری می‌شوند (Cossins 2000). فولات یا اسید فولیک به همراه ویتامین B_{12} و ویتامین C به هضم مواد غذایی، استفاده بدن از پروتئین و ساخت پروتئین در زمان نیاز کمک می‌کند. این ویتامین برای ساخت گلبول‌های قرمز خون لازم بوده و در بیوسنتز DNA نیز به‌عنوان دهنده یا گیرنده گروه‌های کربن شماره یک ایفای نقش می‌کند. کمبود اسید فولیک با بیماری‌های نقص رشته عصبی مانند اسپینابیفیدا[6] و آنسفالی[7] (Imbard et al. 2013)، بیماری‌های قلبی و عروقی (Lonn et al. 2006)، انواع سرطان (Aune et al. 2011) و سندرم‌های مغزی در کودکان (Pérez-Dueñas et al. 2011) در ارتباط است.

در پژوهش‌های مختلفی، قطعات cDNA رمز کننده آنزیم GTP سیکلوهیدرولاز I از موجودات زنده مانند انسان (Witter et al. 1996)، نماتودهای دیکتیوکالوس ویویپاروس[8] و تلادورساگیا سیرکومسینکتا[9] (Baker et al. 2011)، باکتری پلاسمودیوم فلاسیپاروم (Kümpornsin et al. 2014) و گیاه گوجه‌فرنگی[10] (Waller et al. 2010) جداسازی و همسانه‌سازی شده‌است. طی تحقیقی، ژن *gtpch* I از موش به گوجه‌فرنگی انتقال داده شد. هنگامی که هیبرید نسل اول این لاین تراریخته مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که میزان فولات آن در مقایسه با شاهد به مقدار زیادی افزایش یافته است. همچنین میزان بیان ژن *gtpch* I در سطح ترجمه در دو واریته گوجه‌فرنگی بررسی شد. نتایج نشان دادند که میزان بیان آنزیم در مرحله رسیدگی سبز در واریته پاکوتاه میکروتوم[11] نسبت به واریته آیلس‌کرایگ[12] که یک واریته استاندارد محسوب می‌شود، تغییری نداشت. اما در مرحله نیمه-قرمزی و رسیدگی کامل، مقدار آنزیم در واریته پاکوتاه میکروتوم افزایش یافت (Waller et al. 2010). بیان ژن *gtpch* I تحت تنش‌های غیرزیستی به ویژه در گیاه آرابیدوپسیس مورد مطالعه قرار گرفته است. بررسی پروفایل بیانی حدود ۲٤۰۰۰ ژن از دانه گرده گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش سرمایی با استفاده از فناوری ریزآرایه DNA نشان داد که ژن *gtpch* I با کاهش بیان روبرو می‌شود (Changsong and Diqiu 2010). هم‌چنین Navarrete et al. (2012) با بررسی بیان ژن‌ها در بذور گیاه آرابیدوپسیس نشان دادند که تحت تنش‌های غیرزیستی، ژن‌های بیوسنتز تتراهیدروفولات بویژه ژن *gtpch* I القاء نمی‌شوند. Nunes et al. (2009) با استفاده از یک ژن مصنوعی *gtpch* I ساخته شده (براساس ژن *gtpch* I مرغ)، گیاهان کاهو تراریخته‌ای تولید کردند که در مقایسه با گیاهان شاهد حدود ۸/۵ -۲/۱ برابر فولات بیشتری تولید می‌کردند. آن‌ها نشان دادند که می‌توان غنی‌سازی فولات را با مهندسی هم‌زمان مسیرهای متابولیکی سنتز پترین و پارا- آمینو بنزوئیک اسید انجام داد.

