



مطالعه بیان موضعی ژن گلوکاتایون پراکسیداز و برخی صفات وابسته در واکنش به تنش خشکی در گیاه کلزا

سعید نواب‌پور*

استادیارگروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

به منظور اندازه‌گیری بیان موضعی ژن گلوکاتایون پراکسیداز، میزان پروتئین، کلروفیل و سطح اکسیداسیون سلولی در گیاه کلزا (واریته فالکون) در واکنش به تیمارهای مختلف تنش خشکی، آزمایشی در شرایط گلخانه با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار تنظیم و اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد و تیمارهای ۰/۵، -۱، -۲، -۴، -۸ و -۱۶ بار که با محاسبه مقدار آب معادل در هر واحد آزمایشی اعمال گردید. آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی نیز به عنوان شاهد انجام شد. دوره آبیاری پس از استقرار کامل گیاهان در مرحله چهار برگ به صورت هفتگی صورت پذیرفت. نمونه برداری تصادفی از برگ برای اندازه‌گیری تمامی صفات در مراحل نمو شامل ساقه دهی، گلدهی، گرده افشانی و رسیدگی فیزیولوژیک انجام شد. نمونه برداری ریشه در کلیه مراحل نمو تنها برای بررسی تغییرات بیان ژن انجام شد. در مورد دانه در مرحله رسیدگی، میزان روغن، پروتئین و بیان ژن اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد درصد پروتئین برگ با افزایش سن گیاه و با افزایش شدت تنش خشکی کاهش قابل توجهی نشان داد، در عین حال میزان تغییرات درصد پروتئین دانه تحت تأثیر تیمارهای تنش خشکی ثابت بیشتری را نسبت به میزان آن در برگ داشت. درصد روغن دانه در مقایسه با پروتئین دانه حساسیت بیشتری را به میزان تنش خشکی نشان داد. این حساسیت در مورد تیمارهای ۰/۵- و ۱- بار در مقایسه با شاهد به طور چشمگیری کم‌تر از سایر تیمارهای تنش نسبت به شاهد بود. میزان کلروفیل برگ نیز با افزایش شدت تنش کاهش یافت. شیب این کاهش تا

* مسئول مکاتبه: s.navabpour@yahoo.com

مرز تیمار ۱- بار پایین و پس از آن به مراتب تشدید گردید. در مقابل شاخص اکسیداسیون سلولی با افزایش تنش خشکی روند افزایشی نشان داد. این مسئله بیانگر افزایش رادیکال‌های اکسیژن تحت تنش خشکی بود. میزان فعالیت ژن گلو‌تاتیون پراکسیداز در تمامی اندام‌های مورد مطالعه (برگ، ریشه، غلاف و دانه) تحت تأثیر تیمارهای خشکی عموماً یک روند سهمی شکل نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده، فعالیت این ژن در اندام‌های مزبور بیانگر میزان گستردگی عمل و اهمیت آن در گیاه کلزا بود.

واژه‌های کلیدی: گلو‌تاتیون پراکسیداز، پروتئین، تنش خشکی، کلزا، بیان موضعی ژن

مقدمه

کلزا از مهم‌ترین دانه‌های روغنی به شمار می‌رود. بر اساس آمار سازمان فائو در سال ۲۰۰۰ کلزا سومین منبع تولید روغن نباتی در جهان است. دانه کلزا علاوه بر کیفیت روغن، دارای پروتئین با کیفیت می‌باشد (شریعتی و قاضی ۲۰۰۰). خشکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی می‌باشد که رشد و تولید محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد (تولنار و وو، ۱۹۹۰). در کلزا حساس‌ترین زمان نمو نسبت به تنش خشکی مراحل گلدهی و پرشدن دانه‌ها می‌باشد، تنش در این مقطع منجر به کاهش قابل توجه عملکرد و افت کیفیت دانه می‌شود (سیناکی و همکاران، ۲۰۰۷).

