دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد هفدهم، شماره چهارم، ۱۳۸۹
www.gau.ac.ir/journals

برهم‌کنش ترهالوز و اسیدآسکوربیک در رشد گیاهچه‌های *آرابیدوپسیس*

*** محبوبه وحدتی[۱]، مهناز اقدسی[۲] و حمیدرضا صادقی‌پور[۲]**
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه گلستان، [۲]استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان
تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۳

چکیده

ترهالوز یک دی‌ساکارید مهم پیام‌رسان است که در زندگی گیاهان نقش‌های فراوانی دارد. این دی‌ساکارید بر فرآیندهایی مثل رشد گیاه، سهمیه‌بندی[۱] کربن، تخصیص کربن، پاسخ به تنش و فتوسنتز اثر دارد. گیاه جهش یافته آرابیدوپسیس (*tps1*) که فاقد آنزیم ترهالوز فسفات سنتتاز ۱ است دارای مقادیر زیادی اسیدآسکوربیک می‌باشد. افزودن ترهالوز سبب مهار رشد گیاهچه‌های آرابیدوپسیس وحشی شده درحالی‌که افزودن اسیدآسکوربیک به محیط این اثر مهاری ترهالوز را برطرف کرده و در تخصیص کربن آن اثر دارد. بنابراین برهمکنش‌هایی رابطه بین ترهالوز و اسیدآسکوربیک در گیاهان وجود دارد. این پژوهش ماهیت این برهمکنش را از طریق سنجش برخی پارامترهای رشدی و بیوشیمیایی دانه‌رست‌های آرابیدوپسیس که با سوربیتول (۱۰۰ میلی‌مولار) به‌عنوان شاهد، ترهالوز (۱۰۰ میلی‌مولار)، ترهالوز به‌علاوه اسیدآسکوربیک (۰/۱ میلی‌مولار) و اسیدآسکوربیک به تنهایی تیمار شده بودند، بررسی می‌کند. افزودن ترهالوز به محیط کشت گیاه آرابیدوپسیس سبب کاهش رشد ریشه و برگ‌ها و افزایش میزان پراکسید هیدروژن، آنتوسیانین و افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز همراه با کاهش محتوای کلروفیل شد. برگشت این آثار پس از افزودن اسیدآسکوربیک به گیاه حاکی از وجود استرس اکسیداتیو در گیاهان رشد یافته در محیط حاوی

* **مسئول مکاتبه:** mahbube_vahdati@yahoo.com

1- Partitioning

ترهالوز بود. درحالی‌که گیاهان رشد یافته در محیط حاوی سوربیتول (شاهد) در نوک ریشه‌ها نشاسته انباشته کردند، نشاسته در گیاهان رشد یافته در محیط حاوی ترهالوز در برگ‌های لپه‌ای انباشته شد. افزودن اسیدآسکوربیک به‌محیط حاوی ترهالوز دوباره سبب انباشته شدن نشاسته در ریشه‌ها گردید. بنابراین ترهالوز در تعیین قدرت منبع- مخزن متابولیکی موثر باشد. احتمالاً تنش اکسیداتیو ایجاد شده در اثر تیمار با ترهالوز سبب کاهش رشد و تقسیم سلول‌های مریستمی ریشه شده و از این‌رو قدرت ریشه‌ها به‌عنوان یک مخزن متابولیکی مهم گیاه در دریافت قند از لپه‌ها کاهش می‌یابد. در چنین شرایطی قند ناشی از گلوکونئوژنز ذخائر روغنی لپه به‌منظور پرهیز از اثرات اسمزی در لپه‌ها به‌صورت نشاسته انباشته می‌گردد. در مقابل افزودن اسیدآسکوربیک سبب برطرف شدن تنش اکسیداتیو و تقسیم سلول‌های ریشه‌ای شده و از این‌رو قدرت این مخزن متابولیکی در دریافت قند از لپه‌ها می‌یابد. در این تیمار بنابراین انباشتگی ذخایر کربوهیدراتی به‌صورت نشاسته در ریشه مشاهده گردید. برخلاف انتظار گیاهان تیمار شده با ترهالوز بیشترین میزان اسیدآسکوربیک را داشتند که می‌تواند ناشی از محدودیت استفاده از اسیدآسکوربیک برای مقابله با استرس اکسیداتیو باشد.

واژه‌های کلیدی: آرابیدوپسیس تالیانا، اسیدآسکوربیک، ترهالوز، تنش اکسیداتیو، تخصیص کربن

مقدمه

ترهالوز دی‌ساکاریدی است که از دو مولکول گلوکز که با پیوند آلفا ۱ و ۱ به هم متصلند، ساخته شده است. این قند در طیف وسیعی از موجودات زنده اعم از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان وجود دارد و می‌تواند به‌عنوان منبع کربن و انرژی مورد استفاده موجودات زنده قرار گیرد (البین و همکاران، ۲۰۰۳؛ البین، ۱۹۷٤). میزان این قند در موجودات زنده بسیار اندک است و تا مدت‌ها تصور بر آن بود که تنها در گیاه علف خوک وجود داشته و در سایر گیاهان وجود ندارد (مولر و همکاران، ۱۹۹۵). در طی دو دهه اخیر محققان توجه زیادی به مکانیسم عمل قند ترهالوز در گیاهان داشته‌اند. ترهالوز در زندگی گیاهان نقش‌های فراوان مهمی را بازی می‌کند که از آن جمله می‌توان به تأثیر آن بر گلدهی، رشد گیاه، مصرف کربن، مقاومت به تنش و فتوسنتز اشاره کرد (کرو و همکاران، ۱۹۹۲؛ اشلوپمن و همکاران، ۲۰۰۳؛ وان دایکن و همکاران، ۲۰۰٤؛ اشلوپمن و همکاران، ۲۰۰٤؛ پلنی و همکاران، ۲۰۰٤).

متابولیسم ترهالوز احتمالاً نقش مهمی را در فرآیند پیام‌رسانی[1] کربن در گیاهان بازی می‌کند (اشلوپمن و همکاران، ۲۰۰۳). افزودن ترهالوز به محیط کشت گیاه آرابیدوپسیس (غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار) سبب کاهش رشد و عدم ظهور برگ‌های اولیه و نیز تجمع نشاسته در لپه‌های آن می‌شود (وینگلر و همکاران، ۲۰۰۰؛ کولبه و همکاران، ۲۰۰۵؛ اقدسی، ۲۰۰۷). نتایج حاصل از بیان ژن[2] در گیاه آرابیدوپسیس نشان داده است که ترهالوز سبب بیان ژن‌های مرتبط با گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[3] و فعال شدن متابولیسم ثانویه می‌گردد. این نتایج نشان داده است که ترهالوز سبب بیان ژن‌هایی می‌شود که در پاسخ به تنش‌های زیستی دخالت دارند (اقدسی، ۲۰۰۷).

اسیدآسکوربیک یک متابولیت بسیار فراوان در گیاهان بوده و براساس شواهد ژنتیکی و بیوشیمیایی GDP- مانوز[4] و L-گالاکتوز به‌عنوان سوبستراهای کلیدی بیوسنتز آن هستند. مرحله نهایی بیوسنتز اسیدآسکوربیک به‌وسیله آنزیم گالاکتونو ۱و٤ لاکتون دهیدروژناز کاتالیز شده که ماده گالاکتونو ۱و٤ لاکتون را به اسیدآسکوربیک تبدیل می‌کند. محل عمل این آنزیم در غشاء میتوکندری بوده و برای فعالیت به ماده الکترون گیرنده‌ی سیتوکروم C نیازدارد (موتسودا، ۱۹۹۵؛ کواسترگارد و همکاران، ۱۹۹۷؛ ایمایی، ۱۹۹۸). اسیدآسکوربیک در فیزیولوژی تنش گیاهان و همچنین رشد و نمو گیاهان نقش‌های مهمی داشته و در پالایش گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان کلیدی عمل می‌کند (کونکلین، ۲۰۰۱).

