نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۴ شمارهٔ۱، صفحهٔ ۵۰-۴۳، نیمهٔ اول۱۳۹۲

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 4, No. 1, 2013, p. 43-50

مطالعهٔ بیان ژن *Cu/znSOD* و فعالیت آنزیم SOD در ژنوتیپ‌های نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش خشکی

سیدرضا هاشمی[1*]، سعید ملک‌زاده شفارودی[2]، سیدحسن مرعشی[2] و علی گنجعلی[3]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۲- به‌ترتیب استادیار و دانشیار گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۱۸

چکیده

نخود عمدتاً در نظام‌های کشاورزی مناطق خشک و نیمه‌خشک کشت می‌شود و تنش خشکی، عامل اصلی محدودکنندهٔ عملکرد این گیاه محسوب می‌شود. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر تنش خشکی بر روی بیان ژن *Cu/znSOD* با استفاده از تکنیک Real time PCR اجرا شد. برای نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانگی *Elongation factor* استفاده شد و با روش اندازه‌گیری نسبی، داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای یافتن رابطه محتمل بین سطح مولکولی و فیزیولوژیک اثرات تیمارها، میزان پروتئین کل محلول برگی و همچنین میزان فعالیت آنزیم SOD (EC: 1.15.1.1) اندازه‌گیری شد. تنش رطوبتی با ۳۰درصد ظرفیت زراعی در مرحلهٔ گلدهی اِعمال گردید و نمونه‌برداری در سه زمان قبل از تنش، ۴۸ساعت بعد از تنش و ۲۴ساعت بعد از آغاز دورهٔ بازیابی‌گیاه، صورت گرفت. این تحقیق با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. نتایج آنالیز داده‌های Real time PCR حاکی از آن بود که بیان ژن *Cu/znSOD* در ژنوتیپ متحمل بین‌المللی (MCC877)، نسبت به دو ژنوتیپ کاندیدای متحمل (MCC696) و ژنوتیپ حساس (MCC759) در شرایط کنترل، بیشتر بود ($P< 0.05$). مطابق با برخی از نتایج مطالعات گذشته، میزان بیان ژن *Cu/znSOD* نسبت به شاهد، در زمان بعد از تنش خشکی کاهش داشت و در دورهٔ بازیابی گیاه نسبت به شاهد، روند افزایشی پیدا کرد. اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های کُل محلول برگی و همچنین فعالیت آنزیم SOD تحت تیمارهای خشکی و SA نسبت به شرایط کنترل، تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، نخود زراعی، *Cu/znSOD*، SOD

مقدمه

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی خودگرده‌افشان، یک‌ساله، دیپلوئید (n2=x2=۱۶) و دارای ژنوم کوچک (Mb 740) است (Roorkiwal & Sharma, 2012). نخود با تولید جهانی معادل ۸میلیون‌تُن، سومین حبوبات مهم دنیا می‌باشد. این گیاه همچنین جایگاه نخست آسیا و مناطق شمال آفریقا را دارا می‌باشد (Malhorta & Saxena, 2002). نخود، یک لگوم سرمادوست است که می‌تواند در مناطق گرمسیری نیمه‌خشک کشت‌وکار شود. انتشار این محصول در منطقه مدیترانهٔ کهن، بین مراکش در غرب تا هیمالیا در شرق، گزارش شده است. درحال‌حاضر، نخود در بیش از ۴۰کشور جهان کشت‌وکار می‌شود (Parsa & Bagheri, 2007).

بذر نخود به‌دلیل داشتن ۲۰ تا ۳۰درصد پروتئین، ۴۰درصد کربوهیدرات و ۳ تا ۶درصد روغن، از گیاهان مهم در کشاورزی محسوب می‌شود. نخود، اغلب در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان تحت شرایط دیم کشت می‌شود؛ بنابراین تنش خشکی مهم‌ترین عامل محدودکنندهٔ عملکرد، به‌شمار می‌رود (Millan *et al*., 2006).

