DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2

الگوی بیان ژنهای کدکننده آنزیمهای کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز تحت شرایط کمبود روی خاک در گندم نان

لیلا رحیمی جاریحانی و بابک عبدالهی مندولکانی*

ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

به منظور بررسی اثر تنش کمبود روی (Zn) بر بیان ژنهای کدکننده آنزیمهای آنتی‌اکسیدان کاتالاز (Catalase)، آسکوربات-پراکسیداز (Ascorbate peroxidase) و پلی‌فنل‌اکسیداز (Polyphenol oxidase) در ارقام روی-کارا و روی-ناکارا گندم نان، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه اجرا شد. ارقام بیات و نیک نژاد (روی-کارا) و هیرمند و کرج ۱ (روی-ناکارا) در شرایط کمبود روی خاک و کفایت آن کشت و بیان ژنهای کد کننده این سه آنزیم در برگ و ریشه ارقام در دو مرحله یک ماه بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی) با روش Real time PCR اندازه-گیری شد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها نشان داد بیشترین افزایش میزان بیان ژن کاتالاز (۵/۷۴ برابر کنترل) در شرایط کمبود روی در ارقام روی-کارا بیات و نیک نژاد در مرحله زایشی مشاهده می‌شود. همچنین میزان بیان این ژن و ژن کدکننده آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در شرایط کمبود روی در برگ ارقام روی-کارا به طور معنی‌داری بیشتر از برگ ارقام روی-ناکارا بود. بیشترین افزایش بیان ژن کدکننده آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (۵/۶۲ برابر کنترل) نیز در شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-کارا بیات مشاهده شد. بنابراین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد ژنهای کدکننده هر سه آنزیم آنتی اکسیدان فوق در تحمل تنش کمبود روی خاک در ارقام روی-کارا گندم دخیل می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم کاتالاز، آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز، بیان ژن، گندم نان

* **نویسنده مسئول**، تلفن: ۰۹۱۲۲۳۸۶۹۹۰، پست الکترونیکی: b.abdollahi@urmia.ac.ir

مقدمه

گندم بیش از ۲۰ درصد کالری مورد نیاز جمعیت جهان را تأمین می‌کند. این گیاه در ایران به عنوان منبع اصلی کربوهیدرات و مهمترین غله به شمار می‌رود. در حال حاضر گندم در ۱۷ درصد از زمینهای زراعی جهان کشت می‌شود و ۳۵ درصد از انرژی و پروتئین جیره غذایی انسان را تشکیل می‌دهد (۱۹ و ۲۲). سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (www.fao.org) میزان تولید گندم در جهان در سال ۲۰۱۷ را ۵۰۴ میلیون تن گزارش کرد. کشور ایران به عنوان یکی از تولیدکنندگان عمده گندم جهان در سال ۲۰۱۷ بالغ بر ۱۳/۵ میلیون تن گندم تولید کرد (۸).

تنشهای زیستی و غیرزیستی تهدیدات جدی برای تولیدات کشاورزی محسوب می‌شوند (۲۴). از جمله تنشهای غیرزیستی می‌توان به کمبود ریزمغذیها در خاک اشاره نمود. ریزمغذیها از عناصر ضروری مورد نیاز گیاهان هستند و در فرایندهای مختلف مربوط به فتوسنتز، رشد و نمو گیاه مشارکت می‌کنند (۱۲). در بین عناصر کم مصرف، روی (Zn) به دلیل نقش آن در سنتز هورمونهای گیاهی اهمیت ویژه‌ای دارد. بذور با مقادیر بالاتر این عنصر دارای قدرت جوانه زنی بیشتر بوده و سیستم ریشه‌ای بزرگتری داشته و عملکرد بالاتری در خاکهای فقیر از ریزمغذیها

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2

تولید می‌کنند (۲۸). عنصر روی، بر ظرفیت جذب آب و حمل و نقل مواد در گیاهان تأثیر می گذارد و همچنین اثرات نامطلوب دوره‌های کوتاه مدت تنش گرمایی و نمکی را کاهش می دهد (۱۸). روی در ساختار برخی آنزیمها وجود دارد و باعث فعال شدن آنها می‌شود. کمبود روی عملکرد دانه و کیفیت آن را کاهش می‌دهد (۱۷) و یکی از شایع‌ترین کمبودها در مواد غذایی کم‌مصرف در غلّات به ویژه گندم می‌باشد (۱۴).

گیاهان برای مقابله با تنشها از جمله تنش کمبود روی واکنشهای مختلفی نشان می‌دهند که از جمله آنها مکانیسمهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد (۱۱و۱۵). اکسیداسیون یک واکنش شیمیایی است که منجر به تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود. ROS ها اشکال ویژه‌ای از اکسیژن اتمسفری شامل رادیکالهای سوپراکسید، پراکسیدهیدروژن و هیدروکسیلها هستند که طی مراحل اکسیداتیو طبیعی در سلول مثل تنفس، فتوسنتز وفسفوریلاسیون اکسیداتیو تولید می‌شوند. اما غلظت آنها در معرض تنشهای زیستی و غیرزیستی افزایش می‌یابد (۲). سیستم آنت‌اکسیدانی غیرآنزیمی شامل آنتی-اکسیدانهای محلول در چربی (ویتأمین E، بتاکاروتن، لیکوپن و زانتوفیل) و محلول در آب (اسیدآسکوربیک و گلوتاتیون) است (۳، ۲۱ و ۲۳). آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و پراکسی ایردوکسین (PrxR) می باشند (۱۰). آنزیمهای آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز به ترتیب مسئول تعدیل رادیکالهای آزاد اکسیژن (جهت سیگنال‌دهی) و تجزیه مقادیر زیادی آنها می‌باشد. میل ترکیبی بالای آسکوربات - پراکسیداز با پراکسید هیدروژن، نشانگر نقش مهم این آنزیم در کنترل میزان رادیکالهای آزاد اکسیژن می‌باشد (۲۵). آنزیم کاتالاز فقط در پراکسیزوم حضور دارد ولی برای زدودن اثرات سمی ROSها در زمان تنش ضروری است (۲۷). پلی‌فنل‌اکسیداز با تبدیل ترکیبات فنولی درونی به O-quinones که برای پاتوژنها و حشرات سمی است نقش بسیار مهمی در سیستم دفاعی گیاه ایفاء می‌کند (۲۱). فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در گیاهان در شرایط تنشهای غیر-زنده (۱۹) و آلودگی قارچی افزایش می‌یابد (۲۰).