[1] GTP Cyclohydrolase I
[2] dihydroneopterin 3′ phosphate
[3] Fumaric acid
[4] Tetrahydro folate
[5] p- Aminobenzoeic acid
[6] Spina bifida
[7] Anencephaly

[8] *Dictyocaulus viviparus*
[9] *Teladorsagia circumcincta*
[10] *Lycopersicum solanum*
[11] Microtum
[12] Ellis Craig

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.7.6]

با توجه به اهمیت ویتامین‌ها در سلامت انسان، مطالعه و بررسی مسیرهای متابولیکی سنتز آن‌ها به‌ویژه تولید گیاهان تراریخته با میزان فولات بیشتر و مطالعه بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز فولات تحت تیمارهای زیستی و غیرزیستی و درک تنظیم بیان آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه بیان ژن Vv*gtpch* I تحت تنش‌های غیرزیستی همچون خشکی، شوری و گرما در گیاه انگور مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور درک میزان بیان این ژن تحت شرایط تنش اکسیداتیو، تیمارهای محلول‌های شیمیایی القاگر، فلزات سنگین و هورمون‌ها جهت تولید گونه‌های فعال اکسیژن اعمال شد.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های یکساله از گیاه انگور عسکری (*Vitis vinifera* L. Askari) از مزارع انگور در مرکز تحقیقات انگور واقع در تاکستان- قزوین در سال ۱۳۹۱ تهیه شدند. قلمه‌ها در گلدان‌های ۱۰ کیلوگرمی حاوی ۹/۵ کیلوگرم خاک رس، شن و کود به نسبت (۲:۱:۱) با یک دوره نوری ۱۶ ساعته در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و با نرخ $120\ \mu Mm^{-2}s^{-1}$ فوتون در گل‌خانه کشت شدند.

به‌منظور بررسی و مطالعه پاسخ ژن Vv*gtpch* I به تنش‌های مختلف محیطی، قلمه‌ها در سه تکرار با تنش‌های غیرزیستی تیمار شدند. برای اعمال تنش خشکی، آبیاری گلدان‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۲ روز متوقف شده و سپس محتوای نسبی آب برگ[1] (RWC) به روش Pruvot et al. (1996) تعیین شد. برای تنش شوری، قلمه‌ها به تدریج و در طی ۵ تا ۷ روز با غلظت‌های مختلفی از کلرید سدیم (NaCl) شامل ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار تیمار شدند. اعمال تنش‌های خشکی و شوری با نگهداری قلمه‌های تیمار شده و شاهد تحت شرایط دوره نوری ۱۶ ساعته، دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و نرخ $120\ \mu Mm^{-2}s^{-1}$ فوتون در گلخانه انجام شد. همچنین تنش گرمایی با نگهداری گلدان‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تحت شرایط دوره نوری ۱۶ ساعته، رطوبت ۵۰ درصد و نرخ $120\ \mu Mm^{-2}s^{-1}$ فوتون درون اتاق رشد (شرکت گروک، ایران) اعمال شد. پس از اعمال تنش‌های غیرزیستی، تعدادی برگ جوان و کاملا رشد یافته از قلمه‌های تیمار شده و شاهد جمع‌آوری و در نمونه‌های یک گرمی با استفاده از ازت مایع تثبیت و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به‌منظور اعمال تنش‌های اکسیداتیو، برای هر تیمار سه تا چهار برگ جوان و کاملا رشد یافته از قلمه‌های یکساله جدا شده و به قطعاتی با قطر یک سانتی‌متر بریده شدند. پس از فیلتراسیون خلا با آب‌مقطر، قطعات برگی درون محلول‌های القاگر (pH= ۵-۶) قرار گرفته و در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و نرخ $120\ \mu Mm^{-2}s^{-1}$ فوتون به مدت ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت تیمار شدند. محلول‌های القاگر برای تنش اکسیداتیو شامل ۱۰ mM آب اکسیژنه (H_2O_2)، mM یک دی‌آمید (diamide)، ۱۰۰ µM سولفات مس ($CuSO_4$)، µM ۱۰۰ کلرید کبالت ($CoCl_2$)، ۱۰۰ µM کلرید کادمیوم ($CdCl_2$)، ۱۰۰ µM کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$)، ۱۰۰ µM آبسیزیک اسید[2] (ABA) و ۱۰۰ µM سالسیلیک اسید[3] (SA) بودند.

