بکارگیری در شیشه تریپتوفان بر تجمع ایندول-۳- استیک اسید (IAA) و برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه تنباکو (*Nicotina rustica* L.)

محمد امین طغیانی[۱]، علی اکبر احسان‌پور[۲]، منصور شریعتی[۳]، رحمان امام‌زاده[۴]**

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۳
تاریخ تصویب: ۹۳/۸/۳

چکیده

اکسین‌ها هورمون‌های گیاهی حیاتی و مهم برای رشد و نمو گیاهان بشمار می‌روند. ایندول-۳- استیک اسید (IAA) به عنوان اکسین طبیعی در گیاهان شناخته شده است که دارای نقش های مهم فیزیولوژیکی و اندام زائی است. اسید آمینه حلقوی تریپتوفان (Trp) به عنوان پیش ماده مسیر سنتز IAA در نظر گرفته شده است. از طرف دیگر به عنوان

[۱] کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان.
[۲] استاد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان(نویسنده مسئول)؛ ehsanpou@sci.ui.ac.ir
[۳] استاد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان.
[۴] استادیار، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، داشگاه اصفهان.

مقاله حاضر مستخرج از رساله کارشناسی ارشد، تحت راهنمایی جناب آقای دکتر علی اکبر احسان پور و آقای دکتر منصور شریعتی در دانشگاه اصفهان می‌باشد.

پیش ماده سنتز پروتئین و متابولیت‌های ثانویه در گیاهان در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه گیاهچه‌های تنباکو در محیط کشت MS با سه غلظت متفاوت ۰، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ مولار از تیمار تریپتوفان قرار گرفتند. بعد از ٤ هفته میزان IAA در برگ‌های راسی اندازه‌گیری شد. مقدار هورمون IAA بعد از تیمار گیاهچه‌ها با تریپتوفان تفاوت معنی‌داری را با گیاهچه‌های بدون تیمار نشان داد. نتایج نشان از وجود بیشترین مقدار IAA در گیاهان بدون تریپتوفان و کمترین مقدار در تیمار ۰/۰۵ مولار تریپتوفان مشاهده شد. همچنین در اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی تفاوت معنی‌داری بین گیاهچه‌های تحت تیمار و گیاهچه‌های شاهد در میزان رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید ثبت شد. مشاهده همین روند در اندازه‌گیری پارامترهای رشد دیده شد. در گیاهان تحت تیمار تریپتوفان در مقایسه با گیاهان شاهد باند پروتئینی با حدود KD٤٠ افزایش بیان شد.

واژه‌های کلیدی: اندول-۳- استیک اسید (IAA)، تریپتوفان، تنباکو، پروتئین، کلروفیل

مقدمه

اکسین هورمون مناسبی برای بررسی در تمام بخش‌های مربوط به هورمون‌های گیاهی است زیرا اکسین اولین هورمون رشد شناخته شده در گیاهان است که باعث تنظیم تعداد زیادی از فرایندهای فیزیولوژیکی مرتبط با ساز و کار گسترش سلول می‌شود (Strader and Bartel, 2008). اکسین‌ها گروه کوچکی از مولکول‌های توانمند در القاء پاسخ‌های رشدی هستند و علاوه بر تاثیر مستقیم در رشد، جنبه‌های مختلف و متنوعی از نمو گیاهی را نیز کنترل می‌کند (Woodward and Bartel, 2005). در این میان تریپتوفان نه تنها به عنوان یک اسیدآمینه ضروری، بلکه به عنوان یک پیش ماده اساسی برای طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه که مصرف دارویی دارند، مطرح می‌باشد. به طور معمول مقدار این اسیدآمینه در گیاهان بسیار کم می‌باشد. با وجود این که تولید صنعتی بیشتر آمینواسیدها با کمک کشت میکروبی در محیط کشت تغذیه شده با ساکاروز و