در ایران، نخود معمولاً در مناطقی کشت می‌شود که رطوبت خاک در انتهای فصل رسیدن گیاه، محدودکنندهٔ تولید است و گیاه با خشکی انتهای فصل مواجه می‌شود. در چنین مناطقی سازوکارهای کارآمد مرتبط با ریشه و اندام هوایی در ثبات عملکرد موثر خواهند بود. به‌طورکلی در برنامه‌های اصلاح کلاسیک برای مقاومت به خشکی دو روش مورد توجه است. روش اول، یک روش تحلیلی است که گزینش بر اساس صفات مقاومت به خشکی انجام می‌شود و دوم، روش تجربی است که در این روش گزینش بر اساس عملکرد دانه انجام می‌شود. استفاده توأم از این دو روش برای گزینش ارقام و ژنوتیپ‌های

* **نویسنده مسئول:** اسفراین، خیابان شهیدمنفردی۷، پلاک۶۳. کُد پستی: ۹۶۶۱۹۷۶۴۴۳، همراه: ۰۹۱۵۸۸۴۷۲۷۸، تلفن: ۰۵۸۵۷۲۲۷۲۱۸
rhashemi83@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

متحمل به خشکی منجر به حصول نتایج مؤثرتری خواهد شد (Parsa & Bagheri, 2007). تنش خشکی به‌وسیلهٔ تغییر فعالیت آنزیم‌ها و تغییر در نرخ فتوسنتز گیاه و وضعیت آب برگ، باعث کاهش رشد گیاه می‌شود. برگ‌ها حساس‌ترین اندام گیاه نسبت به سایر اندام‌ها در تنش خشکی می‌باشند. کاهش رشد برگ و در نتیجه کاهش تعرق، یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مواجههٔ گیاهان با خشکی است (Jaleel *et al.*, 2007).

تنش‌های غیرزیستی از طریق ایجاد تغییراتی در مسیر متابولیسم کربوهیدرات‌ها بر افزایش یا کاهش سطح بیان ژن‌های مربوطه، اثرگذار می‌باشند (Gupta & Kaur, 2005) بنابراین باعث القای بیان و یا ممانعت از بیان ژن‌های خاصی می‌شوند (Kasuga *et al.*, 1999)، لذا شناسایی ژن‌های کاندیدای مربوطه درلاین‌های متحمل و حساس به کمک ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها در حالت اِعمال تنش نسبت به حالت بدون تنش، برای اجرای برنامه‌های افزایش مقاومت گیاه نخود زراعی به تنش خشکی می‌تواند نقطهٔ آغاز بسیارمناسبی باشد. مطالعهٔ واکنش این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های مورد بررسی به اِعمال تنش خشکی، با هدف انتخاب برای ژنوتیپ‌های متحمل صورت می‌گیرد و همچنین معرفی ژن‌های مؤثر در مقاومت به تنش خشکی، می‌تواند نقطهٔ شروعی برای تولید گیاهان تراریخته باشد.

تحقیق حاضر به تفاوت بیان ژن *Cu/znSOD*، کُدکنندهٔ آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، که اولین سدّ دفاعی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن است، می‌پردازد. در این تحقیق با استفاده از تکنیک Real time PCR میزان بیان ژن تحت شرایط تنش خشکی و بدون خشکی در سه ژنوتیپ منتخب گیاه نخود زراعی اندازه‌گیری شده است. مطالعهٔ بیوشیمیایی در جهت ارتباط احتمالی نتایج مولکولی و بیوشیمیایی نیز صورت گرفت. از آنجایی که محصول نهایی ژن مورد مطالعه در این تحقیق، آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز است، لذا جهت شناسایی ارتباط احتمالی سطح بیان ژن با فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، فعالیت آنزیم مذکور نیز اندازه‌گیری شد. برای آنالیز داده‌های حاصل از فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز که توسط دستگاه اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری شد، میزان پروتئین کُلّ محلول برگی نیز توسط دستگاه مذکور بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طرح آزمایشی