RNA کل با استفاده از روش Heidari et al. (2011) از برگ‌های جوان و کاملا رشد یافته استخراج شد. RT-PCR نیمه‌کمی با استفاده از ۱۰۰ ng محصول واکنش نسخه‌برداری معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر محتوی ۲۰ پیکومولار از آغازگرهای اختصاصی ژن Vv*gtpch* I (با توالی‌های آغازگر رفت 5′-ATGGGCGTCTTGGACGAG-3′ و آغازگر برگشت 5′-TCAAGAAGTTGGAGTGTTTGAA-3′) انجام شد. واکنش RT-PCR نیمه‌کمی در ۳۰ چرخه طبق برنامه دمایی- زمانی زیر انجام شد: مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله واسرشت‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال به مدت یک دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و مرحله تکثیر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. هم‌چنین مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد.

ژن اکتین انگور (با توالی‌های آغازگر رفت 5′-GTTAGCAACTGGGATGATATGG-3′ و آغازگر

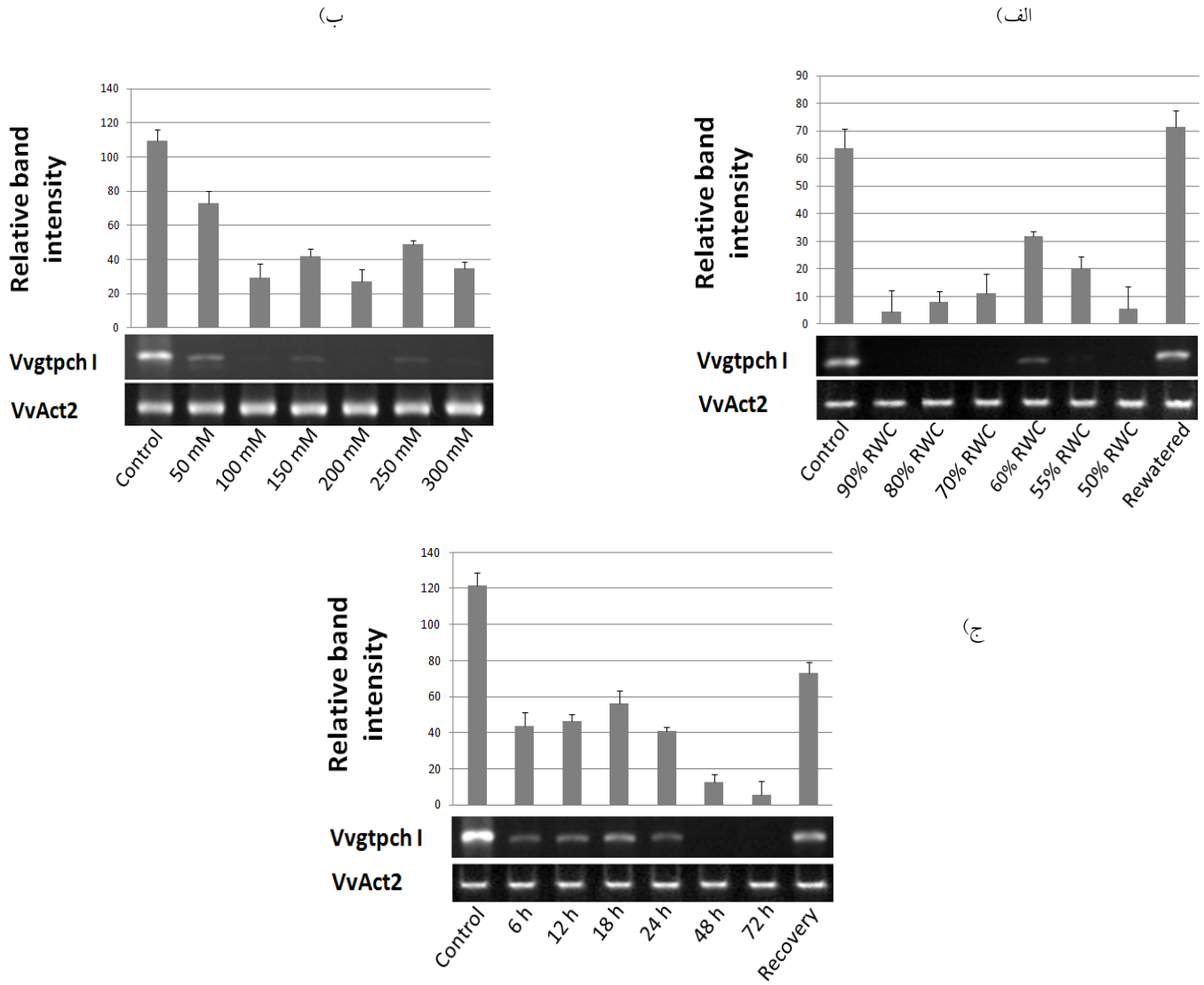
[1] Relative Water Content (RWC)