آمونیوم به راحتی میسر است، اما تریپتوفان جزء آن دسته از فراورده‌ها است که تولید آن به طور مؤثری کم می‌باشد (Ikeda, 2006) و مشخص شده است که در مسیر تولید آن و بسیاری از اسیدآمینه‌ها یک سیستم فیدبک کنترل‌کننده وجود دارد. در مورد تریپتوفان این کنترل بر روی آنزیم آنتراآنیلات سنتاز (AS) صورت می‌گیرد. بصورتی که اسیدآمینه تریپتوفان به دومن α این آنزیم متصل شده و از فعالیت آن جلوگیری می‌کند. AS نقش تنظیمی در کنترل سطوح تریپتوفان بر عهده دارد. تریپتوفان نه تنها جزئی از ساختار پروتئین است، بلکه به عنوان یک پیش‌ماده اساسی برای بسیاری از متابولیت‌های ثانویه در نظر گرفته می‌شود. تریپتوفان یکی از انواع آمینو اسیدهای آروماتیک است که بیوسنتز آن از مسیری معروف به مسیر شیکمات انجام می‌پذیرد که با الحاق اریتروز -٤- فسفات به فسفوانول پیرووات شروع شده و در نهایت منجر به تشکیل فرآورده‌های فنیل آلانیل (Phe)، تیروزین (Tyr) و تریپتوفان می‌شود. آنتراآنیلات از کرویسمات، به واسطه کاتالیزوری آنزیم AS تشکیل می‌شود و فراورده نهایی یعنی Trp بازدارنده AS برای تنظیم فراورده آن یعنی تریپتوفان است (Belser et al., 1971, Widholm, 1971).

ایندول-۳- استیک اسید (IAA) اکسین اصلی تولیدی در گیاهان، شناخته شده است که سنتز از نو آن با استفاده از تریپتوفان (Trp) به عنوان یک پیش ماده و یا مسیر مستقل از تریپتوفان صورت می‌گیرد (Mashiguchi et al. 2011, Zhao 2012). همچنین کاملا مشخص شده است که مسیر وابسته به تریپتوفان برای سنتز اکسین در مورد جنین‌زایی، رشد بذر، نمو گل، شکل‌گیری الگوی واکوئلی و بسیاری دیگر از فرایندهای نموی لازم و ضروری است Cheng et al. 2006, Stepanova *et* al. 2008, Tao et al. 2008). در عوض ترکیبات مولکولی و فرایندهای مولکولی مسیر مستقل از تریپتوفان مشخص نیستند. اخیراً یک مسیر دو مرحله‌ای برای سنتز اکسین کشف شده که نشان می‌دهد مسیر اصلی برای سنتز اکسین از تریپتوفان می‌باشد (Zhao, 2012). این پژوهش سعی در بررسی اثر تیمار تریپتوفان بیرونی به عنوان پیش ماده اولیه و القاء کننده سنتز اندول-۳- استیک اسید در شرایط کشت در شیشه گیاه تنباکو به عنوان یک گیاه مدل به منظور درک بهتر نقش مثبت احتمالی تریپتوفان در سنتز اکسین دارد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه تنباکو رقم *N. rustica* در شرایط استریل ابتدا با الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم

تجاری (وایتکس با ۵ درصد کلر فعال) ضد عفونی شدند. و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل در محیط کشت پایه MS با pH ۵/۸ در ظروف شیشه‌ای ۲۵۰ میلی لیتری که هر کدام دارای ۳۰ میلی لیتر محیط کشت بودند، انتقال یافتند. شیشه‌ها در شرایط نور دوره‌ای ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت تقریبی ۳۰ میکرومول فوتون برثانیه بر متر مربع نگه‌داری شدند. پس ازگذشت ۱۰ روز دانه رست‌های سترون حاصل به محیط کشت MS حاوی سه غلظت مختلف ۰،۰۲۵/۰ و ۰/۰۵ مولار تریپتوفان منتقل شدند. بعد از گذشت ٤ هفته گیاهچه‌های کامل رشد یافته برای آنالیز ازشیشه خارج گردیدند.

برای استخراج اکسین از روش اصلاح‌شده Mandal و همکاران استفاده شد (Mandal et al. 2007). برای اندازه‌گیری اکسین اندام‌های هوایی، مقدار ۰/۲۵گرم بافت تر از برگ‌های راسی توزین و در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد درون هاون چینی ساییده تا محلولی همگن بدست آمد. محلول حاصل به درون اپندورف ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد (بدلیل فتواکسیده شدن اکسین استخراج باید به دور از نور انجام بگیرد). محلول مذکور به مدت ۲٤ ساعت در یک محیط تاریک نگهداری گردید. بعد از طی این زمان محلول به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۷ درجه سانتی‌گراد درون بن‌ماری قرار گرفت و در ادامه محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی بعد از سانتریفیوژ جدا سازی شد و به درون لوله آزمایش انتقال یافت و درب لوله‌ها با ورقه آلومینیومی پوشیده شد. سپس ۰/۸ میلی لیتر عصاره استخراج شده از ریشه یا اندام های هوایی در مرحله قبل درون یک لوله آزمایش ریخته شد. سپس ۱/٦ میلی لیتر معرف سالکوفسکی به هر لوله آزمایش اضافه گردید. لوله‌های آزمایش جهت کامل شدن واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در دمای ۵۰-٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. با کامل شدن واکنش اکسیداسیون کمپلکس صورتی رنگی که نتیجه اکسید شدن IAA توسط کلرید فریک در حضور اسید پرکلریک است تشکیل شد. پس از آماده شدن محلول‌ها جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین گردید. محلول بلانک ۱/٦ ml معرف سالکوفسکی با ۰/۸ ml الکل استفاده گردید. در نهایت مقدار اکسین بر حسب میکروگرم در گرم بافت گیاهی گزارش شد.