جهت بررسی میزان بیان ژن *Cu/znSOD* تحت شرایط تنش خشکی و ارتباط احتمالی میزان بیان این ژن با میزان فعالیت آنزیم SOD تحت شرایط مذکور، سه ژنوتیپ مختلف شامل ژنوتیپ متحمل بین‌المللی (MCC877)، ژنوتیپ کاندیدای متحمل (MCC696) و ژنوتیپ حساس (MCC759) انتخاب و بذور آنها از بانک بذر پژوهشکدهٔ علوم گیاهی دریافت شد. این MCC877 با نام بین‌المللی ICC4958، به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ نخود به تنش خشکی شناخته می‌شود (Millan *et al.*, 2006). این ژنوتیپ، دارای تیپ دسی بوده و سایر ژنوتیپ‌های انتخابی، تیپ کابلی داشتند. دو لاین MCC696 و MCC759، به‌ترتیب ژنوتیپ‌های‌کاندیدای بومی متحمل و حساس معرفی شده بودند (Ganjeali *et al.*, 2011). در آزمایش‌های مذکور، شاخص‌های کمّی مقاومت و حساسیت به تنش خشکی محاسبه شده و از نتایج آنها در انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب برای تحقیق جاری بهره گرفته شد. ژنوتیپ MCC696 که از نظر شاخص‌های مقاومت و پاسخ به خشکی از سایرین برتر بود، به‌عنوان کاندیدای مقاومت به خشکی و ژنوتیپ MCC759 با دارابودن ضعیف‌ترین شاخص‌ها از قبیل شاخص‌های کمّی مقاومت و حساسیت به تنش خشکی، به‌عنوان کاندیدای حساسیت نسبت به تنش خشکی معرفی شدند (Ganjeali *et al.*, 2011).

خاک مورد استفاده برای کشت، با نسبت مساوی از مخلوط خاک‌برگ، ماسهٔ بادی سرندشده و خاک باغچه تهیه شد. به‌دلیل این‌که مسیرهای پاسخ سیگنال‌های خشکی و شوری در بسیاری از موارد همپوشانی دارند، نمونه‌ای از خاک برای تعیین هدایت الکتریکی (EC) در گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی مورد آزمایش قرار گرفت. از آن جایی که EC بیش از ۴۰۰۰میلی زیمنس، شور محسوب می‌شود و نتیجهٔ آزمایش ۴۷۰۰میلی زمینس تعیین شد، بنابراین خاک پس از توزیع در گلدان‌ها و پیش از کاشت، چندبار مورد آبشویی سنگین قرار گرفت تا EC آن به حد متعادل برسد. جهت کاشت از ۹۰گلدان مشابه استفاده شد که مجموع وزن هر گلدان با خاک، سه‌کیلوگرم بود. در هر گلدان، پنج بذر به‌طور یکسان در تمامی تیمارها کشت شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به‌اجرا درآمد. سه ژنوتیپ نخود در دو سطح تنش خشکی به‌ترتیب شامل ۸۰درصد ظرفیت زراعی (شاهد بدون تنش) و ۳۰درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی)، و زمان نمونه‌برداری از برگ‌ها در سه‌سطح شامل قبل از تنش، ۴۸ساعت بعد از اِعمال تنش و ۲۴ساعت بعد از آغاز دورهٔ بازیابی، مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از سبزشدن گیاهان در هر گلدان، بوته‌ها در اوایل

Archive of SID

www.SID.ir

مرحلهٔ رشد سریع و قبل از گل‌دهی، تُنک شده و به یک‌بوته در هر گلدان کاهش یافت. این آزمایش در سال ۱۳۹۰ انجام شد.

در تحقیق جاری، اِعمال تنش خشکی بر اساس ظرفیت زراعی صورت گرفت، پیش از کاشت، ظرفیت زراعی به‌صورت دقیق اندازه‌گیری شد. برای این کار از پنج‌گلدان که آنها نیز با خاکِ تهیه‌شده جهت کاشت، پُر شده بودند و وزن دقیق آنها به سه‌کیلوگرم (W1) رسیده بود، استفاده شد. این گلدان‌ها به‌صورت کاملاً اشباع، آبیاری‌شدند، به‌صورتی‌که آب، روی سطح خاک ایستاده و از سوراخ‌های کف گلدان خارج شد و برای ممانعت از تبخیر به‌صورت سرپوشیده، در محیط سایه قرار گرفتند. وزن آنها پس از گذشت ۲۴ساعت، مجدداً تعیین شد. به‌علت بالابودن رطوبت نسبی گلخانه، توزین در ساعات ۴۸ و ۷۲ساعت نیز صورت گرفت، تا زمانی‌که آب ثقلی کاملاً خارج و وزن گلدان‌ها (W2) ثابت شد. تفاضل دو عدد میزان رطوبت گلدان، درصد ظرفیت زراعی می‌باشد. پنج گلدان به‌منزلهٔ پنج تکرار برای تعیین ظرفیت زراعی می‌باشند که برای کاهش خطا در تعیین ظرفیت زراعی، از میانگین اعداد حاصل از آنها استفاده شد. تنش خشکی که در این آزمایش اِعمال شد، معادل ۳۰درصد ظرفیت زراعی در نظر گرفته شد. اعمال تنش خشکی به گیاهان، در مرحلهٔ گلدهی صورت پذیرفت. پیش از اِعمال تنش خشکی، گلدان‌ها توزین شده و وزن آنها به‌صورت ثابت در حالت ۸۰درصد ظرفیت زراعی نگه داشته شد.