نخستین بار اشلوپمن و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که موتانت (*tps1*) از گیاه آرابیدوپسیس که فاقد آنزیم ترهالوز فسفات سنتتاز ۱ (*tps1*) است در مقایسه با نمونه ی وحشی دارای مقادیر زیادی اسیدآسکوربیک (٤۰ برابر بیشتر) می‌باشد، درحالی‌که میزان دهیدرو آسکوربیک اسید در گیاه موتانت *tps1*، ۲۰ برابر کمتر است. اقدسی و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که افزودن اسیدآسکوربیک به محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز منجر به رشد بیشتر گیاهچه‌های آرابیدوپسیس شده و از تجمع نشاسته در لپه‌های آن جلوگیری می‌کند. این نتایج نشان می‌دهند که نوعی رابطه بین ترهالوز و اسیدآسکوربیک در گیاهان وجود داشته ولی ماهیت آن هنوز ناشناخته مانده است. با توجه به آن‌که ترهالوز در چرخه زندگی گیاهان نقش‌های مهمی بازی می‌کند، مطالعه برهم‌کنش ترهالوز و

1- Signaling
2- Gene expression
3- Reactive oxygen species
4- Guanosine di phosphate–Mannose

اسیدآسکوربیک می‌تواند کمک شایانی در شناخت مکانیسم عمل ترهالوز در گیاهان نماید. هدف از این تحقیق بررسی نقش اسیدآسکوربیک در بر طرف کردن اثر بازدارندگی ترهالوز بر رشد و نمو گیاهان است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت: بذور آرابیدوپسیس (کلمبیا- صفر) ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب ژاول ۲۰ درصد قرار گرفتند. بعد از اتمام ضدعفونی، بذرها ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند و در سه تکرار و در ٤ نوع محیط کشت شامل: MS + ۱۰۰ میلی‌مولار سوربیتول، MS + ۱۰۰میلی‌مولار ترهالوز، MS + ۰/۱ میلی‌مولار اسیدآسکوربیک و MS + ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز + ۰/۱ میلی‌مولار اسیدآسکوربیک کشت شدند. تعداد بذر کشت شده بازاء هر تکرار ۵۰ عدد بود. مراحل ذکر شده تحت شرایط استریل و زیر هود انجام شد. پس از ۱۵ روز پارامترهای رشد گیاهچه‌ها شامل رشد طولی ریشه، خروج برگ‌های اولیه و وزن‌تر و خشک مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. همچنین از گیاهچه‌های ۱۵ روزه که تیمارهای متفاوتی را دریافت کرده بودند برای سنجش پارامترهای بیوشیمیایی در ۳ تکرار به شرح زیر استفاده شد.

اندازه‌گیری وزن‌تر و خشک: تعداد ۵۰ عدد از گیاهچه‌های ۱۵ روزه آرابیدوپسیس پس از برداشت توزین شده و سپس میانگین وزن‌تر آنها محاسبه شد. این نمونه‌ها برای مدت ۷۲ ساعت در درجه حرارت ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفته و پس از توزین میانگین وزن خشک نیز محاسبه گردید.

اندازه‌گیری طول ریشه: گیاهچه‌های ۱۵ روزه آرابیدوپسیس عکس‌برداری گردید و سپس با استفاده از نرم‌افزار ImageJ طول ریشه ۵۰ عدد از گیاهچه‌های هر تیمار اندازه‌گیری شد و میانگین هر تیمار محاسبه گردید.

تهیه عصاره برای اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: عمل استخراج بر طبق روش ژانا و چادهوری (۱۹۸۱) در هاون چینی سرد به‌طور خلاصه، مقدار ۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی تازه پودر شده در ازت مایع در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ٦/۵ حاوی هیدروکسیل آمین ۱ میلی‌مولار هموژن گردید و بعد از آن در سرعت ٦۰۰۰ گرم به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

سانتریفیوژ شد. فاز بالایی عصاره سانتریفیوژ شده برای اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن استفاده شد.

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: مقدار ۹۰۰ میکرولیتر از عصاره را با ۳۰۰ میکرولیتر معرف (کلرید تیتانیوم ۱ درصد در اسیدسولفوریک ۲۰ درصد) ترکیب و در ٦۰۰۰ گرم به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. از روی جذب نور در طول‌موج ٤۱۰ نانومتر براساس ضریب خاموشی (ε) معادل $0/28\ \mu\ mol^{-1}cm^{-1}$ برای کمپلکس تیتانیوم- پراکسید هیدروژن، مقدار پراکسید هیدروژن محاسبه گردید.

تهیه عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیدازو پروتئین‌های محلول: عصاره‌گیری به‌روش کار و میشرا (۱۹۷٦) صورت گرفت. مقدار ۵۰ میلی‌گرم بافت تازه گیاهی در هاون چینی سرد با ۲ میلیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ٦/۸ هموژن شد. پس از سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ گرم در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد از فاز بالایی عصاره برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و مقدار پروتئین‌های محلول استفاده شد.

تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش چنس و مهلی (۱۹۵۵) همراه با تغییراتی انجام شد. به ۲/۸ میلیتر بافر فسفات منوسدیک (۵۰ میلی‌مولار) با pH برابر ٦/۸، عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر) و آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار (۱۰۰ میکرولیتر) اضافه شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. محلول بلانک حاوی ۲/۹ میلی‌لیتر بافر فسفات منو سدیک (۵۰ میلی‌مولار) با pH برابر با ٦/۸ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. میزان کاهش جذب نور در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر مابین زمان‌های ۱۵ و ۷۵ ثانیه بعد از اضافه کردن آب اکسیژنه اندازه‌گیری شد و برای محاسبه فعالیت آنزیم به کار رفت.

تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز براساس روش چنس و مهلی (۱۹۵۵) انجام شد. به ۲/۷ میلیتر بافر فسفات منوسدیک (۲۵ میلی‌مولار) با pH برابر ٦/۸، گایاکول[1] ۲۰ میلی‌مولار (۱۰۰ میکرولیتر)، عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر) و آب اکسیژنه ٤۰ میلی‌مولار (۱۰۰ میکرولیتر) اضافه شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. محلول بلانک حاوی ۲/۸ میلیتر بافر فسفات منوسدیک ۲۵ میلی‌مولار با pH برابر ٦/۸،

1- Guaiacol

گایاکول ۲۰ میلی‌مولار (۱۰۰ میکرولیتر) و عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر) است. افزایش جذب نور در طول‌موج ٤۷۰ نانومترمابین زمان‌های ۱۵ و ۷۵ ثانیه بعد از اضافه کردن آب اکسیژنه اندازه‌گیری شد و برای محاسبه فعالیت آنزیم به‌کار رفت.

تعیین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز براساس روش کار و میشرا (۱۹۷٦) همراه با تغییراتی انجام شد. به ۲/۸ میلیتر بافر فسفات منوسدیک ۲۵ میلی‌مولار با pH برابر ٦/۸، پیرو گالول[1] ۱۰ میلی‌مولار (۱۰۰میکرولیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن پیرو گالول به مخلوط واکنش شروع شد. محلول بلانک حاوی ۲/۹ میلی‌لیتر بافر فسفات منوسدیک ۲۵ میلی‌مولار با pH برابر ٦/۸ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. فعالیت آنزیم در طول‌موج ٤۲۰ نانومتر بر اساس شدت رنگ نارنجی پورپوروگالین[2] تولید شده در زمان‌های ٤۰ و ۱۰۰ ثانیه پس از افزودن پیرو گالول اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان اسیدآسکوربیک: عمل استخراج با استفاده از روش فویر و همکاران (۱۹۸۳) در هاون چینی سرد انجام شد. ۰/۱۵ گرم از بافت تازه گیاهی در متافسفریک اسید ۵ درصد سرد هموژن گردید و بعد در سرعت ۱۰۰۰۰ گرم به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. فاز رویی عصاره برای اندازه‌گیری مقدار اسیدآسکوربیک استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی را با ۲/۸۹ میلی‌لیتر بافر فسفات منوسدیک (۰/۲ مولار) با pH برابر ٦/۲ در لوله آزمایش مخلوط شد، سپس ۰/۵ یونیت آنزیم آسکوربات اکسیداز (۱۰ میکرولیتر) به سرعت افزوده شده و بلافاصله تغییرات جذب نور در طول‌موج ۲٦۵ نانومتر به‌مدت ۱ دقیقه انجام شد. سپس تغییرات جذب در منحنی استانداردی که به این منظور با استفاده از اسیدآسکوربیک حل شده در متافسفریک اسید و آنزیم آسکوربات اکسیداز تهیه شده قرار داده شد و میزان اسیدآسکوربیک در هر نمونه محاسبه شد.