برای اندازه‌گیری وزن‌تر اندام هوائی گیاهچه‌ها از کمی بالاتر از ریشه قطع و وزن گردیدند. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌های گیاهی به مدت ٤۸ ساعت در آون با دمای ۷۰درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

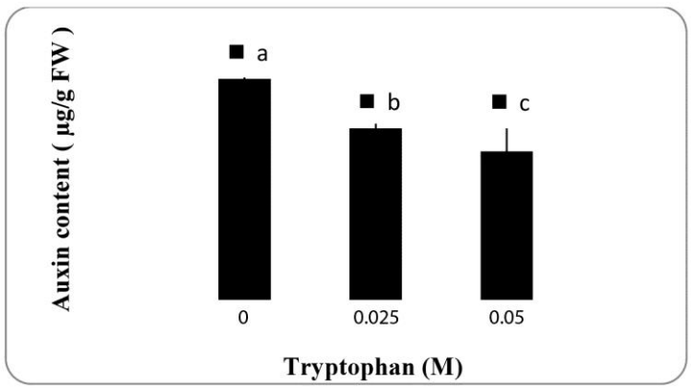
همچنین پروتئین‌های محلول برگ گیاهان تیمار و شاهد به طور جداگانه استخراج شد. اندازه‌گیری پروتئین محلول کل طبق روش برآدفورد با اندکی تغییر انجام گرفت (Olson and Markwell, 2007). الکتروفورز پروتئین‌ها نیز به روش SDS-PGE با استفاده از ژل پلی اکریلامید ۱۲ درصد انجام گرفت (Hames,1990). و در نهایت ژل با محلول کوماسی بلو رنگ آمیزی شد.

کلیه ازمایشات بر اساس یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج

اثر تیمار اسیدآمینه تریپتوفان بر میزان محتوای اکسین

تیمار گیاه تنباکو با اسیدآمینه تریپتوفان در تمامی‌غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری را در مقدار اکسین اندام هوایی ایجاد کرد (نمودار ۱). عدم استفاده از تریپتوفان غلظت صفر (شاهد) نسبت به تیمارهای ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ مولار تریپتوفان بالاترین سطح اکسین را در گیاه نشان داد. علاوه بر این در غلظت ۰/۰۲۵ مولار از تریپتوفان نسبت به غلظت ۰/۰۵ مولار افزایش معنی‌داری مشاهده شد. همچنین کمترین مقدار هورمون اکسین در غلظت ۰/۰۵ مولار تیمار تریپتوفان بدست آمد.

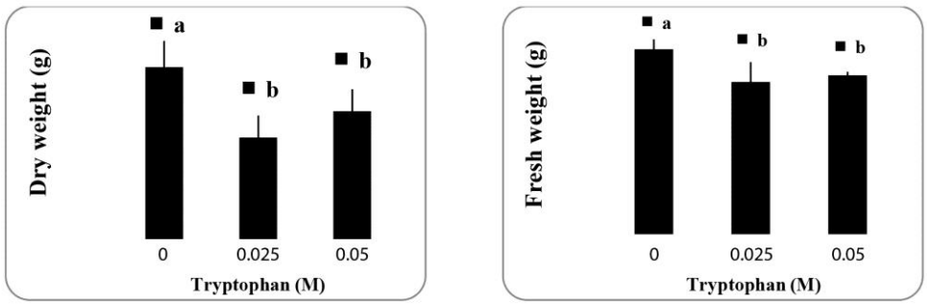


نمودار ۱- اثر تیمار تریپتوفان بر محتوای اکسین برگ‌های راسی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

اثر تیمار اسیدآمینه تریپتوفان بر وزن تر و خشک اندام هوایی

اندازه‌گیری وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهان تیمار شده با اسیدآمینه تریپتوفان، الگویی از تغییرات را از غلظت ۰ تا ۰/۰۵