بررسی ترانس‌کریپتومی ژن *Cu/znSOD* در ژنوتیپ‌های مختلف گیاه نخود تحت شرایط تنش خشکی

نمونه‌برداری از گیاهان، در سه مرحلهٔ مختلف شامل پیش از اِعمال تنش با ظهور گل‌ها در هر ژنوتیپ، ۴۸ساعت بعد از اِعمال تنش و ۲۴ساعت بعد از آغاز دورهٔ بازیابی گیاه، صورت گرفت. دو برگ مرکب ما قبل آخر، به‌وسیلهٔ قیچی از گیاه جدا شد و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها به فریزر ۸۰-درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج RNA

از نمونه‌های فریزشده با روش سیترات سدیم، RNA استخراج شد (Sanchez & Carbajosa, 2008).

حذف DNA با تیمار DNase

به‌منظور حصول RNA خالص، RNAهای استخراج‌شده با استفاده از آنزیم DNase 1 شرکت Fermentas (USA, 2001)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورد تیمار قرار گرفتند.

تعیین غلظت و کیفیت RNA با نانودراپ

جهت تعیین غلظت و کیفیت نمونه‌های RNA، نانودراپ (Nanodrop 2000 spectrophotometer) نمونه‌ها با نسبت‌های ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ انجام شد. غلظت داده‌شده توسط دستگاه، برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز رشته مکمل cDNA

به‌منظور سنتز cDNA از کیت Fermentas (USA, 2000) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

طراحی آغازگر

برای طراحی آغازگر مناسب از توالی mRNA ی ژن SOD مربوط به *Cicer arietinum* (AJ012739) با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 5 استفاده شد. ژن خانگی *Elongation factor* (AJ004960.1) به‌عنوان ژن کنترل داخلی در سنجش بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت (جدول۱).

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده

Table 1. Primers used in this study

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer sequence	اندازه محصول Product size	دمای اتصال Annealing temperature
Cu/zn SOD-F	5TAACTTCAGTCAGGAGGGAG3´	277bp	47
Cu/zn SOD-R	GGAGTTTGGTCCAGTGAGA35		
Elongation factor-F	5CTCCAAGGATGACCCTGCTAA3´	101bp	47
Elongation factor-R	CGAGGACTGGGGCATAACC35		

Archive of SID
www.SID.ir

تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن *Cu/znSOD* با استفاده از Real time PCR

در این آزمایش به‌منظور نرمال‌کردن داده‌ها، از ژن خانگی *Elongation factor* به‌صورت کنترل درونی استفاده شد. برای انجام Real time PCR از آغازگرهای اختصاصی جدول۱ برای تکثیر ژن هدف و ژن خانه‌دار استفاده شد. برنامهٔ حرارتی مطابق جدول۲ به دستگاه داده شد. اجزای واکنش به‌صورت مسترمیکس سایبرگرین ۱۲/۵ میکرولیتر، آغازگر رفت‌وبرگشت هر کدام ۰/۵میکرولیتر، نمونه cDNA ۲/۵میکرولیتر، آب دوبار تقطیر ۹میکرولیتر و در حجم کل ۲۵میکرولیتر آماده شد.

جدول۲- چرخه دمایی واکنش Real time PCR
Table 2. Reaction temperature cycle in Real time PCR

چرخه Cycle	زمان Time	دما Temperature (°C)	مرحله Stage
1	10 min	95	واسرشت اولیه (Primary denature)
40	15 s	95	واسرشت ثانویه (Secondary denature)
	30 s	47	اتصال (Annealing)
	30 s	72	بسط (Extension)
1	7 min	72	بسط نهایی (Final extension)

در نهایت، محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک‌درصد مشاهده شدند تا از تکثیر اختصاصی ژن با اندازه موردنظر اطمینان حاصل گردد. از آنجایی که ژن موردنظر دارای اینترون می‌باشد، با توجه به تفاوت اندازهٔ محصول cDNA و DNA پس از روی‌ژل‌بُردن محصولات PCR، عدم آلودگی cDNA به DNA ژنومی تأیید شد. واکنشReal time PCR در۴۰چرخه و حجم نهایی۲۰میکرولیتر در دستگاه ABI PRISM 7300 Real time Amplification Thermal Cycling System صورت گرفت. با استفاده از فرمول ΔΔ CT تغییرات بیان ژن نسبت به نمونه‌های شاهد محاسبه گردید.