بررسی حضور نشاسته: پس از بی‌رنگ کردن گیاهچه‌های ١٤ روزه آرابیدوپسیس با الکل ۷۰ و ۹۰ درصد، لوگل (محلول یدیدوره) به آنها اضافه و سپس حضور نشاسته در نوک ریشه و لپه‌ها بررسی شد.

سنجش آنتوسیانین: اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین با استفاده از روش میتا و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد. مقدار ۰/۰۲ گرم بافت تازه‌ی گیاهی در ازت مایع هموژن شده و سپس مقدار ٤ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد اسیدکلریدریک در متانول به آن اضافه کرده و به‌مدت ٢٤ ساعت در یخچال قرار داده شد.

1- Pyrogallol
2- Purpurogalin

مخلوط حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ گرم سانتریفیوژ گردید. جذب نوردر فاز رویی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول‌موج‌های ٦٥٧ و ٥٣٠ نانومترخوانده شد و با استفاده از فرمول زیر میزان نسبی آنتوسیانین تعیین شد (میتا و همکاران، ۱۹۹۷).

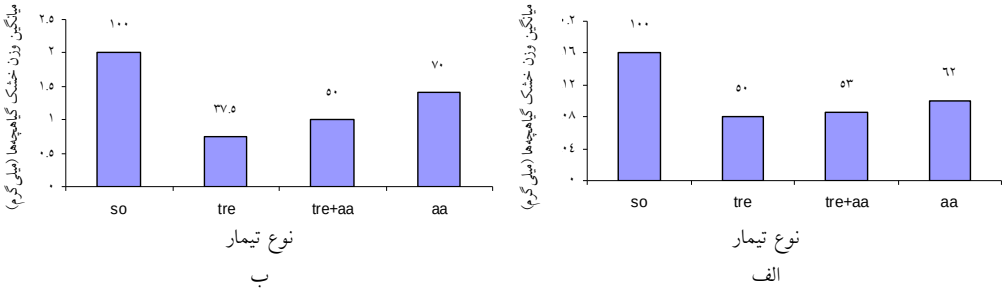
$$A=A_{٥٣٠}-(٠/٢٥\ A_{٦٥٧}) \qquad (۱)$$

اندازه‌گیری سایر پارامترهای بیوشیمیایی: اندازه‌گیری کلروفیل به روش آرنون (۱۹٤۹) انجام شد. قندهای محلول و نامحلول با روش فنل سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد (کوچرت، ۱۹۷۸). اندازه‌گیری پروتئین محلول براساس روش برادفورد (۱۹۷٦) انجام شد. اندازه‌گیری پروتئین کل به‌روش مارک ول و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد.

با استفاده از نرم‌افزار SAS، آزمون توکی معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف بین میانگین‌ها مشخص شد.

نتایج

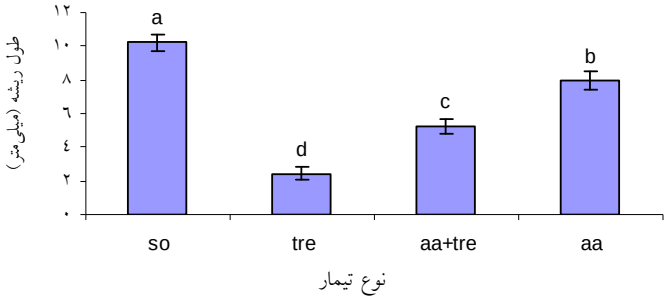
ارزیابی وزن‌تر و خشک: تیمار ترهالوز سبب کاهش میانگین وزن‌تر و خشک گیاه در مقایسه با تیمار سوربیتول و اسیدآسکوربیک شد. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز سبب افزایش وزن‌تر و خشک گیاهچه‌ها شد (شکل ۱- الف وب). میانگین‌ها برحسب درصد بیان شد.



شکل ۱- میانگین وزن خشک (الف) و تر (ب) در گیاهچه های آرابیدوپسیس پس از ۱۵ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (so)، ترهالوز (tre)، ترهالوز و اسیدآسکوربیک (tre+aa) و اسیدآسکوربیک (aa).

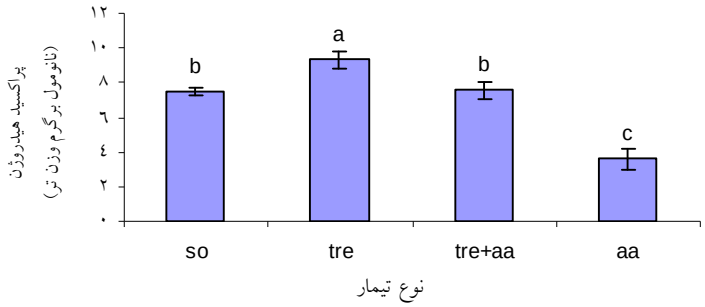
بررسی رشد طولی ریشه: در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس ۱۵ روزه رشد کرده در محیط کشت پایه حاوی سوربیتول طول ریشه‌ها حدود ۱۰ میلی‌متر بوده در حالی که با افزودن ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز

به محیط کشت رشد ریشه‌ها تا حدود ۳ برابر کاهش یافت (شکل ۲). افزودن مقدار ۰/۱ میلی‌مولار اسیدآسکوربیک به محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز سبب مهار اثر بازدارندگی ترهالوز بر رشد ریشه گردید.



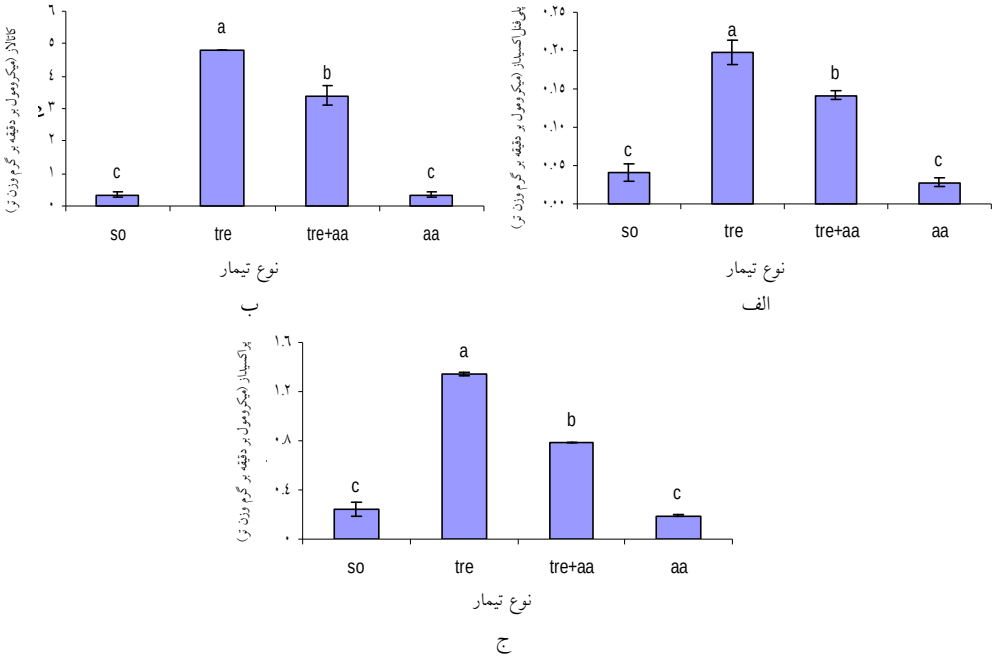
شکل ۲- طول ریشه گیاهچه‌های آرابیدوپسیس پس از ۱۵ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (so)، ترهالوز (tre)، ترهالوز و اسیدآسکوربیک (tre+aa) و اسیدآسکوربیک (aa).