بررسی آسیب اکسیداتیو ناشی از روی در ریشه و برگ گندم نان نشان داد که فعالیت آنزیمهای آسکوربات-پراکسیداز و کاتالاز و همچنین متابولیسم پرولین در حضور غلظتهای زیاد روی در برگ افزایش می‌یابد (۲۸). همچنین مطالعه تأثیرات روی، بنزوآپیرن و ترکیب آنها بر رشد و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در گیاه گندم نشان داد که در تنشهای جداگانه روی و بنزوآپیرن میزان فعالیت آنزیم کاتالاز پس از افزایش اولیه کاهش می‌یابد ولی در تنش ترکیبی، آنزیم کاتالاز دارای کمترین فعالیت می باشد (۲۸). در بررسی تأثیر تنش عنصر روی در گیاه ماش سیاه (*Vigna mungo* L.) گزارش شد که میزان فعالیت آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط کمبود و افزایش میزان عنصر روی در خاک کاهش می‌یابد (۱۶). این گزارشات نشان می‌دهد که آنزیمهای آنتی اکسیدان در تنش کمبود روی در گیاهان نیز همانند سایر تنشهای زنده و غیر زنده نقش اساسی دارند. با توجه به اینکه تاکنون بیان ژنهای کد کننده آنزیمهای آنتی‌اکسیدان تحت تنش کمبود روی در گندم نان مطالعه نشده است بنابراین هدف از این تحقیق، مطالعه بیان ژنهای کدکننده آنزیمهای کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز تحت تنش کمبود روی در برگ و ریشه ارقام روی-کارا و روی-ناکارا گندم نان بود.

مواد و روشها

کشت مواد گیاهی: این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در بهار سال ۱۳۹۶ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. بذور ارقام بیات و نیک نژاد (روی-کارا) و هیرمند و کرج ۱ (روی-ناکارا) (۴ و ۵) در دو سطح روی (صفر و ۵

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2

میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک) کشت شد. خاک تهیه شده از بستر رودخانه فصلی خان آرخی ارومیه (دارای کمترین مقدار روی) بعد از غربال با الک ۲ میلی متری، ۵ بار با آب معمولی و سپس یک بار با آب دوبار تقطیر شسته شد تا میزان روی خاک به کمترین حد ممکن برسد. قبل از کشت، مواد غذایی مورد نیاز (جدول ۱) با خاک مخلوط شد. علاوه بر مواد غذایی، به خاک نیمی از گلدانها عنصر روی به صورت $ZnSO_4.7H_2O$ اسپری شد. ۱۰ عدد بذر از هر یک از ارقام ابتدا با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد. در هریک از گلدانهای پلی اتیلنی به قطر ۱۱ و ارتفاع ۳۴ سانتیمتر، ۴ کیلوگرم خاک ریخته و بذور ضدعفونی شده در عمق ۴ سانتیمتری خاک کاشته شد. در طول فصل به منظور جلوگیری از آلودگی روی، از آب دو بار تقطیر برای آبیاری در حد ظرفیت زراعی استفاده شد. همچنین برای جلوگیری از کمبود نیتروژن، محلول نیترات آمونیوم هر دو هفته یک بار به گلدانها اضافه شد. جهت مطالعه بیان ژن، نمونه‌برداری در دو مرحله یک ماه بعد از جوانه-زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی) از بافت برگ و ریشه گیاهان انجام و در داخل ازت مایع به یخچال ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

جدول ۱- ترکیب محلول غذایی مورد استفاده در آزمایش

مواد مورد استفاده	غلظت محلول غذایی (gr/L)	مقدار محلول غذایی مورد نیاز (ml/kg)
K2SO4 / KH2PO4	(۴۸/۴۰۷) / (۳۰/۲۴۲)	(۳)
NH4NO3 / CaCl2.2H2O	(۹۳) / (۱۴۷/۰۱۶)	(۱)
MgSO4.7H2O	(۲۰/۵)	(۱)
MnSO4.H2O / Na2MoO4.2H2O /CuSO4.5H2O / H3BO3	(۷/۵) / (۰/۰۸۳) / (۱/۰۵) / (۰/۳۳۳)	(۲)
ZnSO4.7H2O	(۱۳/۱۴)	(۱/۶۷)

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از نمونه-های برگی و ریشه گیاهان با استفاده از محلول RNX-plus™ (سیناکلون، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo، آمریکا) و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد. جهت سنتز cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (فرمنتاز، آلمان) استفاده شد. همچنین قبل از سنتز cDNA، تیمار DNase (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت سنتز cDNA) به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی انجام گرفت. برای اطمینان از عدم وجود آلودگی DNA ژنومی و اجزای واکنش و صحت سنتز cDNA، واکنشهای کنترل شامل RT- (عدم استفاده از آنزیم Reverse transcriptase در مرحله سنتز) و NTC (عدم استفاده از RNA در مرحله سنتز) و همچنین واکنش کنترل مثبت (سنتز cDNA با استفاده از RNA ژن Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase موش موجود در کیت) طبق دستورالعمل شرکت سازنده در نظر گرفته شد.