برای cDNAی مربوط به هر آزمایش، سه تکرار تکنیکی گذاشته شد که این تکرارها در آزمون آماری مورد استفاده قرار گرفتند. سپس داده‌ها با آزمون توکی در نرم‌افزارJMP4 در سطح معنی‌داری ۵درصد، مقایسه میانگین شد.

روش استخراج و سنجش پروتئین‌های محلول در بافت گیاهی

پروتئین‌های محلول (سیتوپلاسمی) با کمک بافر فسفات پتاسیم ۰/۱مولار (pH=۷/۴) در دمای ۴-۰درجهٔ سانتی‌گراد با نسبت w/v (1:20) استخراج شدند. مقدار پروتئین در طول موج۶۶۰نانومتر با کمک اسپکتروفتومتر و به‌روش (Lowry, 1951) اصلاح‌شده، اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با کمک آلبومین سرم گاوی رسم گردید و در نهایت غلظت پروتئین بر حسب گرم در۱۰۰گرم وزن تر نمونهٔ گیاهی محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم از روش (Beauchamp & Fridovich, 1971) استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰نانومتر انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش‌های بیوشیمیایی، از نرم‌افزارهای Excel و JMP استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح معنی‌داری $P< 0.05$ صورت گرفت.

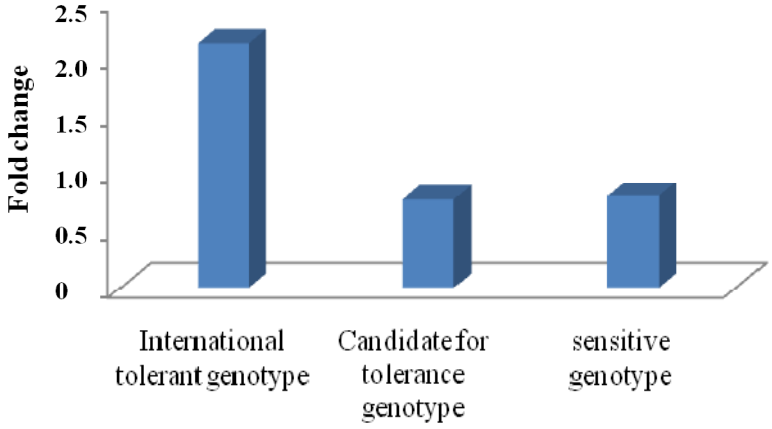
نتایج و بحث

بررسی اثر ژنوتیپ در میزان بیان ژن *Cu/znSOD*

در تحقیق حاضر تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *Cu/znSOD* بین ژنوتیپ متحمل بین‌المللی و دو ژنوتیپ حساس به خشکی و کاندیدای متحمل دیده شد. در شرایط کنترل، بیان ژن مذکور در ژنوتیپ متحمل بین‌المللی نسبت به دو ژنوتیپ دیگر بیشتر بود (شکل ۱). از آنجایی‌که ژن *Cu/znSOD* یک ژن پُراهمیت در تنش خشکی محسوب می‌شود، افزایش بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل بین‌المللی که یک ژنوتیپ مقاوم به خشکی است، دور از انتظار نبود. احتمالاً

Archive of SID
www.SID.ir

این نتیجه مؤید این مطلب است که ژنوتیپ متحمل بین‌المللی، در شرایط نرمال، سطح بیان ژن *Cu/znSOD* را برای مقابله با تنش خشکی، بالا نگه می‌دارد.