در شرایط طبیعی تنش خشکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد محسوب می‌شود. تنش خشکی به‌طور تقریبی تمامی فرایندهای حیاتی سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد (یانگ و همکاران، ۲۰۰۶). تنش خشکی منجر به افزایش غلظت نسبی رادیکال‌های آزاد اکسیژن^۱ به ویژه پراکسید هیدروژن می‌گردد (پاناگیوتا و همکاران، ۲۰۱۱؛ گلدن و همکاران، ۲۰۰۲). نتایج برخی مطالعات نشان داده است که آنزیم‌های واجد بخش پروتئینی تیول دارای نقش مهمی در واکنش به رادیکال‌های فعال اکسیژن هستند (فویر و نوکتار، ۲۰۰۵؛ لارکیندال و همکاران، ۲۰۰۵). از مهم‌ترین این آنزیم‌ها گلو‌تاتیون پراکسیداز است. این آنزیم نقش مهمی در مقابله با تنش اکسیداسیونی و ایجاد تعادل بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. چنین نقشی ممکن است به‌طور مستقیم با واکنش بدون واسطه یا از طریق سازو کار آنزیمی با کاهش غلظت پراکسید هیدروژن صورت پذیرد (ان و برونو، ۱۹۹۷؛ پتیزشک

و همکاران، ۲۰۰۶). شواهدی روشن دال بر تأثیر غلظت H_2O_2 بر میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز وجود دارد. این موضوع توسط اسمیت و همکاران (۱۹۸۴) در آزمایشی بر روی موتانت های فاقد فعالیت نسبی آنزیم کاتالاز (آنزیم فعال کاهش دهنده H_2O_2) بررسی گردید. در این پژوهش فزونی غلظت H_2O_2 در موتانت های مورد مطالعه با افزایش غلظت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز همراه بود. در یک آزمایش تکمیلی اسپری ترکیبات ممانعت کننده فعالیت آنزیم کاتالاز بر روی برگ گیاهان جو، سویا و تنباکو با افزایش میزان H_2O_2 منجر به بالا رفتن میزان غلظت و فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز گردید (اسمیت، ۱۹۸۵). از دیگر فعالیت های ژن گلوکاتایون پراکسیداز نقش آن در القای فعالیت چرخه اسید گلی اسیلیک در روند تبدیل اسیدهای چرب به قند و تولید انرژی سلولی است (اتینگر و هارادا، ۱۹۹۰). همچنین فعالیت ژن گلوکاتایون پراکسیداز نقش بسیار مهمی در حفاظت غشا سلولی به ویژه در شرایط تنش دارد (مایورینو و همکاران، ۱۹۹۰؛ هربرت و همکاران، ۲۰۰۲). با توجه به نقش غشا سلولی در تبادل انتخابی مواد و یون ها، مکانیزم های حفاظتی و نقش گلوکاتایون پراکسیداز در حفاظت غشا سلولی و جلوگیری از پراکسیداسیون چربی های غشایی بسیار مهم می باشد (جانگ و همکاران، ۲۰۰۲). بر این اساس، اندازه گیری میزان پراکسیداسیون چربی های غشایی در شرایط تنش به عنوان شاخص مقاومت مورد توجه است (هوجز و همکاران ۱۹۹۹؛ کولوپا و همکاران، ۲۰۰۸). هگگ و همکاران (۱۹۹۰) با اندازه گیری محصول نهایی و پایدار این فرآیند (اسید تیوباریوتریک) روش مطمئن و به نسبت ارزانی را معرفی نمودند.

گیاهان دو لپه با داشتن سطح برگ قابل توجه بخش زیادی از آب در دسترس خاک را طی فرآیند تعرق با فعالیت سلول های روزنه ای به دست می آورند. این مسئله برای رشد و نمو و به ویژه برای انجام فعل و انفعالات فتوسنتزی دارای اهمیت زیادی است (یانگ و همکاران، ۲۰۰۶). اساساً فتوسنتز از اولین مراحل است که تحت تأثیر تنش خشکی واقع می شود (چاوز و همکاران، ۲۰۰۹؛ صالحی و همکاران، ۲۰۰۴). تغییر میزان فتوسنتز عمدتاً به دلیل اختلال در روند باز و بسته شدن روزنه ها ناشی از اثرات سوء تنش خشکی است (آرانجلو و همکاران ۲۰۰۷؛ دو و همکاران، ۲۰۰۷). تنش خشکی علاوه بر کاهش میزان کلروفیل بر میزان پروتئین ها به ویژه ریسکو تأثیر منفی دارد (پاری و همکاران، ۲۰۰۳؛ آرانجلو و همکاران ۲۰۰۷). از طرفی در شرایط تنش با افزایش میزان رادیکال های فعال اکسیژن تعادل اکسیداتیو سلولی تحت الشعاع قرار می گیرد (لاولور و تزارا، ۲۰۰۹؛ چو و همکاران، ۲۰۰۷).