[2] Abscisic acid
[3] Salicylic acid

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.7.6]

برگشت ′3- AGCACCAATCGTGATGACTTG -′5) به‌عنوان یک ژن خانه‌دار[1] (برای تنش‌های شوری، خشکی و گرما) و H_2O به عنوان شاهد (برای تنش‌های اکسیداتیو) استفاده شد. به‌منظور بررسی احتمال آلودگی DNA ژنومی در نمونه‌های RT-PCR، واکنش PCR با تمام نمونه‌های RNA استخراجی به‌طور جداگانه انجام شد. واکنش‌ها در سه تکرار با یک شاهد منفی فاقد DNA الگو برای هر مرحله از واکنش‌های RT-PCR انجام شد. محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد جداسازی و شدت باندها به وسیله نرم‌افزار ImageJ با استفاده از ژن اکتین و H_2O به عنوان شاهد تعیین شدند (Abramoff et al. 2004).

[3] Housekeeping



شکل ۱- بررسی بیان ژن Vv*gtpch* I تحت تنش‌های غیرزیستی در بافت برگ گیاه انگور، الف) تنش خشکی اعمال شده در دامنه‌ای از RWC ۹۰-۵۰ درصد، ب) تنش شوری با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم شامل ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار، ج) تنش گرمایی اعمال شده در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۷۲- ٦ ساعت درون اتاق رشد. قلمه‌های انگور در سه تکرار تیمار شده و بررسی بیان به روش RT-PCR نیمه‌کمی انجام شد. یک ژل از بین سه ژل انتخاب و نشان داده شده‌است. شدت نسبی باندها با استفاده از ژن اکتین نرمال‌سازی شد و هر ستون نشان‌دهنده متوسط SD± بدست آمده از سه واکنش RT-PCR مستقل می‌باشد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.7.6]

نتایج و بحث

به‌منظور مطالعه پاسخ ژن V*gtpch* I به تنش‌های غیرزیستی، قلمه‌های انگور تحت شرایط تنش‌های خشکی، شوری و گرما در سه تکرار تیمار شده و بررسی بیان ژن به روش RT-PCR نیمه-کمی انجام شد (شکل ۱). گیاهان در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، روش‌های مختلفی که ترکیبی از تغییرات متابولیکی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی هستند را به‌کار می‌برند. این تغییرات در جهت سازگاری گیاه با شرایط محیطی بوده و به میزان زیادی متکی به تغییرات بیان ژن‌ها می‌باشد (Kamal et al. 2010). بررسی‌ها نشان داده‌اند که تنش اسمزی ایجاد شده توسط خشکی یا غلظت بالای نمک از طریق دو مسیر اصلی موجب بیان ژن‌ها می‌شود که این دو مسیر شامل مسیر وابسته به آبسیزیک اسید و مسیر مستقل از آبسیزیک اسید می‌باشد. مسیر وابسته به آبسیزیک اسید خود نیز شامل دو رهیافت می‌باشد که عبارتند از رهیافتی که مستلزم سنتز پروتئین‌های جدید بوده و دیگری که از پتانسیل پروتئین‌های موجود در گیاه استفاده می‌کند (Zhang et al. 2006). تحت تنش خشکی، بیان ژن V*gtpch* I در مقایسه با شاهد به-طور چشم‌گیری کاهش یافت به‌طوری‌که در مقادیر RWC ۹۰-۷۰ درصد، بیان ژن به میزان زیاد کاهش‌یافته اما در RWC ۶۰ درصد یک افزایش محسوس در مقدار رونوشت ژن V*gtpch* I مشاهده شد که مجددا تحت شرایط تنش شدید آبی (RWC ۵۰ درصد) با کاهش شدیدی مواجه شد (شکل ۱الف). هنگامی که قلمه‌های تحت تنش شدید آبی (RWC ۵۰ درصد) به‌مدت یک هفته مجددا آبیاری شدند و مقدار RWC آن‌ها به ۹۵ درصد رسید، مشاهده شد که میزان بیان ژن V*gtpch* I تا سطح بیان در گیاه شاهد افزایش یافت.