سنجش محتوای پراکسید هیدروژن: تیمار ترهالوز منجر به افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن در مقایسه با تیمار سوربیتول شد. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز منجر به کاهش معنی‌دار پراکسیدهیدروژن شد. در محیط حاوی اسید آسکوربیک مقدار پراکسید هیدروژن در مقایسه با تیمار سوربیتول کاهش معنی‌داری یافت (شکل ۳).



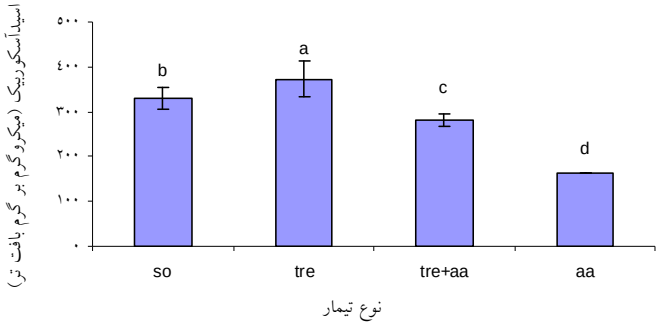
شکل ۳- میزان پراکسید هیدروژن در گیاهچه های آرابیدوپسیس پس از ۱۵ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (so)، ترهالوز (tre)، ترهالوز و اسیدآسکوربیک (tre+aa) و اسیدآسکوربیک (aa).

بررسی فعالیت سه آنزیم کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز: گیاهچه‌های آرابیدوپسیس در محیط حاوی سوربیتول و اسیدآسکوربیک میزان اندکی از فعالیت هر سه آنزیم را نشان دادند. در محیط کشت حاوی ترهالوز میزان فعالیت هر سه آنزیم به‌شدت افزایش یافت. با افزودن اسیدآسکوربیک به محیط کشت حاوی ترهالوز میزان فعالیت هر سه آنزیم کاهش معنی‌داری یافت (شکل٤ –الف، ب و ج).



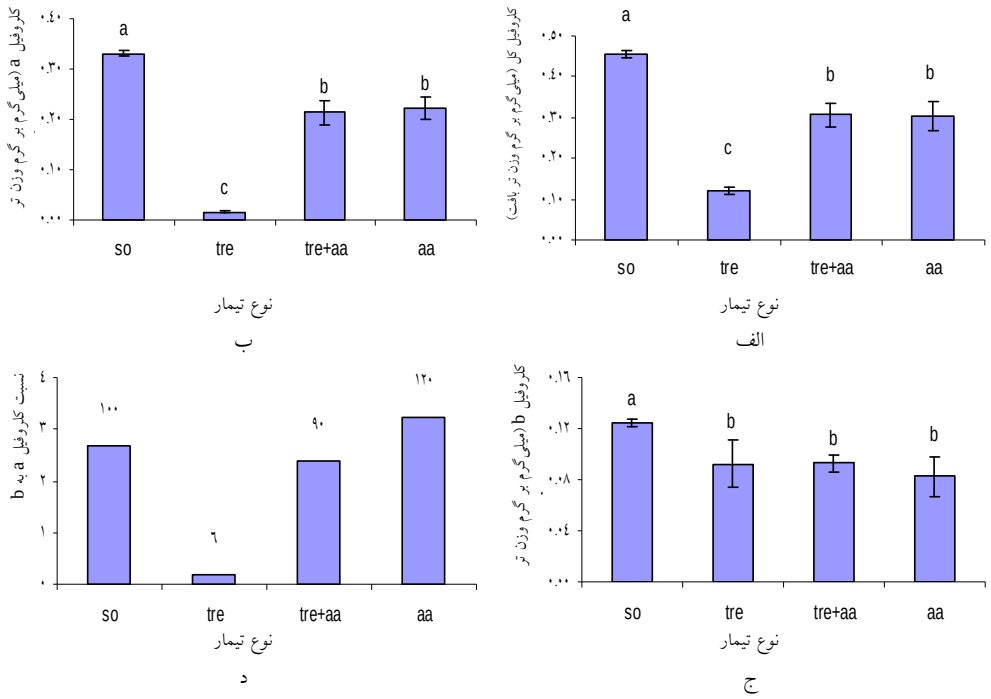
شکل ٤- فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز (الف)، کاتالاز (ب) و پراکسیداز (ج) در گیاهچه آرابیدوپسیس پس از ۱۵ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (so)، ترهالوز (tre)، ترهالوز و اسیدآسکوربیک (tre+aa) و اسیدآسکوربیک (aa).

سنجش محتوای اسیدآسکوربیک: میزان اسیدآسکوربیک در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط حاوی ترهالوز بیشترین مقدار را نشان داد. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز سبب کاهش در میزان اسیدآسکوربیک گیاهچه‌ها گردید. تیمار اسیدآسکوربیک به تنهایی کمترین میزان اسیدآسکوربیک در گیاهچه‌ها را نشان داد (شکل ۵).



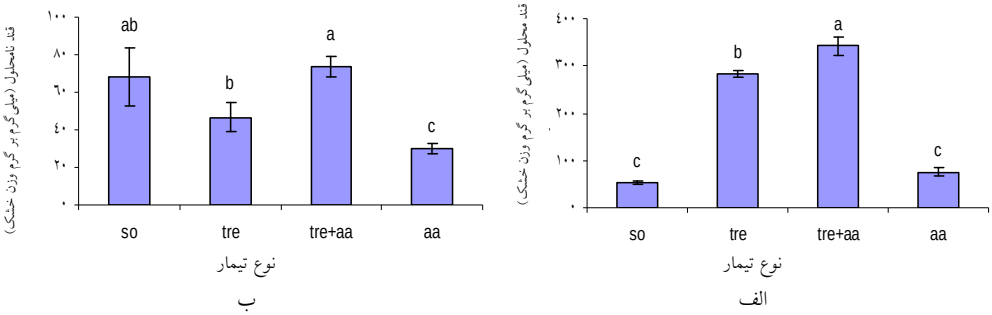
شکل ۵- میزان اسیدآسکوربیک در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس پس از ۱۵ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (so)، ترهالوز (tre)، ترهالوز و اسید آسکوربیک (tre+aa) و اسیدآسکوربیک (aa).

بررسی میزان کلروفیل: گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی سوربیتول بالاترین میزان کلروفیل کل را نشان دادند (شکل ٦-الف). افزودن ترهالوز به محیط کشت منجر به کاهش حدود ٧٤ درصد در میزان کلروفیل کل گردید. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط کشت حاوی ترهالوز سبب افزایش میزان کلروفیل شد (شکل ٦-الف). بیشترین مقدار کلروفیل a در گیاهان رشد یافته روی محیط حاوی سوربیتول مشاهده گردید (شکل ٦-ب). با افزودن ترهالوز به محیط کشت در مقایسه با محیط حاوی سوربیتول کاهش معنی‌داری در میزان کلروفیل a گیاهچه‌ها مشاهده گردید. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط کشت حاوی ترهالوز سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان کلروفیل a شد (شکل ٦-ب). میزان کلروفیل b گیاهچه رشد یافته در محیط حاوی سوربیتول نیز بیشترین مقدار بود. در حضور ترهالوز میزان کلروفیل b به‌طور معنی‌داری کم شد و در محیط حاوی اسیدآسکوربیک این میزان کاهش یافت (شکل ٦-ج). بالاترین نسبت کلروفیل a/b در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط حاوی اسیدآسکوربیک مشاهده شد و در محیط حاوی ترهالوز این نسبت کاهش قابل توجهی یافت. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط کشت حاوی ترهالوز سبب افزایش نسبت کلروفیل a/b گردید (شکل ٦-د).