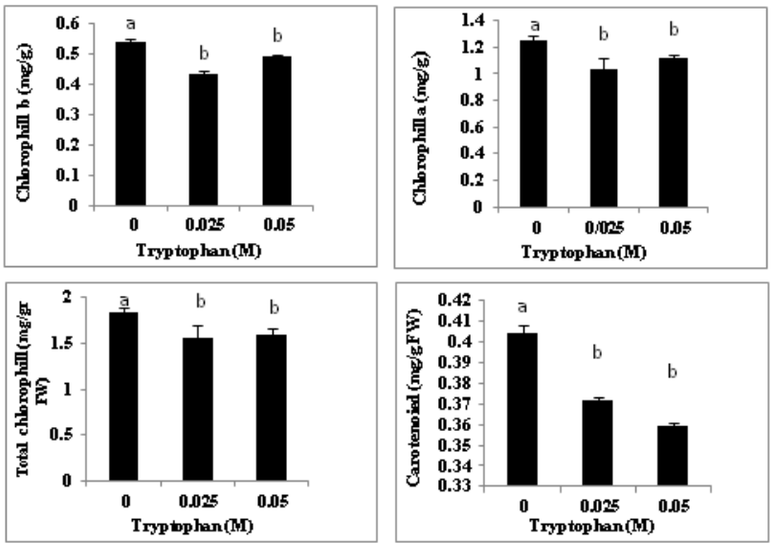
مولار تیمار با تریپتوفان نشان داد (شکل ۲). به نحوی که تیمار تریپتوفان موجب کاهش معنی‌دار هم در وزن تر و هم در وزن خشک گردید. وزن تر گیاه تنباکو در غلظت ۰/۰۵ مولار تریپتوفان نسبت به غلظت‌های صفر کاهش معنی‌داری را نشان داد در حالی که نسبت به غلظت ۰/۰۲۵ مولار تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. همچنین کاهش وزن تر در غلظت ۰/۰۲۵ مولار تریپتوفان نسبت به غلظت‌های مشاهده شد. مشابه همین روند در اندازه‌گیری وزن خشک اتفاق افتاد بدین صورت که در هر دو غلظت ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ تیمار تریپتوفان وزن خشک نسبت به غلظت شاهد کاهش یافته بود در حالی که نسبت به هم تغییر معنی‌داری را نشان نداد.



شکل ۲- اثر تیمار اسیدآمینه تریپتوفان بر وزن تر و خشک. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

اثر تیمار اسیدآمینه تریپتوفان بر میزان رنگیزه‌ها فتوسنتزی

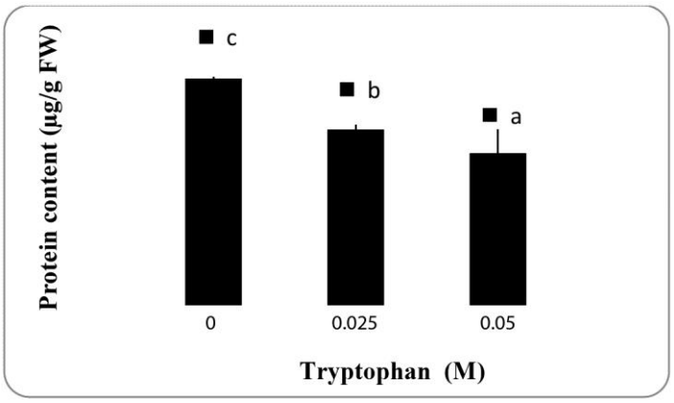
نتایج بدست آمده در شکل ۳ نشان داد که تیمار اسیدآمینه تریپتوفان کاهش معنی‌دار میزان کلروفیل a و b را در برگ‌های راسی موجب شده است. هر دو رنگیزه بر اثر تیمار ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ مولار تریپتوفان در مقایسه با شاهدکاهش یافته بوند. اما از طرف دیگر بین غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ از تیمار تریپتوفان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین مشابه همین روند در کلروفیل کل اندازگیری شده اتفاق افتاد. بین غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ مولار از تیمار تریپتوفان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد در حالی‌که در غلظت شاهد نسبت به تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ میزان کاروفیل افزایش یافته بود. در ادامه محتوای اندازه‌گیری شده کاروتنوئید یک روند کاهشی را از خود نشان داد. گیاهانی که تحت تیمار غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ مولار تریپتوفان قرار گرفته بودند، میزان کاروتنوئید نسبت به شاهد کاهش یافت. همچنین غلظت ۰/۰۵ مولار اثر معنی‌داری را نسبت به ۰/۰۲۵ مولار در محتوای کاروتنوئید موجب نشد.