شکل۱- بیان نسبی ژن *Cu/znSOD* در سه ژنوتیپ در شرایط کنترل

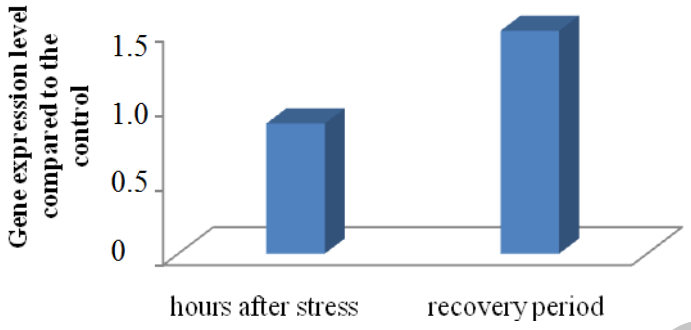
Fig. 1. Relative gene expression of *Cu/znSOD* in three genotypes in control condition

بررسی اثر تنش خشکی و زمان نمونه‌برداری در بیان ژن *Cu/znSOD*

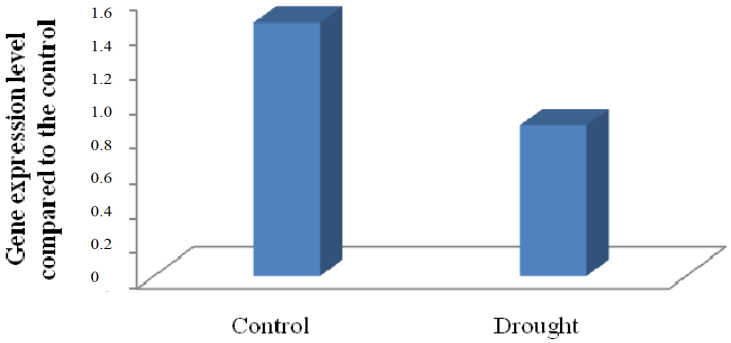
در شرایط تنش خشکی، روزنه‌ها متعاقب افزایش غلظت ABA در سلول‌های مزوفیل برگ، بسته می‌شوند و به‌دنبال آن، غلظت CO_2 در بافت مزوفیل کاهش می‌یابد. در این شرایط، واکنش‌های تاریکی فتوسنتز متوقف شده و محصولات حاصل از واکنش‌های روشنایی (ATP و NADPH)، مصرف نمی‌شوند. در چنین شرایطی به‌دلیل عدم اکسیداسیون مولکول NADPH، مصرف NADP+ جهت دریافت الکترون کاهش می‌یابد. بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیرهٔ انتقال الکترون به‌عنوان پذیرندهٔ الکترون عمل می‌کند و رادیکال آزاد سوپر اکسید تولید می‌شود (Sairam & Saxena, 2000) . این گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان پیام‌رسان، در مسیر انتقال پیام تنش‌های غیرزیستی ایفای نقش می‌کنند. در ساعات اولیه تنش که سطح بیان فاکتورهای رونویسی بالاست، احتمالاً این فاکتورهای رونویسی، باعث افزایش بیان ژن‌های تأخیری که در ارتباط با تنش خشکی از جمله *Cu/znSOD* هستند، می‌شوند. افزایش پروتئین‌های پاسخ به تنش در نتیجهٔ بیان ژن‌های مرتبط، احتمالاً مهار پس‌نورد را به‌دنبال خواهد داشت که در نتیجهٔ آن، بیان ژن‌های فاکتورهای رونویسی مانند دهیدرین‌ها، کاهش خواهد یافت. کاهش بیان ژن‌های فاکتورهای رونویسی، احتمالاً کاهش بیان ژن‌های تأخیری از جمله *Cu/znSOD* را در ساعت‌های بعدی تنش، به‌دنبال خواهد داشت.

احتمالاً فاکتورهای رونویسی که بیان ژن‌های تأخیری ازجمله *Cu/znSOD* را کنترل می‌کنند، در ساعات اولیهٔ تنش افزایش بیان دارند و روند کاهشی را در ساعات بعدی، در پی خواهند داشت. ارتباط بین دهیدرین‌ها و ژن *Cu/znSOD* توسط تحقیقات قبلی تأیید شده است (Uno *et al.*, 2000; Jiang & Zhang, 2002) . در این تحقیق نیز بیان ژن *Cu/znSOD* در زمان ۴۸ساعت بعد از تنش خشکی نسبت به شاهد،کاهش پیدا کرد و در دورهٔ بازیابی گیاه روند افزایشی نشان داد (شکل ۲). نتایج تحقیق روی برگ‌های گیاه *Kentucky bluegrass* در رابطه با بیان ژن *Cu/znSOD* در سه زمان نمونه‌برداری قبل از تنش، ۴۸ساعت بعد از تنش و دورهٔ بازیابی گیاه منطبق با نتایج این تحقیق بود (Bian & Jiang, 2009). همچنین Nistal *et al*, (2002) نشان دادند که تیمار خشکی در گیاه نخود باعث کاهش بیان ژن *Cu/znSOD* شده است. در این تحقیق نیز منطبق با نتایج این پژوهشگران، تیمار تنش خشکی باعث کاهش بیان ژن *Cu/znSOD* شد (شکل ۳).