واکنشهای Real time PCR: برای مطالعه میزان بیان ژنهای کدکننده آنزیمهای آنتی اکسیدان آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیداز، توالی نواحی کدکننده آنها از سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج و آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) با استفاده از نرم افزارهای FastPCR و Gene Runner طراحی شد.

واکنشهای Real time PCR با در نظر گرفتن سه تکرار زیستی (بیولوژیک) در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر طبق پروتکل کیت SYBR Green/ROX qPCR Maser Mix (فرمنتاز، آلمان) در دستگاه Rotor-Gene Q مدل ۶۰۰۰ (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. از ژن اکتین به عنوان ژن مرجع در واکنشهای Real time PCR استفاده شد.

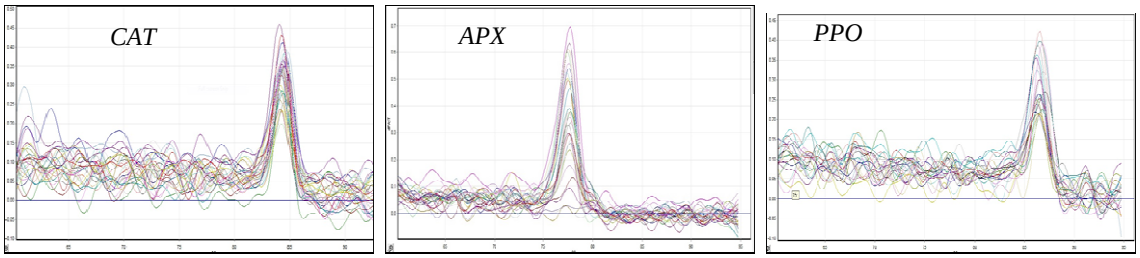
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنشهای Real Time PCR.

نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگرها	دمای اتصال	اندازه محصول
Actin3	TC234027	F: gacgcacaacaggtatcgtgttg R: cagcgaggtcaagacgaaggatg	۶۰	۱۰۷
CAT	GU984379	F: tgatgggagtcttgtgcttgtg R: tgctccacatcggggcgttgaa	۶۲	۱۰۷
ASP	AY513262	F: tgagtcatggagcgaatgctggtc R: tgctgtagcactcgccaactggaa	۶۴	۱۱۶
PPO	AY515506	F: cgatctacgccaacaggtcgtc R: cactggagtcaaggtcggtcagca	۶۴	۹۰

CAT: کاتالاز، *ASP*: آسکوربات پراکسیداز، *PPO*: پلی‌فنل اکسیداز

چرخه‌های زمانی تکثیر ژنهای مطالعه شده، با توجه به توالی آغازگرها و اندازه محصول تکثیری شامل فعال‌سازی آغازین آنزیم در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه در سیکل اول و سپس ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشت-سازی در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دماهای اتصال ویژه هر ژن (جدول ۲) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. بعد از اتمام واکنش، صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از آنالیز منحنی ذوب همان ژن تأیید شد (شکل ۱). کمیت نسبی به وسیله اندازه‌گیری افزایش نور فلورسنت در نتیجه اتصال رنگ با نرم افزار Rotor-Gene Q تعیین گردید. پس از پایان یافتن واکنشها مقدار حد آستانه طوری در نظر گرفته شد که سیگنالهای فلورسنت را در فاز نمایی قطع کند. بعد از محاسبه حد آستانه با این نرم‌افزار، مقدار بیان نسبی ژنهای مورد نظر در گیاهان تیمار شده نسبت به کنترل با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد. به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها و اشتباهات آزمایشی از روش کلموگراف-اسمیرنوف در نرم‌افزار MINITAB (نسخه ۱۹) و برای انجام تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) استفاده شد. مقایسه میانگینها به روش دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ با همین نرم افزار انجام گردید.



شکل ۱- منحنی ذوب ژنهای کاتالاز(*CAT*)، آسکوربات پراکسیداز (*APX*) و پلی‌فنل‌اکسیداز (*PPO*) در واکنشهای Real Time PCR در گیاه گندم نان

نتایج

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد اثرات متقابل سه جانبه روی × رقم × مرحله نمونه‌برداری، روی × بافت × مرحله نمونه‌برداری و روی × رقم × بافت بر بیان ژن کاتالاز معنی‌دار ($P\leq0.01$) می‌باشد. همچنین اثرات متقابل روی × رقم × مرحله نمونه‌برداری و روی × رقم × بافت بر بیان ژن آسکوربات پراکسیداز معنی دار ($P\leq0.01$) بود. در خصوص بیان ژن پلی فنل اکسیداز، تمامی اثرات متقابل سه جانبه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بودند.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2

جدول ۳- تجزیه واریانس بیان نسبی ژنهای کدکننده آنزیمهای آنتی اکسیدان کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز تحت تنش کمبود روی (Zn) در ارقام مختلف گندم نان