تداوم تنش خشکی می‌تواند منجر به بروز تنش اکسیداتیو و تغییر در تنظیم آنزیمی سلول گردد (آسادا، ۱۹۹۹).

با توجه به مطالبی که در بالا ذکر شد این مطالعه به منظور دستیابی به اهدافی چون بررسی نقش فعالیت ژن گلوتاتیون پراکسیداز در واکنش به سطوح تنش خشکی در واریته فلکون کلزا، تغییر میزان بیان نسبی این ژن در اندام‌های مختلف گیاه طی مراحل رشد و بررسی همبستگی میزان بیان ژن مذکور و شاخص پراکسیداسیون سلولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذر گیاه کلزا، واریته فالکون (*Brassica napus cv. Faclon*) در شرایط کشت بستر سبک (کوارتز، ماسه، پرلیت و کوکوپیت به نسبت ۳۰، ۳۰، ۲۰ و ۲۰ درصد) کشت شد و در مرحله چهاربرگی جهت بهاره سازی به مدت شش هفته در دمای چهار درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن گلدان‌ها به شرایط گل‌خانه تحقیقاتی با میزان روشنایی ۱۶ ساعت و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در روز و دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد در شب منتقل شد.

سطوح تیمار خشکی مشتمل بر مقادیر ۰/۵، -۱، -۲، -۴ و -۸ بار برحسب مقدار معادل آب مورد نیاز در تکرارهای هر تیمار آبیاری گردید. اعمال تیمارها از زمان انتقال به گل‌خانه انجام شد. آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی به‌عنوان شاهد انجام شد. دوره آبیاری پس از انتقال به گل‌خانه تحقیقاتی به‌طور ثابت و به‌صورت هفتگی انجام گرفت.

به‌منظور افزایش دقت از طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار استفاده شد. هر بلوک شامل دوازده گلدان بزرگ بود، در شش گلدان در هر تکرار دو بوته نگهداری شد این گلدان‌ها به ارزیابی اندام هوایی اختصاص یافتند، در شش گلدان باقی‌مانده در هر بلوک یک بوته نگهداری شد که به ارزیابی ریشه اختصاص یافت. نمونه‌برداری جهت محاسبه شاخص اکسیداسیون سلولی TBARM^۱، میزان کلروفیل، پروتئین و بیان ژن از برگ به‌صورت تکراردار در مراحل مختلف رشد شامل ساقه دهی، گل‌دهی، گرده افشانی و رسیدگی فیزیولوژیک انجام شد. همچنین نمونه برداری ریشه در مراحل مزبور جهت بررسی بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز نیز صورت پذیرفت. در مورد غلاف و دانه در زمان‌های مربوطه اقدام به نمونه برداری گردید.

به منظور اندازه گیری میزان کلروفیل از روش پورا و همکاران (۱۹۸۹) استفاده گردید. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ (بصورت منجمد) کاملاً خرد و با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شد. پس از سانتریفوژ میزان جذب در طول موج های ۶۶۶/۶، ۶۶۳/۶ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (watford 930 Uvikon) ثبت گردید. میزان کلروفیل a و کلروفیل b و کلروفیل کل براساس روابط زیر محاسبه گردید:

$$\text{chl a (mgml}^{-1}\text{)} = 12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6} \quad \text{فرمول (۱)}$$

$$\text{chl b (mgml}^{-1}\text{)} = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6} \quad \text{فرمول (۲)}$$

$$\text{chl (mgml}^{-1}\text{)} = 16.76A_{646.6} - 6.34A_{663.6} \quad \text{فرمول (۳)}$$

در خصوص اندازه گیری میزان پروتئین و روغن مقدار نیم گرم نمونه برگ به طور یکنواخت کوبیده و میزان ۱/۵ میلی لیتر بافر استخراج (Tris-HCL 50 mM pH:7.5, EDTA 2mM pH:8, Mercaptoethanol 0.04 v/v) افزوده گردید. نمونه ها با سرعت ۱۲۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. با کاربرد محلول استاندارد کوماسی بلو و استفاده از روش برادفورد (۱۹۷۶) مقدار پروتئین اندازه گیری و بر حسب واحد تنظیم گردید. مقدار روغن هر نمونه به طور جداگانه به روش سوکسله با استفاده از حلال پترولیوم اتر به مدت ۴ ساعت استخراج گردید (کدیور و همکاران، ۲۰۱۰).