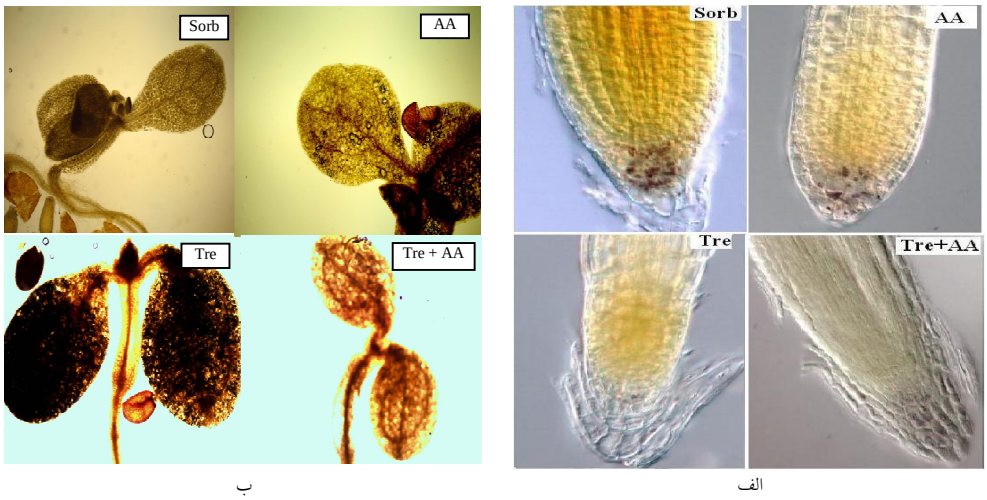
شکل ٦- میزان کلروفیل کل (الف)، کلروفیل a (ب)، کلروفیل b (ج) و نسبت کلروفیل a/b (د) در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس پس از ۱۵ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (so)، ترهالوز (tre)، ترهالوز و اسیدآسکوربیک (tre+aa) و اسیدآسکوربیک (aa).

سنجش میزان قندهای محلول و نامحلول: تیمار ترهالوز منجر به افزایش معنی‌دار قندهای محلول در مقایسه با تیمار سوربیتول و اسیدآسکوربیک شد. با افزودن اسیدآسکوربیک به محیط کشت حاوی ترهالوز به‌طور معنی‌داری میزان قندهای محلول از آن هم فراتر رفته و افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۷-الف). در تیمار با ترهالوز میزان قندهای نامحلول در مقایسه با تیمار سوربیتول و اسیدآسکوربیک تغییر نیافت. در محیط حاوی ترهالوز به‌علاوه اسیدآسکوربیک میزان قندهای نامحلول در مقایسه با تیمار اسیدآسکوربیک به تنهایی افزایش نشان داد (شکل ۷-ب).



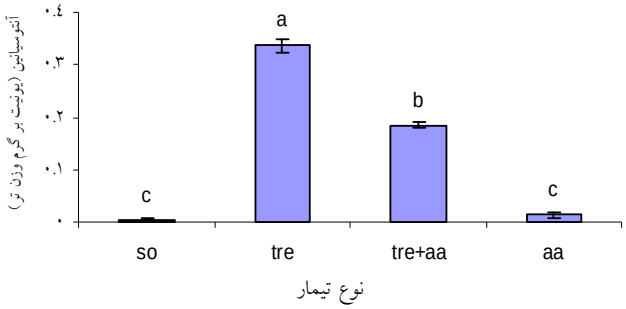
شکل ۷- میزان قندهای محلول (الف) و قندهای نامحلول (ب) در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس پس از ۱۵ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (so)، ترهالوز (tre)، ترهالوز و اسیدآسکوربیک (tre+aa) و اسیدآسکوربیک (aa).

بررسی حضور نشاسته: در محیط حاوی سوربیتول نشاسته در نوک ریشه انباشته شده و اثری از نشاسته در برگ‌های لپه‌ای دیده نشد. تیمار ترهالوز سبب انباشته شدن نشاسته در برگ‌های لپه‌ای شد و هیچ نشاسته‌ای در نوک ریشه مشاهده نگردید. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز سبب تجمع نشاسته در نوک ریشه شد و نشاسته کمتری نیز در برگ‌های لپه‌ای انباشته شد یا در بعضی لپه‌ها هیچ نشاسته‌ای دیده نشد. در محیط حاوی اسیدآسکوربیک در برگ‌های لپه‌ای و نوک ریشه هیچ نشاسته‌ای یافت نشد (شکل ۸- الف و ب).



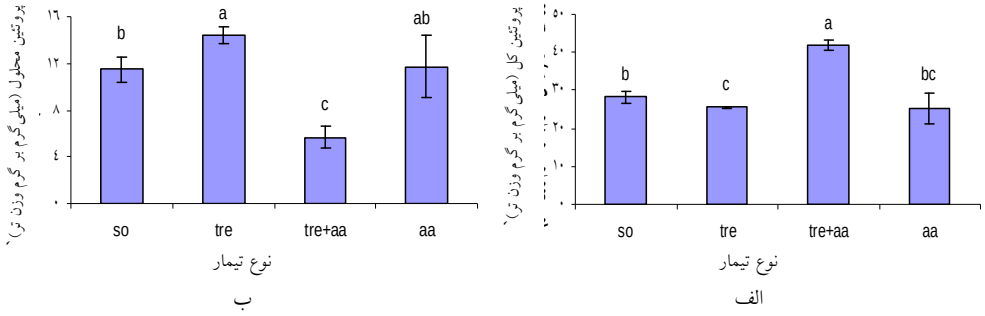
شکل ۸- حضور و عدم‌حضور نشاسته در نوک ریشه (الف) و برگ‌های لپه‌ای (ب) گیاهچه‌های آرابیدوپسیس پس از ۱۵ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (sorb)، ترهالوز (Tre)، ترهالوز و اسیدآسکوربیک (Tre+AA) و اسیدآسکوربیک (AA).

سنجش میزان آنتوسیانین: در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی سوربیتول میزان آنتوسیانین بسیار اندک بود. گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی ترهالوز دارای برگ‌های لپه‌ای با حاشیه قرمز رنگ بودند و بیشترین مقدار آنتوسیانین را در مقایسه با سایر تیمارها نشان دادند. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط کشت حاوی ترهالوز سبب کاهش معنی‌داری در میزان آنتوسیانین گیاهچه‌ها گردید. وجود اسیدآسکوربیک به تنهایی در محیط کشت در مقایسه با محیط حاوی سوربیتول تغییر محسوسی در میزان آنتوسیانین گیاهچه‌ها ایجاد نکرد (شکل ۹).



شکل ۹- میزان آنتوسیانین در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس پس از ۱۴ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (so)، ترهالوز (tre)، ترهالوز و اسیدآسکوربیک (tre+aa) و اسیدآسکوربیک (aa).

ارزیابی میزان پروتئین‌های محلول و پروتئین کل: میزان پروتئین کل در محیط کشت حاوی ترهالوز کاهش معنی‌داری نسبت به محیط حاوی سوربیتول و اسیدآسکوربیک نشان داد. با افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز افزایش معنی‌داری در میزان پروتئین کل مشاهده شد (شکل ۱۰-الف). تیمار ترهالوز منجر به افزایش معنی‌دار پروتئین محلول در گیاهچه آرابیدوپسیس در مقایسه با تیمار سوربیتول شد. با افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز میزان پروتئین محلول به‌شدت کاهش پیدا کرده و از میزان طبیعی خود که در تیمارهای سوربیتول و اسیدآسکوربیک دیده می‌شود کمتر گردید (شکل ۱۰-ب).