www.SID.ir



شکل۲- بیان نسبی ژن *Cu/znSOD* در زمان‌های نمونه‌برداری ۴۸ساعت بعد از تنش خشکی و ۲۴ساعت بعد از دورهٔ بازیابی
Fig. 2. Relative gene expression of *Cu/znSOD* in sampling times of 48 hours after drought stress and 24 hours after recovery period



شکل۳- بیان نسبی ژن *Cu/znSOD* در شرایط تنش خشکی (۴۸ساعت بعد از تنش) نسبت به کنترل
Fig. 3. Relative gene expression of *Cu/znSOD* in drought stress condition (48 hours after stress) than control

بررسی اثر تنش خشکی روی میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و پروتئین کل محلول برگی

تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نداشت. این نتیجه منطبق با نتایج Nistal *et al*, (2002) بود. آنها اعلام کردند که تحت تنش خشکی، فعالیت آنزیم SOD تغییر نکرد. همچنین Bian & Jiang (2009) گزارش کردند که فعالیت آنزیم SOD در برگ‌ها بدون تغییر ماند که این نتیجه نیز منطبق با نتایج این تحقیق بود.

برخی از تحقیقات برخلاف نتایج مذکور، اعلام کردند که تنش خشکی در مرحلهٔ گلدهی نخود باعث کاهش فعالیت آنزیم SOD می‌شود (Rahbarian, 2011). برخلاف این گزارش، Diaz *et al,* (2005) و Jaleel *et al,* (2007) افزایش فعالیت آنزیم SOD تحت تنش خشکی را گزارش کردند.

با این اوصاف، این فرضیه که پاسخ آنزیم SOD به تنش رطوبتی متغیر است، تقویت می‌شود. این فرضیه در برخی دیگر از تحقیقات (Nistal *et al.*, 2002) گزارش شده است.

میزان پروتئین‌های کُل محلول برگی تحت تیمار تنش خشکی، معنی دار نشد. این نتایج با برخی از نتایج تحقیقات گذشته همخوانی نشان داد. Rahbaarian (2011) اعلام کرد که پروتئین کل محلول برگی در ژنوتیپ MCC877 در شرایط تنش خشکی و بدون تنش، تغییر معنی‌داری نداشته است.

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کـه محصـول ژن *Cu/znSOD* است، به‌عنوان اولین خط دفاعی در برابر گونه‌های فعـال اکسـیژن ناشی از تنش‌های غیرزیستی، ایفای نقـش مـی‌کنـد. لـذا در ایـن تحقیـق، واکـنش اولـین خـط دفـاعی گیاهـان در سیسـتم‌هـای آنتی‌اکسیدان مورد بررسی قرار گرفـت. بیـان ژن *Cu/znSOD* در شرایط کنترل، در ژنوتیپ متحمل بین‌المللی نسبت به دو ژنوتیـپ کاندیدای متحمل و ژنوتیپ حساس، بیشتر بود. از آنجایی‌کـه ایـن ژن، یک ژن پُراهمیت در تنش خشـکی محسـوب مـی‌شـود، لـذا افزایش بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل بین‌المللی که یک ژنوتیپ مقاوم به خشکی اسـت، دور از انتظـار نبـود. بـر اسـاس بعضـی از تحقیقات گذشته نیز این ژن در زمان‌های قبل از تنش، ۴۸سـاعت بعد از تنش و دورهٔ بازیابی گیاه، میزان بیان متفاوتی را نشـان داده بود. در نتایج تحقیقات حاضر نیز در زمان ۴۸ساعت بعد از تـنش خشکی، میزان بیان این ژن نسبت به شـاهد کـاهش داشـت و در دورهٔ بازیابی گیاه، روند افزایشی نسبت به شاهد پیدا کرد.