برای اندازه گیری سطح اکسیداسیون سلولی از سنجش TBARM استفاده گردید. در این سنجش مقدار اسید تیوباریبوتریک که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول های بزرگ (چربی ها) است اندازه گیری می شود. در این خصوص از روش هگگ و همکاران (۱۹۹۰) با تغییراتی استفاده گردید. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ را هموژنیزه نموده و یک میلی لیتر اسید تری کلرواستیک ۱۵ درصد وزنی حجمی به آن اضافه شد. محلول حاضر با افزودن ۱۰ میلی لیتر استون به شدت مخلوط (ورتکس) و با سرعت ۲۰۳۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب کوچکی که پس از سانتریفوژ حاصل شد را با ۵ میلی لیتر استون شستشو داده، ورتکس و دوباره با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نموده و آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. پس از آن مقدار ۳ میلی لیتر اسید هیپو فسفریک ۱ درصد و ۱ میلی لیتر اسید تیوباریبوتریک ۰/۶ درصد وزنی حجمی افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس واکنش با سرد کردن سریع

لوله‌ها در داخل یخ متوقف گردید. مقدار جذب محلول حاصل با طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ به وسیله دستگاه جذب نوری (watford 930 Uvikon) اندازه گیری گردید.

برای استخراج RNA مقدار ۳ گرم نمونه منجمد برگ در ازت مایع هموژنیزه گردید مقدار ۱۰ میلی‌لیتر فنل و ۱۵ میلی‌لیتر بافر (100_mM_Tris-HCl_pH_9, 200 mM NaCl, 5 mM Dithiotheitol, 1%(w/v), 20mM_EDTA) افزوده شد. سپس سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مایع بالای لوله به آرامی جمع‌آوری و با افزودن مقدار مساوی کلروفرم عمل سانتریفیوژ دو تا سه بار به همین ترتیب تکرار گردید. مقدار ۰/۳۳ حجم LiCl هشت مولار افزوده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرارگرفت. استخراج RNA با انجام سانتریفیوژ لوله‌ها با سرعت ۴۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. پس از شستشوی RNA استخراجی با اتانول ۷۰ درصد در غلظت ۲ میکروگرم بر میکرولیتر در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به منظور هیبریداسیون RNA با کاوشگر DNA نشاندار فسفر رادیواکتیو ابتدا انتقال RNA به ژل آگارز و الکتروفورز آن انجام شد. پس از حذف قسمت‌های اضافی ژل، RNA به غشای نایلونی (Hybond N+(Amersham) با افزودن NaOH ۰/۰۵ مولار در مدت حداقل ۱۰ ساعت منتقل گردید. به منظور انجام هیبریداسیون ابتدا کاوشگر کلون گلوکوتایون پراکسیداز به وسیله ستون سفاروز خالص سازی شد. کاوشگر تک رشته در محیط بافری به غشا حامل RNA افزوده و به مدت یک شب در شیکر ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. غشا را با محلول 0.2×SSC/1%SDS شستشو و پس از خشک کردن در کاست فیلم x-ray در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کرده و سپس ظاهر گردید.