شکل ۱۰- میزان پروتئین کل (الف) و پروتئین محلول (ب) در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس پس از ۱۵ روز کشت روی محیط کشت حاوی سوربیتول (so)، ترهالوز (tre)، ترهالوز و اسیدآسکوربیک (tre+aa) و اسیدآسکوربیک (aa).

بحث

افزودن ترهالوز به محیط کشت سبب کاهش رشد گیاه آرابیدوپسیس گردید، این امر پیش از این توسط سایر محققان گزارش شده بود (وینگلر و همکاران، ۲۰۰۰؛ کولبه و همکاران، ۲۰۰۵؛ اقدسی، ۲۰۰۷). پس از ۱۵ روز گیاهچه‌های رشد یافته در محیط حاوی ترهالوز ارغوانی شده و در مقایسه با همان گیاهچه‌ها در محیط حاوی سوربیتول اندازه کوچکتری داشتند. طول ریشه‌ها نیز در مقایسه با تیمار سوربیتول بسیار کوتاهتر بود و رشد گیاه فقط تا باز شدن برگ‌های لپه‌ای اولیه ادامه یافت. ترهالوز سبب کاهش وزن‌تر و خشک گیاهچه‌ها در مقایسه با تیمار سوربیتول گردید که این کاهش با افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز تا حدودی جبران گردید (شکل ۲). در گیاهان رشد یافته در محیط حاوی ترهالوز در مقایسه با شاهد (محیط حاوی سوربیتول) میزان پراکسید هیدروژن افزایش یافت (شکل ۳)، که می‌تواند نشان‌دهنده تنش اکسیداتیو در گیاه باشد. کاتالاز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیدازها بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاهان هستند که در پاسخ به شرایط تنش میزان بیان ژن این آنزیم‌ها و در نتیجه فعالیت آنها افزایش پیدا می‌کند (بلوخینا و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری میزان فعالیت هر سه آنزیم نشان داد که در محیط حاوی ترهالوز فعالیت هر سه آنزیم به‌طور چشم‌گیری در مقایسه با نمونه‌های شاهد (محیط حاوی سوربیتول) افزایش یافته است (شکل‌های ٤-الف، ب و ج). افزایش پراکسید هیدروژن در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط حاوی ترهالوز احتمالاً سبب افزایش فعالیت این سه آنزیم گردیده است. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز سبب کاهش در میزان پراکسید هیدروژن و همچنین کاهش میزان فعالیت هر سه آنزیم

(شکل ۳-۳) در گیاهچه‌ها گردید. اسیدآسکوربیک (ویتامین C) یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها است (نوکتور و فویر، ۱۹۹۸؛ اسمیرنف، ۱۹۹٦) که در طیف وسیعی از واکنش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی به‌عنوان پالاینده اصلی گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده عمل می‌کند. اسیدآسکوربیک به‌طور مستقیم به سوپر اکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و اکسیژن منفرد متصل و آن‌ها را پالایش می‌کند و پراکسید هیدروژن را از طریق آنزیم آسکوربات پراکسیداز به آب احیاء می‌کند (نوکتور و فویر، ۱۹۹۸). تیمار گیاهچه‌ها با اسیدآسکوربیک سبب کاهش میزان اسیدآسکوربیک در گیاهچه‌ها شد (شکل ۵). این احتمال وجود دارد که تیمار با اسیدآسکوربیک خارجی سبب افزایش راه‌های مصرف [1] اسیدآسکوربیک درون زاد شود. در تیمار با ترهالوز بیشترین میزان اسیدآسکوربیک در گیاهچه‌ها مشاهده گردید. توجیه این امر مطالعات بیشتری را می‌طلبد زیرا در این تیمار گیاهچه‌ها کمترین رشد را داشته و به‌علاوه در شرایط تنش اکسیداتیو بودند. اگر ترهالوز سبب افزایش اسیدآسکوربیک درونزاد شده باشد، شاید بتوان آن را با مطالعات در شیشه [2] اخیر مرتبط دانست که پایداری اسیدآسکوربیک در حضور ترهالوز به‌میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد (بلوکو و همکاران، ۲۰۰۷). در این صورت شاید بتوان ادعا کرد که وجود ترهالوز یا متابولیت‌های مشتق از آن مثل ترهالوز ٦- فسفات [3] به‌نحوی مانع از مصرف اسیدآسکوربیک درونزاد در واکنش‌های آنتی‌اکسیدانتی شده و از این‌رو این گیاهچه‌ها علی‌رغم افزایش اسیدآسکوربیک درونزاد قابلیت استفاده از آن برای پالایش گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده را ندارند. در تیمار همزمان ترهالوز و اسیدآسکوربیک، میزان اسیدآسکوربیک گیاهچه‌ها نیز در مقایسه با تیمار اسیدآسکوربیک به تنهایی افزایش یافت که نشان‌دهنده اثر ترهالوز روی پایداری اسیدآسکوربیک درونزاد است.

از پیامدهای دیگر تنش اکسیداتیو ایجاد شده در اثر افزودن ترهالوز به محیط کشت، کاهش کلروفیل گیاهچه‌ها بود (شکل ۳-٦، الف)، زیرا با افزودن آنتی‌اکسیدانت اسیدآسکوربیک به محیط‌کشت این اثر تا حدی جبران گردید. کاهش شدیدتر میزان کلروفیل a نسبت به کلروفیل b در محیط حاوی ترهالوز بیانگر صدمه بیشتر کلروفیل a تحت شرایط تنش ایجاد شده توسط ترهالوز می‌باشد. با تعدیل شرایط تنش توسط اسیدآسکوربیک میزان کلروفیل و از جمله کلروفیل a افزایش

1- Turn Over
2- In Vitro
3- Trehalose 6-phosphate

یافت. اختلال در محتوای کلروفیلی گیاهچه‌ها در اثر تیمار با ترهالوز می‌تواند نشان از صدمه به‌دستگاه فتوسنتزی گیاه باشد. در سیانوباکترها اکسیژن منفرد باعث صدمه نوری مستقیم به فتوسیستم II[1] و پروتئین D1 شده (نوگشی، ۲۰۰۲) و از ترمیم فتوسیستم II جلوگیری می‌کند (نی‌شی یاما و همکاران، ۲۰۰٤).

به‌نظر می‌رسد که قندهای محلول نقش دوگانه‌ای در ارتباط با گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده داشته باشند. از یک سو قندهای محلول سبب تشدید فرآیندهای متابولیکی همچون تنفس میتوکندریایی شده که این امر به نوبه خود ایجادکننده گونه‌های فعال اکسیژن است و از سوی دیگر وجود قندها برای انجام فرآیندهای آنتی‌اکسیداتیو مثل مسیر پنتوز فسفات (سالومینی و همکاران، ۱۹۹۹؛ بوادا و همکاران، ۲۰۰۰؛ دبنام و همکاران، ۲۰۰٤؛ می و همکاران، ۱۹۹۸؛ بارا و همکاران، ۲۰۰۳) و بیوسنتز کاروتنوئیدها لازم است. این ارتباط‌های متضاد بین قندهای محلول، تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده و فرآیندهای آنتی‌اکسیدانتی به وسیله آنالیزهای رونویسی ژن تأیید شده است و حاکی از این است که پیام‌رسانی قند با کنترل تنش اکسیداتیو مرتبط است (کویی و همکاران، ۲۰۰۵). تنش‌های متفاوت که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم باعث تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده می‌شوند مثل شوری، خشکی، تیمار با آبسیزیک اسید و حرارت پایین باعث انباشتگی قندهای محلول شده که به‌عنوان مکانیسم سازشی پاسخ به شرایط تنش می‌باشد (رویتچ، ۱۹۹۹). از آن‌جا که ترهالوز سبب افزایش پراکسید هیدروژن (شکل ۳-۳)، و تنش اکسیداتیو می‌گردد، افزایش قندهای محلول (شکل ۷-الف) تحت تیمار با ترهالوز منطقی به‌نظر می‌رسد. این انباشتگی می‌تواند ناشی از شروع فرآیندهای مرتبط با پیری در گیاه باشد. افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز اثر تشدیدکننده بر میزان قندهای محلول داشت. با توجه به این‌که پیش ماده اولیه بیوسنتز اسیدآسکوربیک، D- گلوکز است می‌توان گفت که گیاه در شرایط تنش (محیط حاوی ترهالوز) مقداری از قندهای تولید شده را صرف سنتز اسیدآسکوربیک برای پاسخ به شرایط تنش می‌کند و با افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز این نیاز مرتفع می‌شود، و از این‌رو میزان قندهای محلول افزایش بیشتری می‌یابد. با توجه به این‌که میزان فعالیت نسبی آنزیم ترهالاز[2] در گیاه آرابیدوپسیس در حضور ترهالوز خارجی افزایش

1- Photosystem II
2- Trehalase

چشم‌گیری می‌یابد (اقدسی، ۲۰۰۷) احتمال افزایش قندهای محلول درونزاد در گیاهچه‌های تیمار شده با ترهالوز نیز وجود دارد.