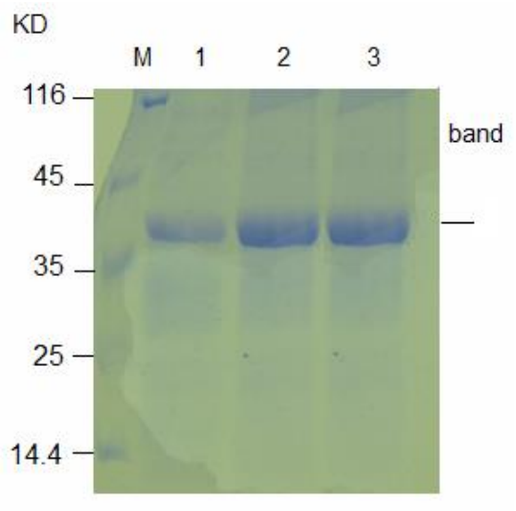
شکل۳- اثر تیمار تریپتوفان بر رنگیزه‌های کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در برگ‌های راسی گیاه تنباکو. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$)

تاثیر تیمار تریپتوفان بر محتوای پروتئین کل و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها

اندازه‌گیری پروتئین محلول کل برگ‌های راسی نشان داد که تیمار تریپتوفان در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ مولار در مقایسه با غلظت صفر افزایش معنی‌داری یافت. همچنین غلظت ۰/۰۵ مولار تریپتوفان اثر معنی‌داری را نسبت به ۰/۰۲۵ مولار در محتوای پروتئین نشان داد (شکل ٤). تیمار تریپتوفان علاوه بر اینکه بر مقدار پروتئین محلول گیاه کل اثر گذاشت، الگوی الکتروفورز پروتئین‌های برگ‌های راسی را نیز در گیاه تغییر داد (شکل ٥). در الگوی پروتئینی برگ‌های راسی یک باند پروتئینی شاخص (شماره ۱) مشاهده گردید. باند شماره ۱ در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ مولار تریپتوفان باعث افزایش بیان باندها نسبت به شاهد (M) شده بود (شکل ٥).



شکل۴- اثر تیماراسیدآمینه تریپتوفان بر پروتئین کل محلول. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل۵- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ گیاه تنباکو در غلظت‌های مختلف تریپتوفان (M: مارکر، ۱: غلظت صفر تریپتوفان، ۲: غلظت ۰/۰۲۵ مولار تریپتوفان ، ۳: غلظت ۰/۰۵ میلی مولارتریپتوفان

بحث و نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد این فرض منطقی باشد که بیوسنتز IAA هماهنگ با بیوسنتز و کاتابولیسم Trp انجام می‌گیرد، زیرا در بیوسنتز IAA از اسید آمینه Trp یا حدواسط‌های مسیر متابولیسم تریپتوفان، به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود (Ishihara etal. 2006).

همانگونه که نتایج به دست آمده نشان داد تیمار تریپتوفان باعث کاهش محتوای مقدار اکسین در گیاهان تحت تیمار شده بود. از آن‌جا که گیاه خود توانایی بیوسنتز تریپتوفان را دارد، احتمالا" تیمار تریپتوفان بیرونی باعث القاء یک مکانیسم فیدبک (بازخور) منفی در تولید IAA شده است (Ishihara et al. 2006). در همین رابطه