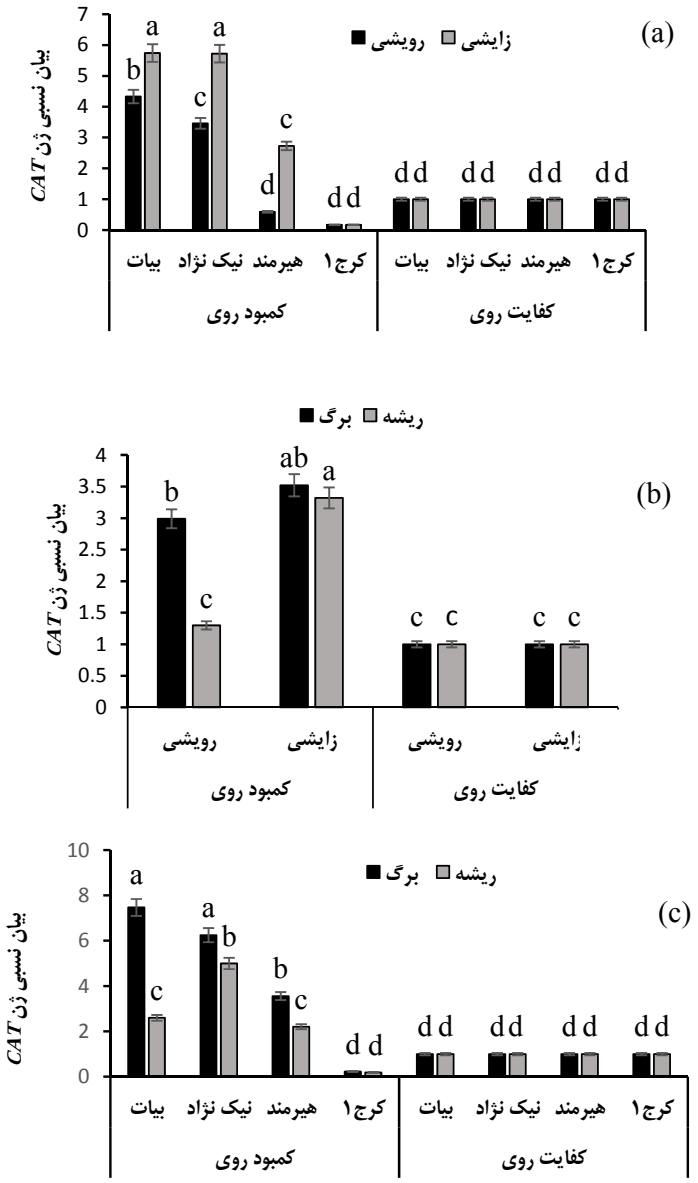
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)		
		کاتالاز	آسکوربات‌پراکسیداز	پلی‌فنل‌اکسیداز
روی	۱	۵۶/۵۱**	۲۸/۷۲**	۲۱/۴۷**
رقم	۳	۲۱/۵۷**	۸/۹۹**	۱۴/۸۰**
بافت	۱	۲/۲۳**	۲۶/۰۶**	۰/۳۹*
مرحله	۱	۸/۶۲**	۰/۳۴ns	۸/۳۹**
رقم × روی	۳	۲۱/۵۷**	۸/۹۹**	۱۴/۸۰**
بافت × روی	۱	۲/۲۳**	۲۶/۰۶**	۰/۳۹*
مرحله × روی	۱	۸/۶۲**	۰/۳۴ns	۸/۳۹**
بافت × رقم	۳	۷/۷۶**	۵/۸۱**	۱/۲۰**
مرحله × رقم	۳	۱/۰۱**	۰/۷۸**	۱/۲۴**
مرحله × بافت	۱	۳/۵۴**	۰/۳۰ns	۲/۲۵**
بافت × رقم × روی	۳	۷/۷۶**	۵/۸۱**	۱/۲۰**
مرحله × بافت × روی	۱	۳/۵۴**	۰/۳۰ns	۲/۲۵**
مرحله × رقم × روی	۳	۱/۰۱**	۰/۷۸**	۱/۲۴**
مرحله × بافت × رقم	۳	۰/۵۵ns	۰/۳۷ns	۱/۴۳**
مرحله × بافت × رقم × روی	۴	۰/۵۵**	۰/۳۷ns	۱/۴۳**
خطا	۶۴	۶/۲۶	۴/۱۹	۱/۸۷
ضریب تغییرات (٪)		۲۲/۸۱	۲۱/۶۸	۱۵/۳۱

*و**: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱درصد، ns: غیر معنی دار

بیان ژن کاتالاز: مقایسه میانگین اثر متقابل روی × رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن کاتالاز نشان داد که افزایش میزان بیان این ژن (۵/۵ برابر شاهد) در شرایط کمبود روی در ارقام روی-کارا (بیات و نیک‌نژاد) در مرحله زایشی به طور معنی‌داری بیشتر از ارقام روی-ناکارا بود. همچنین در شرایط کمبود روی در تمامی ارقام به جز رقم روی-ناکارا کرج ۱، بیان این ژن در مرحله زایشی به طور معنی‌داری بیش از مرحله رویشی بود (شکل ۲-a). مقایسه میانگین اثر متقابل روی × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن کاتالاز نشان داد که بیشترین میزان افزایش بیان این ژن در شرایط کمبود روی خاک در مرحله زایشی در بافت برگ و ریشه مشاهده می‌شود. همچنین افزایش بیان نسبی این ژن در برگ در مرحله رویشی بیشتر از ریشه بود (شکل ۲-b). مقایسه اثر متقابل روی × رقم × بافت بر بیان ژن کاتالاز نشان داد که بیشترین میزان افزایش بیان این ژن در برگ ارقام روی-کارا در شرایط کمبود روی می‌باشد. همچنین در شرایط کمبود روی در تمامی ارقام به جز رقم کرج ۱ افزایش بیان این ژن در برگ به طور معنی‌داری بیشتر از ریشه بود (شکل ۲-c).

بیان ژن آسکوربات پراکسیداز: مقایسه میانگین اثر متقابل روی × رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن آسکوربات پراکسیداز نشان داد که بیشترین افزایش بیان نسبی این ژن در شرایط کمبود روی در رقم روی-کارا بیات در مراحل زایشی و رویشی مشاهده شد.