غلظت بالای کلرید سدیم در آب خاک نیز می‌تواند سبب ایجاد شرایط کمبود آب و نهایتا خشکی فیزیولوژیکی در گیاه شود. به عبارت دیگر تنش شوری با القا شرایط کمبود آب در گیاه موجب افزایش غلظت درونی هورمون آبسیزیک اسید و تحریک بیان ژن-ها از طریق مسیر وابسته به آبسیزیک اسید می‌شود، بنابراین پاسخ گیاهان به تنش شوری به دلیل القاء خشکی فیزیولوژیکی است و نه اثرات مستقیم کلرید سدیم (Zhang et al. 2006). مطالعات پروتئومیکس نشان می‌دهند که آنزیم‌های تخریب‌کننده گونه‌های اکسیژن فعال[1] (ROS) مانند سوپر اکسید دیسموتاز[2]، آسکوربات پراکسیداز[3]، دهیدروآسکوربات ردوکتاز[4] و غیره توسط تنش شوری القاء می‌شوند که نشان‌دهنده تولید گونه‌های اکسیژن فعال توسط تنش شوری است (Chattopadhyay et al. 2011). ژن V*gtpch* I تحت تنش شوری در مقایسه با گیاه شاهد با کاهش بیان مواجه شد (شکل ۱ب). همان‌طور که در شکل مشاهده می-شود همراه با افزایش غلظت کلرید سدیم، میزان بیان ژن V*gtpch* I در سطح نسخه‌برداری تقریباً و به تدریج کاهش یافت.

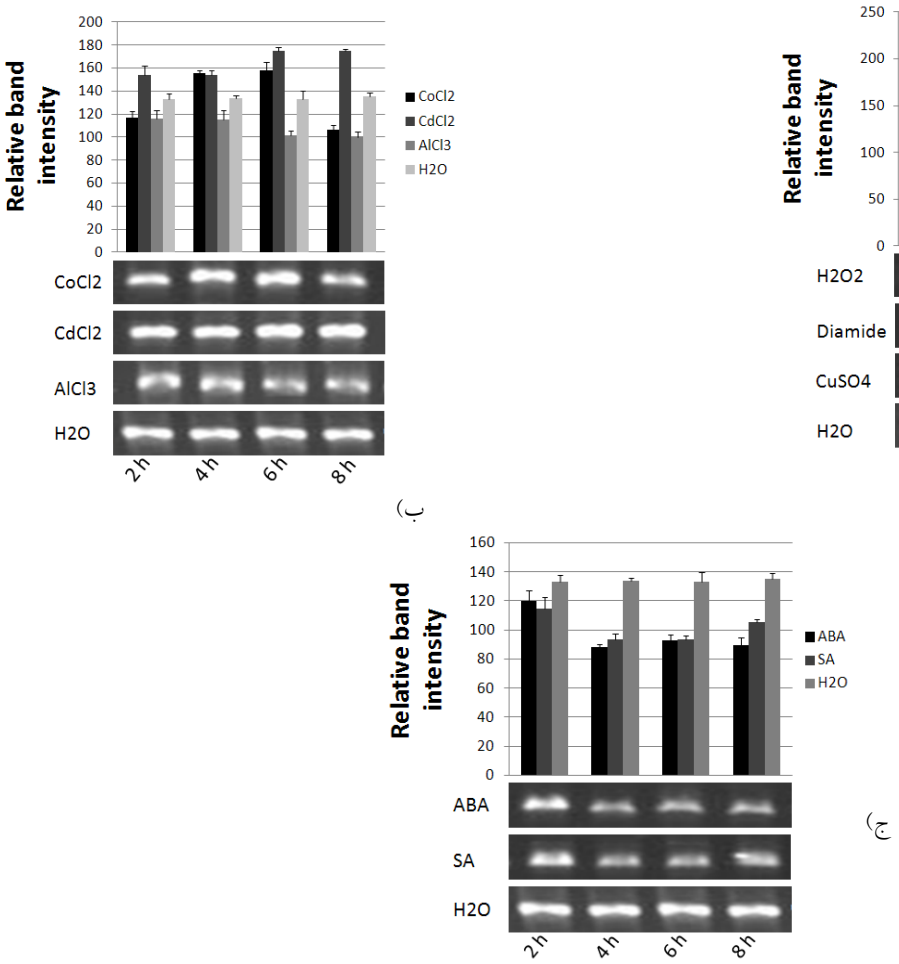
تنش گرمایی از یک طرف موجب واسرشته‌سازی پروتئین‌ها و آنزیم‌های سلولی شده و از طرف دیگر بیان پروتئین‌هایی با فعالیت چپرونی را افزایش می‌دهد (Kosova et al. 2011). بررسی‌ها نشان داده‌اند که مقدار آب اکسیژنه تحت دماهای بالا به سرعت افزایش یافته و ممکن است به عنوان یک مولکول مهم در مسیر ترارسانی پیام عمل نماید (Laloi et al. 2004). تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط گرما موجب افزایش بیان آنزیم‌های درگیر در فرآیند اکسیداسیون و احیاء سلولی از قبیل کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیداز و غیره می‌شود (Lee et al. 2007). مشابه با تنش‌های خشکی و شوری، بیان ژن V*gtpch* I نیز تحت تنش گرما با کاهش بیان مواجه شد (شکل ۱ج). بیان ژن V*gtpch* I تا ۱۸ ساعت پس از اعمال تنش به تدریج افزایش یافت و پس از آن تا ۷۲ ساعت اعمال تنش گرمایی با کاهش شدید مواجه شد. همچنین میزان رونوشت ژن V*gtpch* I در گلدان‌هایی که به مدت یک هفته پس از اعمال تنش گرمایی در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، مجددا افزایش یافت. مشابه با نتایج ما، مطالعه بیان ژن‌ها با استفاده از فناوری ریزآرایه DNA در بذور آرابیدوپسیس نشان داده است که هیچ‌یک از ژن‌های مسیر بیوسنتز تتراهیدروفولات از جمله ژن *gtpch* I توسط تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و گرما القا نشدند (Navarrete et al. 2012). کاهش بیان ژن *gtpch* I با بررسی بیان ژن‌ها در دانه‌های گرده بالغ تحت تیمار تنش سرمایی در گیاه آرابیدوپسیس نیز