با تغذیه ترهالوز نشاسته در برگ‌های لپه‌ای آرابیدوپسیس انباشته شده و هیچ نشاسته‌ای در سلول‌های نوک ریشه‌ها مشاهده نشد (شکل‌های ۸- الف و ب). تغذیه آرابیدوپسیس با ترهالوز بیان ژن آنزیم ADP گلوکز پیروفسفریلاز[1] (AGPase) و سنتز نشاسته را القا می‌کند (وینگلر و همکاران، ۲۰۰۰). افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز سبب شد اکثریت برگ‌های لپه‌ای (حدود ۷۰ درصد) نشاسته خود را از دست داده و به حالت طبیعی باز گردند، و دوباره تجمع نشاسته در ریشه‌ها مشاهده گردید. بر طبق این نتایج اسیدآسکوربیک مانع تجمع نشاسته در برگ‌های لپه‌ای گیاهچه‌هایی گردید که با ترهالوز تیمار شده بودند (شکل ۸-الف) ترهالوز ممکن است در انتقال یا بارگیری کربن از طریق تاثیر بر قدرت منبع- مخزن متابولیکی موثر باشد. احتمالاً تنش اکسیداتیو ایجاد شده در اثر تیمار با ترهالوز سبب کاهش رشد و تقسیم سلول‌های مریستمی ریشه شده و از این‌رو قدرت ریشه‌ها به‌عنوان یک مخزن متابولیکی مهم گیاه در دریافت قند از لپه‌ها کاهش یافته و از این‌رو قند ناشی از گلوکونئوژنز[2] ذخائر روغنی لپه به‌منظور پرهیز از اثرات اسمزی در لپه‌ها به‌صورت نشاسته انباشته می‌گردد. افزودن اسیدآسکوربیک سبب برطرف شدن تنش اکسیداتیو و تقسیم سلول‌های ریشه‌ای شده و از این‌رو قدرت این مخزن متابولیکی در دریافت قند از لپه‌ها را افزایش داده و از این‌رو در این تیمار انباشتگی ذخایر کربوهیدراتی بصورت نشاسته در ریشه مشاهده می‌گردد. لازم به یادآوری است که تیمار با اسیدآسکوربیک یا پیش‌ساز آن L-گالاکتونو ۱و٤ - لاکتون باعث افزایش طول ریشه گیاه پیاز[3] شد، می‌توان گفت که آسکوربات به واسطه مهار سفت شدن دیواره سلولی در رشد ریشه و افزایش متابولیسم در این اندام لازم است (دل‌کارمن و همکاران، ۲۰۰۵).

در بسیاری از گونه‌های گیاهی تجمع آنتوسیانین به‌وسیله قندها القاء می‌شود (لاروند و همکاران، ۱۹۹۸). نتایج بیانگر این است که ترهالوز نیز همانند ساکارز منجر به بیان ژن تولیدکننده پیگمان آنتوسیانین[4] می‌شود. این امکان نیز وجود دارد که ترهالوز از طریق افزایش قندهای محلول به‌طور غیرمستقیم در بیان این ژن و تولید آنتوسیانین دخالت کند. گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده همچنین

1- Adenosine di phosphate- glucose pyrophosphorylase
2- Gluconeogenesis
3- *Allium cepa* L.
4- MYB/PAP1

سبب القاء پیری می‌شوند. پیری برگ همراه با افزایش سطوح قند می‌باشد (وینگلر و همکاران، ۲۰۰٦). فرآیند پیری شامل تجزیه غشاهای داخلی، بخش اصلی پروتئین‌های کلروپلاستی و کلروفیل می‌شود (هورتستینر، ۲۰۰٦). فرآیند پیری باعث بیان یک سری از پروتئازها می‌شود و این آنزیم‌ها سبب تبدیل پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچکتر شده و همان‌طور که در نتایج مشاهده می‌شود پروتئین‌های فاز محلول افزایش یافته و از میزان پروتئین کل کاسته شد (شکل ۱۰- الف و ب). این نتایج نشان می‌دهد پروتئین کل گیاهان رشد یافته در محیط حاوی ترهالوز در مقایسه با نمونه‌های شاهد (محیط حاوی سوربیتول) کاهش معنی‌داری یافته، که با شرایطی که ترهالوز برای گیاه ایجاد کرده هم‌خوانی دارد. اسیدآسکوربیک باعث پالایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (نوکتور و فویر، ۱۹۹۸) و در نتیجه میزان و اثرات تنش را کاهش می‌دهد. از این‌رو افزودن اسیدآسکوربیک به محیط حاوی ترهالوز سبب کم کردن گونه‌های فعال اکسیژن و تنش و در نتیجه کاهش سرعت پیری و اثرات آن می‌شود و باعث می‌شود میزان پروتئین کل گیاه به‌طور قابل توجهی افزایش یابد.

جمع‌بندی نهایی و پیشنهادات: استدلال اصلی که ترهالوز ٦- فسفات را به‌عنوان ملکول پیام‌رسانی معرفی می‌کند این است که تغییرات اندک در میزان آن در گیاه منجر به بروز تغییرات بزرگ مورفولوژیک می‌گردد که نشان‌دهنده اهمیت این قند در گیاهان است. نتایج این مطالعه و مطالعات پیشین به‌طور احتمال می‌تواند نشان‌دهنده این امر باشد که ترهالوز افزوده شده به محیط، به‌طریقی به‌عنوان مثال از طریق حد واسط ترهالوز ٦- فسفات در تعیین روابط منبع- مخزن در گیاه و سهمیه‌بندی کربن در گیاه مؤثر بوده و به‌علاوه بر متابولیسم آسکوربات درونزاد در گیاه نیز اثر می‌گذارد. بنابراین مطالعات آتی می‌توانند به بررسی پارامترهای مرتبط با قدرت منبع- مخزن در گیاهان آرابیدوپسیس و متابولیسم آسکوربات تحت تیمار ترهالوز معطوف شده تا از این طریق به نحوه عملکرد بیشتر این قند پیام‌دهنده در گیاه پی برد.

سپاسگزاری

از همسرم، فرزندم و خانواده عزیزم که با فداکاری‌های خود راه را برای انجام این پژوهش هموار نمودند، صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی می‌نمایم. از اساتید گرانقدر دکتر اقدسی و دکتر صادقی‌پور به‌خاطر حمایت‌های تکنیکی و علمی بی‌دریغشان کمال تشکر را دارم.

منابع

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

2.Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24; 1–10.

3.Barra, L., Pica, N., Gouffi, K., Walker, G.C., Blanco, C. and Trautwetter, A. 2003. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is required for sucrose and trehalose to be efficient osmoprotectants in *Sinorhizobium meliloti*. FEMS Microbiology Letters, 229: 183–188.