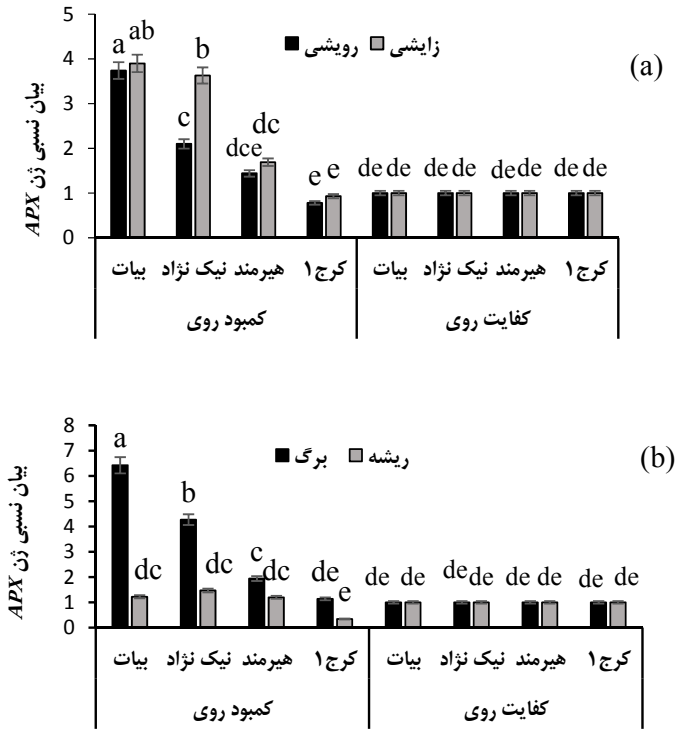
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل روی × رقم × مرحله نمونه‌برداری (a)، روی × بافت × مرحله نمونه‌برداری (b) و روی × رقم × بافت (C) بر بیان ژن کاتالاز(*CAT*) در ارقام گندم نان (ستونهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند) کمبود روی: صفر میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک، کفایت روی: ۵ میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک.

البته در رقم روی-کارای نیک‌نژاد نیز در شرایط کمبود روی در مرحله زایشی میزان بیان این ژن به طور معنی-داری بیشتر از ارقام روی-ناکارا در همین مرحله بود (شکل ۳-a). مقایسه میانگین اثر متقابل روی × بافت × رقم بر بیان ژن آسکوربات پراکسیداز نشان داد که افزایش میزان بیان این ژن در شرایط کمبود روی در برگ ارقام روی-کارا به طور معنی‌داری بیشتر از ارقام روی-ناکارا بود به طوری که بیشترین میزان این افزایش (۶/۴۱ برابر شاهد) در برگ رقم روی-کارای بیات مشاهده شد. همچنین در ارقام روی-ناکارا در شرایط کمبود روی تفاوتی بین میزان بیان این ژن در برگ و ریشه مشاهده نشد (شکل ۳-b).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2



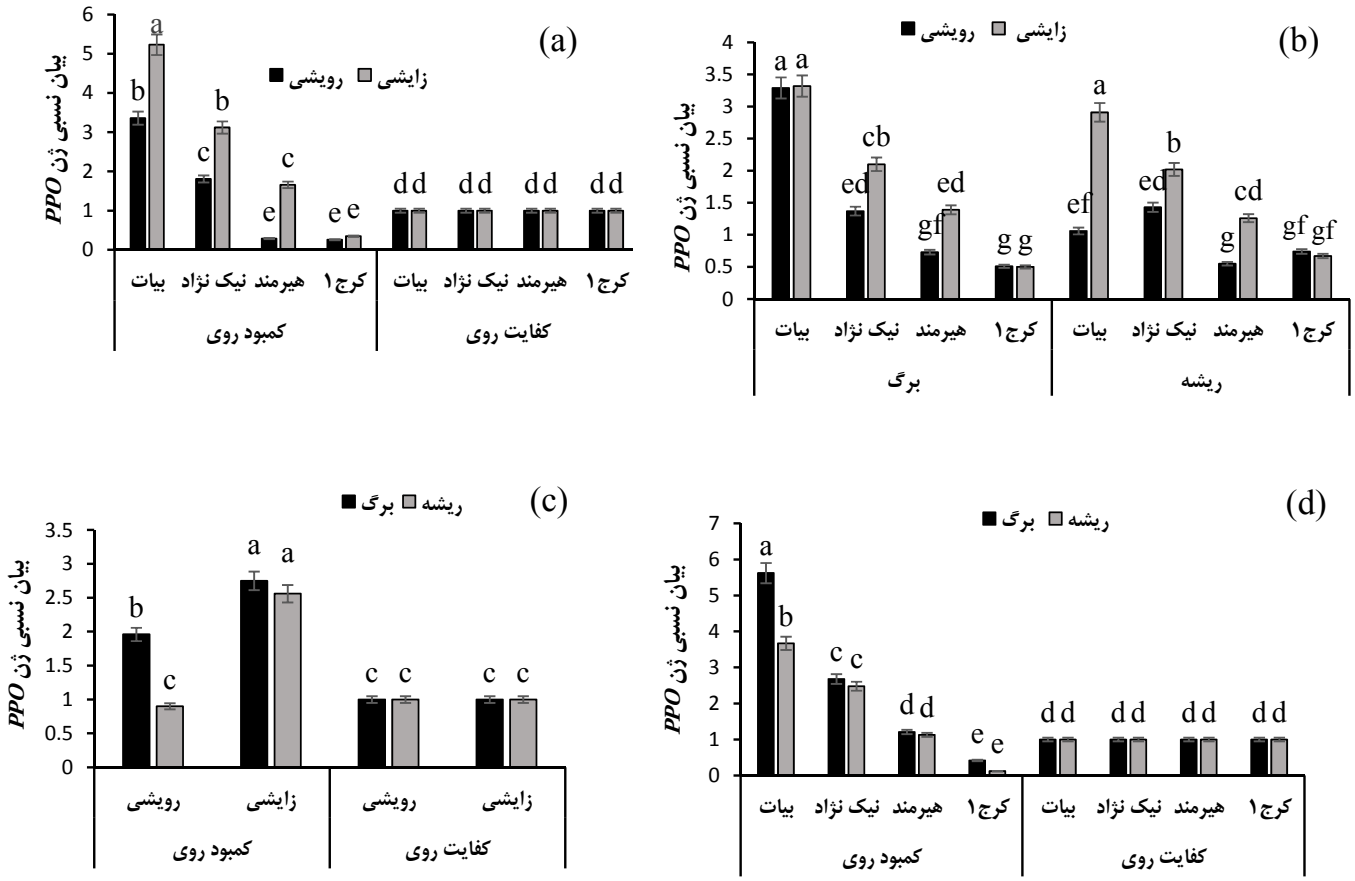
شکل۳- مقایسه میانگین اثر متقابل روی × رقم × مرحله نمونه‌برداری (a) و روی × رقم × بافت (b) بر بیان ژن آسکوربات پراکسیداز(*APX*) در ارقام گندم نان (ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند) کمبود روی: صفر میلی‌گرم روی در کیلوگرم در خاک، کفایت روی: ۵ میلی‌گرم روی در کیلوگرم در خاک.