نتایج و بحث

تغییرات میزان پروتئین و روغن: به‌طور کلی با افزایش سن گیاه میزان پروتئین برگ کاهش یافت. به طوری که بیش‌ترین مقدار پروتئین برگ در مرحله ساقه‌دهی و کم‌ترین مقدار آن در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک حاصل گردید. از طرفی روند کاهشی میزان پروتئین با افزایش شدت تنش خشکی محسوس بود. در عین حال در اغلب مراحل رشد تفاوت معنی داری بین میزان پروتئین بین تیمار شاهد و تیمارهای ۱- و به‌ویژه ۰/۵- بار وجود نداشت (جدول ۱). میزان تغییرات درصد پروتئین دانه

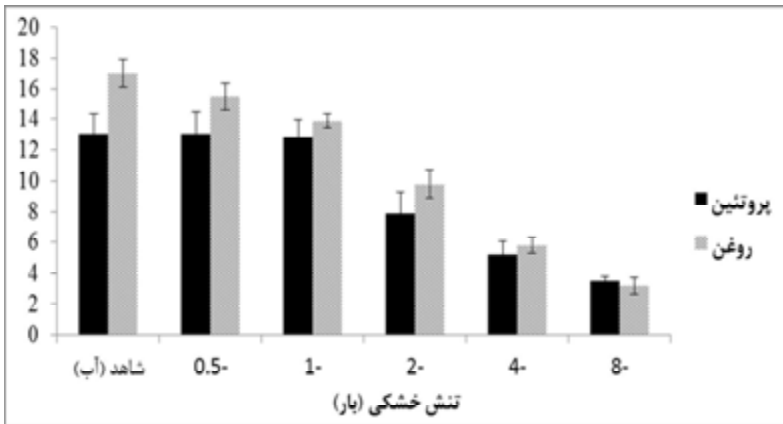
ثبات بیش تری را نسبت به تغییرات آن در برگ تحت تأثیر تیمارهای خشکی نشان داد (جدول ۱). از نتایج جالب توجه برتری میزان پروتئین دانه در مقایسه با پروتئین برگ به ویژه در مراحل پایانی رشد (گرده افشانی-رسیدگی) بود. این موضوع که بیانگر انتقال مواد پروتئینی از برگ و اندامهای رویشی به دانه می باشد دارای اهمیت زیادی است. به نظر می رسد تنش خشکی نسبتاً شدید (بیش تر از ۱- بار) منجر به القای نوعی واکنش دفاعی- سازگاری (شبیه آنچه در مورد مرحله پیری گیاه دیده می شود) گردیده و در نتیجه با فعال شدن برخی ژن ها و سازوکارهای فیزیولوژیک انتقال مواد از اندامهای رویشی و برگ به سوی اندامهای ذخیره ای و به ویژه دانه تسریع شده است. این مسئله در سایر گزارش ها نیز اشاره شده است. (کولوپا و همکاران، ۲۰۰۸؛ چو و همکاران، ۲۰۰۷).

جدول ۱- مقایسه بین میانگین تیمارهای تنش خشکی برای صفت درصد پروتئین برگ طی مراحل مختلف رشد.

تنش خشکی (بار)						مراحل رشد
شاهد	-۰/۵	-۱	-۲	-۴	-۸	
۱۴/۰ ^a	۱۳/۱ ^{abc}	۱۲/۷ ^{bcd}	۹/۳ ^f	۶/۱ ^j	۳/۳ ^{lm}	ساقه دهی
۱۳/۱ ^{abc}	۱۱/۹ ^{cde}	۱۲/۲ ^{bcde}	۷/۶ ⁱ	۳/۰ ^{lmn}	۱/۸ ⁿ	گلدهی
۱۱/۷ ^{de}	۱۱/۱ ^{de}	۹/۱ ^{fg}	۶/۲ ^j	۴/۰ ^{kl}	۲/۵ ^{mn}	گرده افشانی
۸/۹ ^{fgh}	۷/۵ ⁱ	۷/۸ ^{hi}	۵/۱ ^{jk}	۳/۲ ^{lm}	۲/۶ ^{mn}	رسیدگی فیزیولوژیک
۱۳/۳ ^{ab}	۱۳/۰ ^{abc}	۱۲/۸ ^{abcd}	۷/۹ ^{ghi}	۵/۱ ^{jk}	۳/۵ ^{lm}	پروتئین دانه