[1] Reactive Oxygen Species (ROS)
[2] Superoxide dismutase
[3] Ascorbate peroxidase
[4] Dehydroascorbate reductase

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.7.6]

مشاهده شد (Changsong and Diqiu 2010). به‌منظور بررسی پاسخ ژن Vv*gtpch* I به تنش اکسیداتیو، از تیمارهای مختلفی مانند محلول‌های شیمیایی القاگر، فلزات سنگین و هورمون‌ها جهت تولید گونه‌های اکسیژن فعال استفاده شد (شکل ۲).

ژن Vv*gtpch* I تحت تیمار با آب اکسیژنه و یون مس (Cu^{2+})، افزایش شدیدی در مقدار رونوشت نشان داده و سطح رونوشت آن طی هشت ساعت اعمال تیمار ثابت باقی ماند. در تیمار با دی-آمید، به‌نظر می‌رسدکه بیان ژن Vv*gtpch* I در سطح نسخه‌برداری در تمام زمان‌های اعمال تیمار (۸-۲ ساعت) متوقف شده و عملاً باندهای مربوط به رونوشت روی ژل قابل مشاهده نیستند (شکل ۲ الف). بررسی بیان ژن Vv*gtpch* I تحت تیمار با فلزات سنگین نشان داد که سطح رونوشت آن تحت تیمار با کادمیوم به تدریج افزایش یافت، در حالی‌که در تیمار با آلومینیوم با کاهش تدریجی مواجه شد. هم‌چنین تحت تیمار با کبالت، سطح رونوشت ژن Vv*gtpch* I تا شش ساعت اعمال تیمار با افزایش و پس از آن با کاهش روبرو شد (شکل ۲ب).