4.Bellocco, E.A, Barreca, D., Lagana`, G.A., Leuzzi, U.A., Migliardo, F.B., La Torre, R.B., Galli, G.B., Galtieri, A., Minutoli, L.C., and Squadrito, F.C. 2007. Neutron scattering and HPLC study on L-ascorbic acid and its degradation. Chemical Physics, 345: 191–195.

5.Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidant, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. Annals of Botany, 91: 179-194.

6.Boada, J., Roig, T., Perez, X., Gamez, A., Bartrons, R., Cascante, M. and Bermúdez J. 2000. Cells overexpressing fructose-2, 6-bisphosphatase showed enhanced pentose phosphate pathway flux and resistance to oxidative stress. FEBS Letters, 480: 251–264.

7.Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

8.Chance, B. and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymologist, 11: 764-755.

9.Conklin, P.L. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. Plant, Cell and Environment 24 4: 383–394.

10.Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G. and Amran, A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, Pp: 449-459.

11. Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. 1992. Anhydrobiosis. Annu. Rev. Physiol. 54:579-599.

12. Debnam, P.M., Fernie, A.R., Leisse, A., Golding, A., Bowsher, C.G., Grimshaw, C., Knight, J.S. and Emes, M.J. 2004. Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. The Plant Journal, 38: 49–59.

13.Del Carmen, M., Cordoba Pedregosa, M., Montoro, J.M.V., Córdoba García, F. and Gonzalez Reyes, J.A. 2005. Changes in Intracellular and Apoplastic Peroxidase Activity, Ascorbate Redox Status, and Root Elongation Induced By Enhanced Ascorbate Content in *Allium Cepa* L. Journal of Experimental Botany. 56: 412: 685-694.

14. Elbein, A.D. 1974. The mechanism of alpha, alpha teahouse. Adv. Carbohydr. Chem Biochem, 30: 227-252.
15. Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. and Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology 13, 17-27.
16. Foyer, C., Rowell, J. and Walker, D. 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. Planta, 157:239-244.
17. Hörtensteiner, S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. Annual Review of Plant Biology, 57:55–77.
18. Imai, T., Karita, S., Shiratori, G., Hattori, M., Nunome, T., Ôba, K. and Hirai, M. 1998. L-galactono-γ-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. Plant and Cell Physiology, 39: 1350–1358.
19. Jana, S. and Choudhuri, M.A. 1981. Glycolate metabolism of three submereged aquatic angiosperms during aging. Aquatic Botany, 12:342-354.
20. Kar, M. and Mishra, D. 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.
21. Kochert, 1978. Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. In: J.A. Hellebust and J.S. Craige, Editors, Handbook of physiological and biochemical methods, Cambridge University Press, London, Pp: 95–97.
22. Kolbe, A., Tiessen, A., Schluepmann, H., Paul, M., Ulrich, S. and Geigenberger P. 2005. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 102, 11118-11123.
23. Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Cheze, C. and Merillon, J.M. 1998. Regulation of polyphenol production in Vitis vinifera cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Rep* 17, 946–950.
24. Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Tolbert, N.E. and Bieber, L.L. 1981. Protein determination in membrane and lipoprotein sample: manual and automated procedure. Methods in Enzymology, 72:296-303.
25. May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu M. and Inzé, D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. J. Expe. Bota. 49:649–667.
26. 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 those are inducible by sugars. Plant J, 11:841-851.
27. Muller, J., Boller T. and Wiemken, A. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. Plant Science 112:9.
28. Mutsuda, M., Ishikawa, T., Takeda, T. and Shigeoka, S. 1995. Subcellular localization and properties of L-galactono-γ-lactone dehydrogenase in spinach leaves. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59: 1983–1984.

29.Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Yamamoto, H., Hayashi, H. and Murata, N. 2004. Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochemistry, 43: 11321–11330.
30.Noctor, G. and Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 249–279.
31.Nogushi, T. 2002. Dual role of triplet localization on the accessory chlorophyll in the photosystem II reaction center: photoprotection and photodamage of the D1 protein. Plant Cell Physiology, 43: 1112–1116.
32.Pellny, T.K., Ghannoum, O., Conroy, J.P., Schluepmann, H., Smeekens, S., Andralojc, J., Krause, K.P., Goddijn, O. and Paul, M.J. 2004. Genetic modification of photosynthesis with E. coli genes for trehalose synthesis. Plant Biotechnology. J, 2:71-82.
33.Østergaard, J., Persiau, G., Davey, M.W., Bauw, G. and Van Montagu, M. 1997. Isolation of a cDNA coding for L-galactono-γ-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. J. Biol. Chem. 272*:* 30009–30016.
34.Roitsch, T. 1999. Source–sink regulation by sugar and stress. Current Opinion in Plant Biology, 2: 198–206.
35.Salvemini, F., Franzé, A., Iervolino, A., Filosa S., Salzano, S. and Ursini, MV. 1999. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. J. Biol. Chem. 274:2750–2757.
36.Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S. and Paul, M. 2003. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in Arabidopsis thaliana. *Proc.* Natl. Acad. Sci. U.S.A, 100:6849-6854.
37.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.
38.Schluepmann, H. and Paul, M.J. 2009. Trehalose metabolites in Arabidopsis - elusive, active and central. The Arabidopsis Book, in press.
39.Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. Annals of Botany, 78: 661–669.
40.Van Dijken, A.J., Schluepmann, H. and Smeekens, S.C. 2004. Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. Plant Physiology, 135:969-977.
41.Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T. and Aeschbacher, R.A. 2000. Trehalose induces the ADP- glucose pyrophosphorylase gene, ApL3, and starch synthesis in Arabidopsis. Plant Physiology, 124:105-114.
42.Wingler, A., Purdy S., MacLean, J.A. and Pourtau, N. 2006. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. J. Expe. Bota. 57: 391–399.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 17(4), 2010
www.gau.ac.ir/journals

Interaction of trehalose and ascorbic acid in growing Arabidopsis seedlings

***M. Vahdati[1], M. Aghdasi[2] and H.R. Sadeghipour[2]**
[1]M.Sc. Student of Plant Physiology, Golestan University,
[2]Asistant Professor, Dept. of Biology, Golestan University
Received: 18,1,2010 ; Accepted: 23,1,2010

Abstract

Trehalose is an important disaccharide signal metabolite in plants which is involved in various aspects of plant function such as response to stress, photosynthesis and carbon allocation and partitioning. A mutant of Arabidopsis lacking trehalose-6-phosphate synthase activity (*tps1*) accumulates ascorbate. Exogenous ascorbate Application ameliorates trehalose induced growth inhibition of wild type Arabidopsis seedlings and affects its carbon partitioning. Thus, unknown interactions between trehalose and ascorbate metabolisms are expected. This research has tried to reveal part of these interactive effects by analyzing some growth and biochemical parameters of Arabidopsis seedlings fed with sorbitol (100 mM) as control, trehalose (100 mM), trehalose plus ascorbate (0.1 mM), and ascorbate alone. Trehalose fed plants displayed reduced root and shoot growth and higher levels of hydrogen peroxide, anthocyanins and greater catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities along with reduced chlorophyll contents. Exogenous ascorbate application reversed these effects which suggest the prevailing oxidative stress in trehalose fed plants has probably compromised their growth. Control plants accumulated starch in root tips whereas, trehalose fed plants accumulated starch in cotyledons. The effect of trehalose on carbon allocation, however, was reversed following ascorbate application. It was assumed that trehalose feeding affects plant source-sink relations, thus by imposing oxidative stress on roots it reduces sink strength accompanied with declined withdrawal of carbohydrate from shoot. As a result of oil body mobilization in cotyledons, starch is accumulated in this organ. The exogenous ascorbate, however, by promoting root growth increases sink strength, thus carbon is withdrawn more from cotyledons. This leads to starch build up in roots. Unexpectedly, the greatest level of endogenous ascorbate was found in trehalose fed plants which might imply ascorbate utilization for confronting oxidative stress is somehow restricted.

Keywords: Arabidopsis, Ascorbate, Carbon allocation, Oxidative stress, Trehalose

* Corresponding Author; Email: mahbube_vahdati@yahoo.com