مشخص شد سنتز فیتوهورمون ایندول-۳-استیک اسید (IAA) از تریپتوفان (Trp) و از طریق تولید حدواسط ایندول-۳-استالدوکسامین (IAO_x)، صورت می‌گیرد. تشکیل IAO_X از طریق آنزیم‌های سیتوکرومی P450 (CYP79B3 و CYP79B2) کاتالیز می‌شود (Hull et al. 2000, Mikkelsen et al. 2000). از طرفی دیگر Trp پیش ساز ترکیبی از متابولیت ثانویه به نام ایندول گلوکوزینولات می‌باشد که بیوسنتز ترکیب اخیر نیز از حدواسط IAO_X صورت می‌پذیرد (Wittstock and Halkier, 2002). بر اساس این یافته‌ها این باور وجود دارد که مرحله محدود کننده بیوسنتز IAA در پایین دست تولید Trp قرار دارد. زیرا مشخص شده است که تیمار آرابیدوپسیس با Trp منجر به تولید IAA بیشتر و ایجاد فنوتیپ‌هایی که IAA اضافی تولید می‌کنند، نمی‌گردد. این گزارش با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد و نشان می‌دهد بکارگیری Trp خارجی اثری در افزایش IAA ندارد. همچنین اثبات شده است که بیان بیشتر ژن‌های CYP79B2 منجر به تولید بیشتر IAA می‌شود که در این صورت احتمالا" تبدیل Trp به IAO_X با کاتالیزوررى CYP79B2، مرحله محدود کننده بیوسنتز IAA می‌باشد. این مرحله در پایین دست Trp قرار دارد و نشان می‌دهد غلظت مازاد تریپتوفان تاثیری بر سنتز اکسین ندارد و می‌توان این طور نتیجه گرفت که IAO_X حد واسط کلیدی در تنظیم مسیر سنتز IAA وابسته به Trp است (Zhao, 2012). با این وجود گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد در کالوس‌های تراریخت شده که در انها بیان ژن محدود کننده بیوسنتز Trp افزایش یافته بود، سطوح IAA نسبت به گیاهان غیر ترانس ژن، بالاتر و احتمالاً نتیجه افزایش تریپتوفان در این ترانسفرم‌ها بوده است (Matsuda et al. 2005, Morino et al. 2005, Wakasa et al. 2006) همچنین سطوح انواع اکسین پیوسته نیز با افزایش رو به رو شد. این یافته با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر مطابقت نداشت اما علیرغم این افزایش میزان IAA، هیچ‌گونه تغییر مشهودی در میزان نرخ رشد و یا مورفولوژی گیاه مشاهده نشد. این یافته‌ها در تقابل با فنوتیپ‌های غیر طبیعی می‌باشد که به عنوان فنوتیپ با افزایش IAA شناخته می‌شود (Barlier et al. 2000, Boerjan et al. 1995, Zhao et al. 2001). با توجه به متفاوت بودن نتایج به دست آمده درپژوهش‌های ذکر شده، انجام تحقیقات بیشتر تکمیلی جهت درک صحیح تر نقش تریپتوفانن ضروری به نظر می‌رسد.

در تحقیق حاضر بر اساس نتایج به دست آمده، تیمار تریپتوفان منجر به کاهش وزن تر و خشک گیاهان تحت تیمار، گردیده است.

به‌طوری که غلظت‌های بالای تیمار تریپتوفان سبب بیشترین کاهش در وزن تر و خشک شده است. کاهش ایجاد شده در گیاهان در اثر تیمار اسید آمینه تریپتوفان احتمالا" به این دلیل است که غلظت‌های مورد استفاده از تریپتوفان اثری سمی و یا مهار کننده بر سنتز و فعالسازی تنظیم کنندگان رشد گیاهی (به ویژه اکسین) داشته و به طور مشخص از تجمع محتوای پروتئین و کربوهیدرات ممانعت کرده است. این تنظیم‌کنندگان در تولید ماده خشک در فاز رویشی بیشتر فعالند. کاهش تجمع کربوهیدرات‌ها به علت تیمار تریپتوفان و اثر آن بر اکسین ممکن است با کارایی دستگاه فتوسنتزی مرتبط باشد که منجر به کاهش تولیدات گیاهی و کاهش تولید ماده خشک گیاهی می‌شود (Azooz, 2004). از طرف دیگر مشخص شده است که اکسین بر روی سنتز سیتوکینین تاثیر گذار بوده به طوری که با کاهش مقدار اکسین، احتمالا" سنتز یا فعال سازی سیتوکینین نیز تحت تاثیر قرار گرفته و در نتیجه بر اثرات رشد و نموی سیتوکینین در کل پیکری گیاه تاثیر گذار شده است (Nordström et al. 2004).

نسبت رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید، هم از لحاظ کمی و هم از لحاظ کیفی، به طور مستقیم با فتوسنتز مرتبط است براساس نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر تیمار تریپتوفان باعث کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل a، b و میزان کلروفیل کل و همچنین مقدار کاروتنوئید شد. این نتایج می‌تواند به دلایل متفاوتی رخ داده باشد. الف- ممکن است غلظت‌های خارجی تریپتوفان اثر بازدارندگی منفی در تولید IAA داشته و با توجه اینکه Taslima، و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که غلظت‌های ویژه‌ای از IAA می‌تواند در افزایش رنگیزه‌های کلروفیل a و b مفید باشد، از این رو تداخل پیش‌آمده در تولید یا فعال‌سازی IAA باعث کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی شده است. ب- همچنین اثرات احتمالی تریپتوفان بر اکسین، خود می‌تواند باعث تداخل این تنظیم کننده رشد با دیگر هورمون‌های تنظیمی از جمله سیتوکینین گردد تحقیقات نشان داده است که اکسین می‌تواند سطوح سیتوکینین را تنظیم کند. ج- تعادل بین اکسین و سیتوکینین در فرآیند پیری Senescence مهم می‌باشد. از آن‌جایی که سیتوکینین در حفظ و نگهداری کلروفیل دخیل است، این تداخل هورمونی بوجود آمده در پژوهش حاضر می‌تواند بر سازماندهی رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه مقدار فتوسنتز و در نهایت میزان رشد اثر گذار باشد.