بیان ژن پلی‌فنل‌اکسیداز: مقایسه میانگین اثرات متقابل روی × رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن پلی‌فنل-اکسیداز نشان داد که بیشترین میزان افزایش بیان این ژن در شرایط کمبود روی در رقم روی-کارا بیات در مرحله زایشی بود (شکل ۴-a). همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن پلی-فنل‌اکسیداز نشان داد که بیشترین میزان بیان این ژن در مرحله رویشی و زایشی در بافت برگ رقم روی-کارای بیات و همچنین در مرحله زایشی در ریشه این رقم مشاهده می‌شود (شکل ۴-b). مقایسه میانگین اثر متقابل روی × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن پلی‌فنل-اکسیداز نشان داد که بیشترین افزایش بیان این ژن در شرایط کمبود روی در مرحله زایشی در برگ و ریشه بود (شکل ۴-c). همچنین بیشترین افزایش بیان این ژن در برگ رقم روی-کارا بیات در شرایط کمبود روی مشاهده شد (شکل ۴-d).

بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان غالباً در معرض شرایط تنش می‌باشند و بنابراین از طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین سلولی و مولکولی به این تنشها پاسخ داده و خود را با شرایط محیطی منطبق و یا نسبت به آن متحمل می‌سازند (۶). به محض درک و تشخیص تغییرات درون سلولی، مسیر های پیام رسانی مختلفی به منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع شده و هریک از آنها بیان یک دسته خاص از ژنهای پاسخ دهنده به تنش را سبب می‌شوند.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل روی × رقم × مرحله نمونه‌برداری (a)، رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری (b)، روی × بافت × مرحله (c) و روی × رقم × بافت (d) بر بیان ژن پلی‌فنل‌اکسیداز(*PPO*) در ارقام گندم نان (ستونهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند) کمبود روی: صفر میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک. کفایت روی: ۵ میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک.

شناسایی این گونه ژنها و تعیین الگوی بیان آنها در پاسخ به انواع تنشها موجب خواهد شد تا درک بهتری از عملکرد آنها در سازگار نمودن گیاهان به انواع تنشها حاصل شود و راهکارهای مؤثری در اصلاح گیاهان جهت بهبود تحمل به تنش ایجاد شود (۱۷). در مطالعه حاضر نیز تنش کمبود روی خاک باعث افزایش بیان ژنهای کدکننده آنزیمهای آنتی اکسیدان مورد مطالعه شد به طوری که بیشترین افزایش بیان ژن کاتالاز در شرایط کمبود روی در مرحله زایشی در ارقام روی-کارا مشاهده شد. آنزیم کاتالاز از دسته پروتئینهای آهن‌دار می‌باشد و هنگامی در سلولهای گیاهی و جانوری وارد عمل می‌شود که مقدار ماده پراکسید هیدروژن در محیط زیاد باشد. کاتالاز سلولها را از تأثیرات پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند. در شرایط عادی حضور کاتالاز در سلولها، می‌تواند تأثیر مهمی در افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو داشته باشد. تولید گونه‌های فعال اکسیژن از مهم‌ترین عوامل آسیب‌رسان به سیستم فتوسنتزی در شرایط تنشهای محیطی از جمله تنش کمبود روی است. افزایش بیان ژن کاتالاز در شرایط کمبود روی

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2

در ارقام روی-کارا در مطالعه حاضر احتمالاً به خاطر نقش آن در کاهش اثرات مضر افزایش پراکسید هیدروژن می-باشد. در گیاه نخودفرنگی نیز نتایج مشابهی مبنی بر کاهش شدید فعالیّت آنزیم کاتالاز در ارقام روی-ناکارا نخودفرنگی در شرایط کمبود روی گزارش شده است (۹و۲۶). در تحقیق دیگری در گیاه برنج گزارش شد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش کمبود روی در ارقام روی-کارا افزایش و در ارقام روی-ناکارا کاهش می-یابد (۲۴). نتایجی نیز مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در شاخساره گیاه گندم در شرایط کمبود فسفر نسبت به شرایط کفایت این عنصر گزارش شده است (۱).