شکل ۲- بررسی بیان ژن Vv*gtpch* I تحت تنش اکسیداتیو در بافت برگ گیاه انگور در بازه زمانی ۲، ٤، ٦ و ٨ ساعت. الف) تیمار محلول‌های شیمیایی القاگر شامل ۱۰ mM آب‌اکسیژنه، ۱ mM دی‌آمید، ۱۰۰ µM سولفات مس، ب) تیمار فلزات سنگین شامل ۱۰۰ µM کلرید کبالت، ۱۰۰ µM کلرید کادمیوم، ۱۰۰ µM کلرید آلومینیوم، ج) تیمارهای هورمونی شامل ۱۰۰ µM آبسیزیک اسید و ۱۰۰ µM سالسیلیک اسید. قطعات برگی به قطر یک سانتی‌متر درون محلول‌های فوق تیمار شده و بررسی بیان ژن به روش RT-PCR نیمه‌کمی انجام شد. آزمایشات در سه تکرار مستقل انجام شدند و یک ژل از بین سه ژل انتخاب و نشان داده شده‌است. شدت نسبی باندها با استفاده از شدت باند ژن اکتین نرمال‌سازی شد. هر ستون نمودار نشان‌دهنده متوسط SD± بدست آمده از سه واکنش RT-PCR مستقل می‌باشد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.7.6]

تحت تیمارهای هورمونی آبسیزیک اسید و سالیسیلیک اسید، میزان رونوشت ژن Vv*gtpch* I از دو ساعت تا هشت ساعت اعمال تیمار مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که سطح رونوشت آن تقریبا و به‌تدریج کاهش یافت (شکل ۲ج). آب اکسیژنه فعالیت *gtpch* I را به روش وابسته به میزان غلظت تنظیم می‌کند، بطوری که تا غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار بر لیتر، آنزیم gtpch I را فعال نموده اما در غلظت‌های بالاتر مانع فعالیت آن می‌شود (Schallreuter and Elwary 2007). Chavan et al. (2009) نیز نشان دادند که فعالیت gtpch I توسط آب‌اکسیژنه و به روش وابسته به میزان غلظت تنظیم می‌شود. آن‌ها همچنین بیان کردند که فعالیت gtpch I حتی پس از کاهش غلظت آب‌اکسیژنه کاهش نمی‌یابد.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر اولین پژوهش در زمینه بررسی بیان ژن *gtpch* I تحت تنش‌های فلزات سنگین و هورمونی در گیاهان می‌باشد که در گیاه انگور انجام شده‌است. بررسی بیان ژن Vv*gtpch* I تحت تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری، گرما و هورمون‌ها حاکی از کاهش در میزان سطح رونوشت این ژن بود در حالی‌که تحت تیمارهای آب‌اکسیژنه، سولفات مس و فلزات سنگین با افزایش بیان روبرو شد. به نظر می‌رسد که این ژن در اثر تولید گونه‌های اکسیژن فعال با افزایش بیان روبرو شده و احتمالا نقشی را در مسیر اکسیداسیون و احیاء سلولی در گیاهان ایفا می‌کند. با این حال آزمایش‌های بیش‌تری باید در این زمینه انجام شود.

منابع

Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. Biophotonics International 11: 36-42.

Aune D, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Boffetta P, Acosta G, Mendilaharsu M, De Stefani E (2011) Dietary folate intake and the risk of 11 types of cancer: a case–control study in uruguay. Annals of Oncology 22: 444-451.

Baker RH, Buschbaum S, Matthews JB, McKendrick IJ, Schnieder T, Strube C, Nisbet AJ (2011) GTP-cyclohydrolase and development in *Teladorsagia circumcincta* and *Dictyocaulus viviparus* (Nematoda: Strongylida). Experimental Parasitology 128: 309-317.

Basset G, Quinlivan EP, Ravanel S, Rebeille F, Nichols BP, Shinozaki K, Sek M, Adams-Phillips LC, Giovannoni JJ, Gregory JF, Hanson AD (2004) Folate synthesis in plants: the p–aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA–PabB protein that is targeted to plastids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 101: 1496-1501.

Basset G, Quinlivan EP, Ziemak MJ, Diaz De La Garza R, Fischer M, Schiffmann S, Bacher A, Gregory JF, Hanson AD (2002) Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 99: 12489-12494.

Burg AW, Brown GM (1968) The biosynthesis of folic acid VIII. Purification and properties of the enzyme that catalyzes the production of formate from carbon atom 8 of guanosine triphosphate. The Journal of Biological Chemistry 243: 2349-2358.