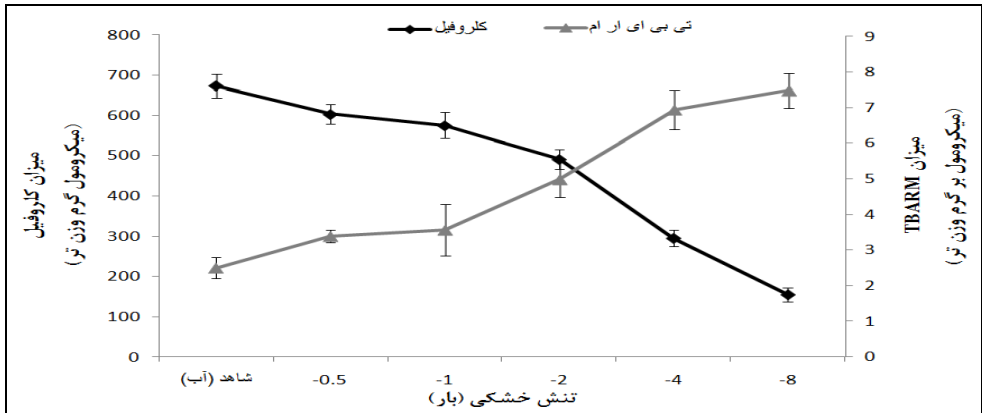
میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف آماری ندارند.

میزان کاهش درصد روغن در مقایسه با پروتئین دانه حساسیت بیش تری نسبت به افزایش شدت تنش خشکی نشان داد (شکل ۱). این حساسیت در مورد تیمارهای ۰/۵- و ۱- بار در مقایسه با شاهد به اندازه سایر تیمارهای خشکی نبود. با توجه به نتیجه مشابهی که برای پروتئین دانه نیز حاصل گردید، به نظر می رسد پتانسیل ژنتیکی گیاه کلزا در القا مقاومت به شرایط خشکی نه چندان بالا (۰/۵- و ۱-) وضعیت نسبتاً مطلوبی را برای پروتئین و روغن دانه ایجاد نموده است.



شکل ۱- میانگین اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر درصد روغن و پروتئین دانه در تیمارهای تنش خشکی، میزان خطای معیار به وسیله نشانه میله‌ای نمایش داده شده است ($n=4$).

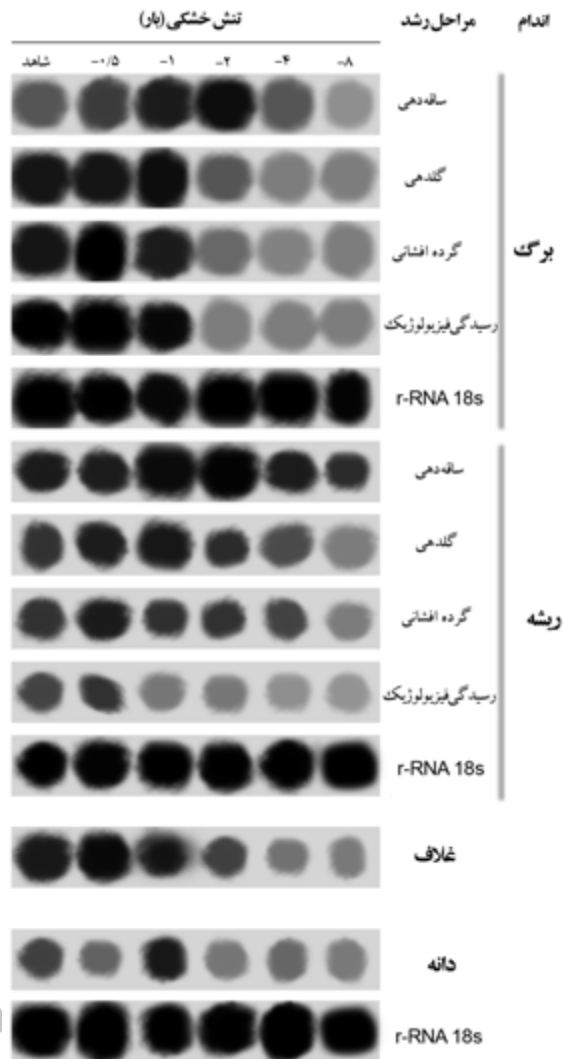
میزان کلروفیل و **TBARM**: میزان کلروفیل با افزایش شدت تنش خشکی کاهش یافت (شکل ۲). شیب این کاهش تا مرز ۱- بار کم و پس از آن فزاینده بود به طوری که در تیمار ۱- بار در مقایسه با شاهد کم‌تر از ۸ درصد کاهش و در فاصله تیمارهای ۱- تا ۸- بار حدود ۹۰ درصد کاهش حاصل گردید. هم‌زمان با کاهش میزان کلروفیل زرد شدن برگ‌های مسن‌تر و تیره‌تر شدن رنگ برگ‌های جوان تر ایجاد گردید. چنان‌چه اشاره شد تغییرات میزان کلروفیل در مراحل مختلف رشد تحت شدت تنش متفاوت بود. بر این اساس به نظر می‌رسد پایداری کلروفیل به‌ویژه در شرایط تنش خشکی ملایم می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای مقاومت به خشکی تلقی گردد. این موضوع توسط برخی محققان دیگر اشاره شده است (صالحی و همکاران، ۲۰۰۴؛ دوو و همکاران ۲۰۰۷).