میزان بیان ژن کدکننده آنزیم آسکوربات پروکسیداز نیز در شرایط کمبود روی خاک در مطالعه حاضر در ارقام روی-کارا به ویژه در مرحله زایشی به طور معنی داری افزایش یافت. این افزایش بیان می‌تواند ناشی از نقش کلیدی این آنزیم در حذف H_2O_2 و نقش مهم آن در مدیریت گونه-های فعال اکسیژن در شرایط تنش باشد (۱۶). عنصر روی در بیان ژنهای کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش مهمی دارد (۴ و ۵) و سیستم سمیت‌زدایی آنزیمی در شرایط کمبود این عنصر آسیب می‌بیند. این عنصر برای فعالیت بیشتر آنزیمهای درگیر در سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن از جمله کاتالاز، گلوتاتیون رداکتاز و آسکوربات پراکسیداز مورد نیاز است (۷). بنابراین افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط کمبود روی در ارقام روی-کارا احتمالاً به خاطر قدرت جذب و انتقال بالای روی در شرایط کمبود این عنصر در خاک در این ارقام باشد. در نخودفرنگی و نخود سیاه کاهش فعالیّت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ارقام روی-ناکارا عاملی برای افزایش تجمع آسکوربات و پراکسید هیدروژن در این ارقام گزارش شده است (۱۴ و ۲۴). در گندم گزارش شد این آنزیم با فعالیّت بیشتر در ارقام روی-کارا، دارای قابلیت بیشتری در حذف انواع گونه‌های فعّال اکسیژن می‌باشد (۲۴). در نخودفرنگی گزارش شد که فعالیّت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ارقام روی-کارا نسبت به ارقام روی-ناکارا به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. در نخود سیاه نیز افزایش فعالیّت این آنزیم تحت شرایط کمبود روی گزارش شده است (۱۴). میزان بیان ژن *PPO* نیز در شرایط کمبود روی در ارقام روی-کارا در مرحله زایشی به طور معنی‌داری بیشتر از مرحله رویشی بود. پلی فنل اکسیداز در بیشتر گیاهان عالی یافت می‌شود و وظیفه اصلی آن کاتالیز نوعی کوئینون از فنلهاست. البته هم شرایط رشد (مانند بروز شرایط تنش) و هم نوع ژنوتیپ بر فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز اثر می‌گذارد. افزایش میزان بیان این ژن احتمالاً به دلیل افزایش میزان فنل در شرایط تکمیل رشد گیاه در شرایط تنشی می‌باشد که می‌تواند از گیاه در برابر آسیبهای ناشی از تنش حفاظت کند. در مطالعه اثر کمبود روی و محلول‌پاشی اکسین (IAA) برفعالیت برخی آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در ذرت دانه‌ای گزارش شده است که میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در شرایط کمبود روی افزایش می‌یابد (۱۳). در بررسی فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در برگ و ریشه گیاه برنج در اثر کمبود آهن نیز گزارش شد که میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با کاهش میزان آهن در خاک در ریشه و بخش هوایی گیاه افزایش می‌یابد (۱۶).

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در شرایط کمبود روی میزان بیان نسبی ژن کاتالاز در ارقام روی-کارا در مرحله زایشی بیشتر از رویشی و در برگ بیشتر از ریشه است به طوریکه بیشترین میزان بیان در برگ رقم بیات (۷/۴۷ برابر شاهد) مشاهده گردید. همچنین میزان بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در ارقام روی-کارا در مرحله زایشی در شرایط کمبود روی در رقم بیات ۳/۹ برابر شاهد و در برگ ۶/۴۲ برابر شاهد افزایش یافت. سطح بیان ژن پلی-فنل‌اکسیداز در ارقام روی-کارا به طور معنی‌داری بیشتر از سطح بیان این ژن در ارقام روی-ناکارا بود. به طوری که در رقم بیات هم در برگ و هم در ریشه بیشترین سطح بیان مشاهده شد. همچنین میزان بیان این ژن در مرحله

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2

زایشی به مراتب بیشتر از مرحله رویشی بود. در ادامه این تحقیق پیشنهاد می‌شود ارتباط بین میزان بیان ژنهای کدکننده آنزیمهای کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل-اکسیداز و میزان فعالیت این آنزیمها تحت تنش کمبود روی در گندم نان مطالعه شود. همچنین تأثیر تنش کمبود روی بر بیان ژنهای کدکننده سایر آنزیمهای آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلوتایتون ردوکتاز و پراکسیداز و بررسی تأثیر سایر تنشهای مربوط به ریزمغذیها مثل کمبود آهن و فسفر بر بیان ژنهای کدکننده آنزیمهای آنتی‌اکسیدان می‌تواند دانش این علم از مکانیسم مولکولی مقاومت به این تنش را افزایش و احتمال اصلاح ارقام متحمل به این تنشها را فراهم سازد.

منابع

۱- اسفندیاری، ع.م.، آلیاری، و.، شکیبا، س.، محبوب، ه. (۱۳۸۸). اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی گیاهچه های گندم. مجله دانش کشاورزی، ۱۹(۲): ۱۲۹-۱۳۸.

۲- افشارمحمدیان، م.، انصاری پیری، ز. (۱۳۹۶). تأثیر سطوح مختلف سرما روی پروتئین کل، پرولین و فعالیت برخی از آنتی-اکسیدانهای آنزیمی گیاه استویا. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۰(۲): ۱۲۱-۱۳۲

۳- امینی، ز.، حداد، ر. (۱۳۹۲). نقش رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله زیست-شناسی ایران، ۲۶(۳): ۸۴-۹۲

۴- باغبان طبیعت، س.، رسولی صدقیانی، م.ح. (۱۳۹۱). بررسی کارآیی جذب و مصرف روی در ارقام مختلف گندم در شرایط گلخانه‌ای. علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای، ۳ (۲): ۱۷-۳۲.