Changsong Z, Diqiu Y (2010) Analysis of the cold-responsive transcriptome in the mature pollen of *Arabidopsis*. Journal of Plant Biology 53: 400-416.

Chattopadhyay A, Subba P, Pandey A, Bhushan D, Kumar R, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty N (2011) Analysis of the grass pea proteome and identification of stress-responsive proteins upon exposure to high salinity, low temperature, and abscisic acid treatment. Phytochemistry 72: 1293-1307.

Chavan B, Beazley W, Wood JM, Rokos H, Ichinose H, Schallreuter KU (2009) H_2O_2 increases de novo synthesis of (6R)-L-erythro- 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin via GTP cyclohydrolase I and its feedback regulatory protein in vitiligo. Journal of Inherited Metabolic Disease 32: 86–94.

Cossins EA (2000) The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. American Society of Nutrition Journals 78: 691-708.

Heidari Japelaghi R, Haddad R, Garoosi GA (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. Molecular Biotechnology 49: 129-137.

Imbard A, Benoist JF, Blom HJ (2013) Neural tube defects, folic acid and methylation. International Journal of Environmental Research and Public Health, 10: 4352-4389.

Kamal AHM, Kim KH, Shin KH, Choi JS, Baik BK, Tsujimoto H, Heo HY, Park CS, Woo SH (2010) Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. Australian Journal of Crop Science 4: 196-208.

Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT, Renaut J (2011) Plant proteome changes under abiotic stress contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. Journal of Proteomics 74: 1301-1322.

Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signaling: the latest news. Current Opinion in. Plant Biology 7: 323-328.

Kümpornsin K, Kotanan N, Chobson P, Kochakarn T, Jirawatcharadech P, Jaru-ampornpan P, Yuthavong Y, Thanat Chookajorn (2014) Biochemical and functional

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.7.6]

characterization of *Plasmodium falciparum* GTP cyclohydrolase I. malaria journal 13: 150.
Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Kang KY, Bahk JD, Lee IJ, Lee BH (2007) A proteomic approach in analyzing heat responsive proteins in rice leaves. Proteomics 7: 3369–3383.
Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr (2006) Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. The New England Journal of Medicine 354: 1567-1577.
Navarrete O, Van Daele J, Stove C, Lambert W, Van Der Straeten D, Storozhenko S (2012) A folate independent role for cytosolic HPPK/DHPS upon stress in *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 73: 23-33.
Nunes ACS, Kalkmann DC, Aragao FJL (2009) Folate biofortification of lettuce by expression of a codonoptimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. Transgenic Research 18: 661-667.
Pérez-Dueñas B, Ormazábal A, Toma C, Torrico B, Cormand B, Serrano M, Sierra C, Grandis ED, Marfa MP, García-Cazorla A, Campistol J, Pascual JM, Artuch R (2011) Cerebral folate deficiency syndromes in childhood clinical, analytical, and etiologic aspects. Archives Neurology 68: 615-621.
Pruvot G, Massimino J, Peltier G, Rey P (1996) Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum*. Physiologia Plantarum 97: 123-131.
Schallreuter KU, Elwary S (2007) Hydrogen peroxide regulates the cholinergic signal in a concentration dependent manner. Life Sciences 80: 2221-2226.
Storozhenkoa S, Ravanel S, Zhang GF, Rebeille F, Lambert W, Van Der Straeten D (2005) Folate enhancement in staple crops by metabolic engineering. Trends in Food Science and Technology 16: 271-281.
Waller JC, Akhtara TA, Nunezb Gregory JF, McQuinnc RP, Giovannonic JJ, Hansona AD (2010) Developmental and feed forward control of the expression of folate biosynthesis genes in tomato fruit. Molecular Plant 3: 66-77.
Witter K, Werner T, Blusch JH, Schneider EM, Riess O, Ziegler I, Rodi W, Bacher A, Gultich M (1996) Cloning, sequencing and functional studies of the gene encoding human GTP cyclohydrolase I. Gene 179: 285-290.
Zhang J, Jia W, Yang J, Abdelbagi MI (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. Field Crops Research 97: 111-119.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.7.6]