تریپتوفان به عنوان یک اسید آمینه ضروری علاوه بر پیش ماده سنتز IAA، در ساختمان

پروتئین‌ها نیز مشارکت داشته و یا اینکه می‌تواند به عنوان یک پیش ماده در طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار بگیرد و باعث القاء آنزیم‌ها و پروتئین‌های مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها شود (Hull et al. 2000, Mikkelsen et al. 2000, Zhao et al. 2002). در مطالعه حاضر مشخص شد که تیمار تریپتوفان خارجی محتوای پروتئینی برگ‌های راسی را در گیاه تنباکو افزایش داده و بیان و تراکم باندهای پروتئینی خاصی را در گیاهان تحت تیمار نسبت به شاهد افزوده است. با وجود اینکه تنظیم کنندگان رشد گیاهی مثل اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها افزایش محتوای پروتئینی گیاه را احتمالاً از طریق فعال سازی مکانیسم‌های متعدد مرتبط با رشد ومتابولیسم گیاه، موجب می‌شوند اما به دلیل نتایج مشاهده در تحقیق حاضر و استنباط اینکه Trp تاثیر معنی‌داری در افزایش محتوای هورمون IAA بر جای نگذاشته است، احتمالا این افزایش در بیان پروتئین را نمی‌توان به طور مستقیم به تنظیم کنندگان رشد گیاهی از جمله اکسین نسبت داد. و احتمالا" با توجه به اینکه مقدار اسیدآمینه تریپتوفان در گیاه بسیار محدود و کنترل شده است، گیاه اسید آمینه مازاد و اضافی بیرونی را به عنوان یک منبع نیتروژن مورد استفاده قرار داده (Guyer et al. 1995, Zhao et al. 1998) و یا ممکن است تریپتوفان مستقیماً برای ساخت پروتئین‌های جدید در اختیار ماشین سنتز پروتئین سلول قرار داده باشد که در نهایت باعث افزایش مقدار پروتئین محلول شده است (Sugiharto and Sugiyama, 1992). به هر حال تفسیر دقیتر و واقعی‌تر این موضوع نیاز به بررسی و مطالعه پروتئین‌های گیاه تحت تیمار ترپتوفان بطور دقیقتر دارد.

به طور کلی با توجه به مشاهدات صورت گرفته در پژوهش حاضر و با توجه به اینکه که گیاه خود توانایی بیوسنتز تریپتوفان را دارد، احتمالاً تیمار تریپتوفان بیرونی باعث القاء یک مکانیسم فیدبک منفی در تولید IAA و یا همیوغ شدن IAA شده است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان بواسطه حمایت از انجام این پژوهش تشکر می‌نمایند.

منابع

Azooz, M. (2004). Proteins, sugars and ion leakage as a selection criterion for the salt tolerance of three sorghum cultivars at seedling stage grown under NaCl and nicotinamd. International Journal of Agricultural Biology. 6: 27-35.

Barlier, I., Kowalczyk, M., Marchant, A. Ljung, K., Bhalerao, R. Bennett, M. Sandberg, G. and Bellini, C. (2000). The SUR2 gene of Arabidopsis thaliana encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 97(26): 14819-14824.

Belser W., Baron Murphy, J. Delmar, D. and Mills, S. (1971). End product control of tryptophan biosynthesis in extracts and intact cells of the higher plant"BBA. General Subjects. 237(1): 1-10.

Boerjan, W., Cervera, M. T. Delarue, M. Beeckman, T. Dewitte, W. Bellini, C. Caboche, M. Van Onckelen, H. Van Montagu, M. and Inzé, D. (1995). Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. The Plant Cell. 7(9): 1405-1419.

Cheng, Y., Dai, X. and Zhao, Y, (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. Genes Development. 20(13): 1790-1799.

Guyer, D., Patton, D. and Ward, E. (1995). Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 92(11): 4997-5000.

Hames, B. D. (1990). One dimensional polyacrylamide gel electeroohoresis. Pp. 382. In: B. D. Hames, B and D. Rickwood (eds). Gel eleterophoresis of protein. 2ed ED, Oxford university press. New York.