منابع

1. Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acryl amide gels. Annu. Biochem. 44: 276-287.
2. Bian, S., and Jiang, Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of *Kentucky bluegrass* in response to drought stress and recovery. Scientia Horticulturae 120: 264-270.
3. Diaz, P., Monza, J., and Marquez, A. 2005. Drought and saline stress, Lotus japonicus, Handbook 39-50.
4. Ganjeali, A., Porsa, H., and Bagheri, A. 2011. Assessment of Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasms for drought tolerance. Agricultural Water Manangement 98: 1477-1484.
5. Gupta, A., and Kaur, N. 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. J. Biosci. 30: 761-776.
6. Jaleel, C., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., and Panneerselvam, R. 2007. Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *Catharanthus* roseus is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. Colloids Surf B Biointerfaces 60: 201-206.
7. Jiang, M., and Zhang, J. 2002 . Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. J. Exp. Bot. 53: 2401-2410.
8. Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotechnology 17: 287-291.
9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randapp, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biological Chemistry 191: 265-275.
10. Malhorta, R.S., and Saxena, M.C. 2002. Strategies for overcoming drought stress in chickpea, ICARDA Caravan 17: 20-22.
11. Millan, T., Clarke, H.J., Siddique, K.H.M., Buhariwalla, H.K.B., Gaur, P.M., Kumar, J., Gil, J., Kahl, G., and Winter, P. 2006. Chickpea molecular breeding, new tools and concepts. Euphytica 147: 81-103.
12. Nistal, J.H., Dopico, B., and Labrador. 2002. Cold and salt stress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. Plant Science 163: 507-514.
13. Parsa, M., and Bagheri, A. 2007. Pulses. Publications Mashhad University Jihad. p. 65 & 106.
14. Rahbarian, R. 2011. Morphological and physiological and biochemical markers for evaluating the achievement of drought tolerant genotypes of chickpea. Ph.D. Thesis. Tarbiat Moallem University. p. 182 & 152.
15. Roorkiwal, M., and Sharma, P.C. 2012. Sequence similarity based identification of abiotic stress responsive genes in chickpea. Bioinformation 8: 92-97.
16. Sairam, R.K., and Saxena, D.C. 2000. Oxidative stress and antioxidant in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science 184: 55-61.
17. Sanchez. L.O., and Carbajosa, J.V. 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana* including seeds and siliques. Biomed Centerl. 1: 93.
18. Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 11632-11637.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of gene expression pattern of *Cu/znSOD* and SOD enzyme activity under drought treatment in tolerant and sensitive lines of Chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Hashemi[1*], S.R., Malekzadeh Shafaroudi[2], S., Marashi[2], S.H. & Ganjeali[3], A.

1. MSc. Student of Biotechnology and Plant Breeding, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad
2. Faculty members of Biotechnology and Plant Breeding Department, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad
3. Department of Biology, College of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran; ganjeali@um.ac.ir

Received: 22 August 2012
Accepted: 8 May 2013

Abstract

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is mainly cultivated in arid and semi-arid agricultural systems. Drought stress is a major factor delimiting maximum yield. This research evaluated the effects of drought stress treatments on expression of *Cu/znSOD* as a gene involving in drought tolerance by Real time PCR technique. To find the probable relationship between the molecular and physiological effects of treatments, total soluble leaf protein and enzyme activity of SOD (EC: 1.15.1.1) were measured. Drought stress was applied by 30% of field capacity in flowering stage. Sampling was arranged on three times; pre stress, 48 hours after stress and 24 hours after recovery period. This study conducted as a factorial experiment in randomized complete block design with three replications. Real time PCR data analysis indicated that the expression of *Cu/znSOD* between the two genotypes, candidate for tolerance (MCC696) and sensitive genotype (MCC759) was not significantly different from control condition. But the gene expression of *Cu/znSOD* in international genotype (MCC877) was more than other two genotypes in control condition. Consistent with some previous research results, gene expression levels of *Cu/znSOD* was reduced in two days after drought time than control, and increased in recovery stage compared to control plants. The measurement of total soluble leaf proteins and SOD enzyme activity under drought condition treatments revealed no significant difference compared to control conditions.

Key words: Chickpea, Drought stress, Enzyme superoxide dismutase, The gene *Cu/znSOD*

Archive of SID

*** Corresponding Author:** rhashemi83@yahoo.com, Tel.: 05857227218, Mobile: 09158847278

www.SID.ir