۵- خاکسار، غ.، خوش‌گفتارمنش، ا.، قاسمی، س.، طباطبایی، ب. (۱۳۹۴). سطح بیان پروتئینهای ناقل ZIP1 و ZIP5 در ریشه و برگ سه رقم گندم با روی - کارایی متفاوت. فرآیند و کارکرد گیاهی، ۴ (۱۱): ۲۳-۳۱.

6- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiology 107: 1049-1054.

7- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 53(372): 1331-1341.

8- Bahari N, Bahari Bighdilu B, karpisheh L (2013) Evaluation of drought tolerance of bread wheat genotypes by stress and sensitivity tolerance indices. Annals of Biological Research 4(1): 43-47.

9- Bushuk W, Rasper VF (1994) Wheat: production, properties and quality. Springer Science and Business Media.

10- Cakmak I, Marschner H (1988) Enhanced superoxide radical production in roots of zinc deficient plants. Journal of experimental Botany 39: 1449-1460.

11- Chen WR, Feng Y, He ZL, Yang XE (2009) Zinc efficiency is correlated with root morphology, ultrastructure, and antioxidative enzymes in rice. Journal of Plant Nutrition 32(2): 287-305.

12- Cole CR, Grant FK, Jacques A, Northrop-Clewes CA, Swaby-Ellis ED, Smith JL, Ziegler TR (2010) Zinc and iron deficiency and their interrelations in low-income African American and Hispanic children in Atlanta. Journal of Clinical Nutrition 91(4): 1027-1034.

13- Espin JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ (2000) Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(3): 648-656.

14- Cakmak I, Erenoglu B, Nikolic M, Römheld V (2002) Uptake and transport of foliar applied zinc (65 Zn) in bread and durum wheat cultivars differing in zinc efficiency. Plant and Soil 241(2): 251-257.

15- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48(12): 909-930.

16- Gupta B, Pathak GC, Pandey N (2011) Induction of oxidative stress and antioxidant responses in *Vigna mungo* by zinc stress. Journal of Plant Physiology 58(1): 85-91.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2

17- Cobbett CS, Haydon MJ (2007) Transporters of ligands for essential metal ions in plants. New Phytologist 174(3): 499-506.

18- Kasim WA (2007) Physiological consequences of structural and ultra-structural change sinduced by Zn stress in Phaseolus vulgaris.I. Growth and Photosynthetic Apparatus 3(1):15-22.

19- Babajanov AV, Khavarinejad MS (2011) Identification of relationships of quantitative and morphological traits to spring wheat genotype yields in drought levels of Mazandaran (north of Iran). Journal of AgriScience 1(6): 329-339.

20- Arora SK, Gandhi SK, Joshi UN, Luthra YP (1988) Total phenols and their oxidative enzymes in sorghum leaves resistant and susceptible to Ramulispora sorghicola Harris. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 23(3): 393-399.

21- Harel E, Maye AM (1991) Phenol oxidases and their significance in fruit and vegetables. Food Enzymology 1: 373-398.

22- Ghalichechi S, Mirzamasoumzadeh B, Karimi M, Salami M, Mohseni AB (2013) The study of wheat genotypes is planted in Ardabil using multivariate statistical methods. Journal of Farming and Allied Sciences 2 (8): 188-189.

23- Breusegem F, Gollery M, Mittler R, Vanderauwera S, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science 9: 490–498.

24- Nakabayashi R, Saito K (2015) Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. Current Opinion in Plant Biology 24: 10-16.

25- Fover CH, Noctor G (1998) Ascorbat and Glutatione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology 42: 249-279.

26- Gupta B, Pandey N, Pathak GC (2012) Antioxidant responses of pea genotypes to zinc deficiency. Russian Journal of Plant Physiology 59(2): 198-205.

27- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany 1-26.

28- Shi X, Su-nan X, Yue L, Zhong-lin CH, (2013) Impacts of zinc, benzo [a] pyrene, and their combination on the growth and antioxidant enzymes activities of wheat (*Triticum aestivum* L.*)* seedlings. Journal of Ecology 32(2): 358-362.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.5.2

Expression profile of catalase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase encoding genes under soil Zn deficiency in bread wheat

Rahimi Jarihani L. and Abdollahi Mandoulakani B.

Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran.

Abstract

A factorial experiment (based on completely randomized design) with three replications was conducted in greenhouse to investigate the effect of soil Zn deficiency on the genes expression of antioxidant enzymes catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and polyphenol oxidase (PPO) in Zn-efficient and -inefficient bread wheat cultivars. Bayat and Niknejad (Zn-efficient) and Hirmand and Karaj 1 (Zn-inefficient) cultivars were grown under soil Zn deficiency and normal conditions. The expression levels of three above-mentioned genes were measured using Real time PCR technique in leaf and root of the cultivars at two growth stages: one month after germination (vegetative) and 30% of heading (reproductive). The results of variance analysis and mean comparison of treatments showed that the highest rate of *CAT* expression (5.74 fold) observed in Zn-efficient cultivars (Bayat and Niknejad) at reproductive stage under soil Zn deficiency conditions. Moreover, the expression levels of *CAT* and *APX* in leaves of Zn-efficient cultivars were more than those of inefficient cultivars under soil Zn deficiency. The highest expression level of *PPO* (5.62 fold) was obtained in the leaves of Bayat (Zn-efficient) cultivar under Zn deficiency conditions. Therefore, the results of the current study proposed the possible roles of the genes encoding three studied antioxidant enzymes in tolerance of Zn-efficient bread wheat cultivars against soil Zn deficiency.

Key words: Catalase enzyme, Ascorbate peroxidase enzyme, gene expression, bread wheat