Hull, A. K. Vij, R. and Celenza, J. L. (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 97(5): 2379-2384.

Ikeda, M. (2006). Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. Applied Microbiology and Biotechnology. 69(6): 615-626.

Ishihara, A. Asada, Y. Takahashi, Y. Yabe, N. Komeda, Y. Nishioka, T. Miyagawa, H. and Wakasa, K. (2006). Metabolic changes in *Arabidopsis thaliana* expressing the feedback-resistant anthranilate synthase α subunit gene OASA1D Phytochemistry. 67(21): 2349-2362.

Mandal, S. M. Mondal, K. C. Dey, S. and Pati, B. R. (2007). Optimization of Cultural and Nutritional Conditions for Indole 3-acetic Acid (IAA) Production by a *Rhizobium* sp. Isolated from Root Nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper. Research Journal in Microbiology. 2: 239-246.

Mashiguchi, K. Tanaka, K. Sakai, T. Sugawara, S. Kawaide, H. Natsume, M. Hanada, A. Yaeno, T. Shirasu, K. and Yao, H. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 108(45): 18512-18517.

Matsuda, F. Miyazawa, H. Wakasa, K. and Miyagawa, H. (2005) Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry, Bioscience Biotechnology and Biochemistry 69(4): 778-783.

Mikkelsen, M. D. Hansen, C. H. Wittstock, U. and Halkier, B. A. (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. Journal of Biology and Chemistry 275(43): 33712-33717.

Morino, K. Matsuda, F. Miyazawa, H. Sukegawa, A. Miyagawa, H. and Wakasa, K. (2005) Metabolic profiling of tryptophan-overproducing rice calli that express a feedback-insensitive α subunit of anthranilate synthase. Plant Cell Physiology 46(3): 514-521.

Nordström, A. Tarkowski, P. Tarkowska, D. Norbaek, R. Åstot, C. Dolezal, K. and Sandberg, G. (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101(21): 8039-8044.

Olson, B.J.S.C. and Markwell, J. (2007) Current Protocols in Protein. Science Detection and Assay method" 48: 29-34.

Stepanova, A. N. Robertson-Hoyt, J. Yun, J. Benavente, L. M. Xie, D.-Y, Doležal, K, Schlereth, A. Jürgens, G. and Alonso, J. M. (2008) TAA1-mediated Auxin Biosynthesis is essential for hormone crosstalk and Plant development. Cell 133(1): 177-191.

Strader, L. C. and Bartel, B. (2008) A new path to auxin. Natural Chemistry and Biology 4(6): 337-339.

Sugiharto, B. and Sugiyama, T. (1992) Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. Plant Physiology 98(4): 1403-1408.

Tao, Y Ferrer, J.-L. Ljung, K. Pojer, F. Hong, F. Long, J. A. Li, L. Moreno, J. E. Bowman, M. E. and Ivans, L. J. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. Cell 133(1): 164-176.

Taslima, K. Hossain, F. and Ara, U. (2011) Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) on Biochemical Responses of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Var. Bari Fellon-1. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research 46(1): 77-82.

Wakasa, K. Hasegawa, H. Nemoto, H., Matsuda, F. Miyazawa, H. Tozawa, Y. Morino, K. Komatsu, A. Yamada, T. and Terakawa, T. (2006) High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. Journal of Experimental Botany 57(12): 3069-3078.

Widholmi, J. M. (1971) Control of tryptophan biosynthesis in plant tissue cultures: lack of repression of anthranilate and tryptophan synthetases by tryptophan. Physiologia Plantarum 25(1): 75-79.

Wittstock, U. and Halkier, B. A. (2002) Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. Trends Plant Science 7(6): 263-270.

Woodward, A. W. and Bartel, B. (2005) Auxin: regulation, action and interaction. Annal of Botany. 95(5): 707-735.

Zhao, J. Williams C. C. and Last, R. L. (1998) Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress and an *abiotic* elicitor. The Plant Cell 10(3): 359-370.

Zhao, Y. (2012) Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. Molecular Plant 5(2): 334-338.

Zhao, Y. Christensen, S. K. Fankhauser, C. Cashman, J. R Cohen, J. D., Weigel, D. and Chory, J. (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis" Science 291(5502): 306-309.

Zhao, Y. Hull, A. K. Gupta, N. R. Goss, K. A., Alonso, J. Ecker, J. R, Normanly, J. Chory, J. and Celenza, J. L. (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. Gene Development Journal 16(23): 3100-3112.