شکل ۲- میانگین اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان کلروفیل و شاخص اکسیداسیون سلولی TBARM در برگ. میزان خطای معیار به وسیله نشانه میله‌ای نمایش داده شده است (n=۴).

از دیگر پاسخ‌های زود هنگام گیاه نسبت به تنش خشکی افزایش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد (گلدن و همکاران، ۲۰۰۲؛ لارکیندال و همکاران، ۲۰۰۵؛ پیتزسک و همکاران، ۲۰۰۶). به‌طور کلی با افزایش میزان تنش خشکی مقدار شاخص اکسیداتیو سلولی (TBARM) افزایش نشان داد (شکل ۲). این افزایش در تیمارهای ۰/۵- و ۱- بار نسبت به شاهد چندان بالا نبود ولی در تیمارهای بعدی شیب افزایش شدت بیش‌تری داشت.

تغییرات میزان بیان ژن گلتوتاتیون پراکسیداز: میزان بیان ژن گلتوتاتیون پراکسیداز در تمامی اندام‌های مورد مطالعه شامل برگ، ریشه، غلاف و دانه تحت تأثیر تیمارهای خشکی عموماً یک روند افزایشی در تنش‌های کم خشکی (۰/۵- و ۱-) و کاهش بیان ژن در تنش‌های شدید را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- الگوی بیان ژن گلوکاتایون پراکسیداز در اندام و مراحل مختلف رشد در گیاه کلزا تحت شرایط تنش خشکی. استخراج RNA از اندام مربوطه در مراحل رشد و تیمارهای خشکی ذکر شده صورت گرفته و پس از انتقال به غشا حساس با کلون گلوکاتایون پراکسیداز واجد فسفر رادیواکتیو هیبرید گردید. با ظهور فیلم رادیوگرافی نتایج به ترتیب بالا منظم شد.

وجود این ژن در تمام اندامهای مزبور از نتایج جالب توجه این پژوهش بود که نشان دهنده میزان وسعت عمل و اهمیت این ژن می باشد. با توجه به انحصاری بودن نقش این ژن در احیا مستقیم فسفولیپید هیدروژناز و کمپلکس هیدروپروکسی برای حفاظت غشا سلولی در برابر تنش اکسیداتیو گستردگی حضور این ژن در اندامهای مختلف توجیه پذیر به نظر می رسد. این موضوع در سایر پژوهش ها نیز گزارش شده است (هرت و همکاران، ۲۰۰۲؛ جانگ و همکاران ۲۰۰۲). بیشترین فعالیت این ژن در برگ در مراحل گرده افشانی و رسیدگی فیزیولوژیک تحت تیمار ۰/۵ - بار تنش خشکی حاصل گردید. با توجه به شدت فرآیندهای اکسیداتیو در مراحل مزبور این مسئله دور از انتظار نیست. در مراحل پیشین بیشترین جذب نور توسط گیاه حاصل شده و امکان بروز تنش نوری اکسیداتیو بسیار متحمل است. از طرفی فرآیندهای فتوسنتزی و تولید انرژی نیز با شدت بالایی رخ می دهند، در چنین شرایطی امکان فرار الکترون ها از سیستم کمپلکس فتوسنتزی II با فراوانی نسبی بیشتری حادث گردیده و شانس بروز تنش اکسیداتیو با افزایش فراوانی رادیکال های آزاد اکسیژن بالا می رود. در پی آن افزایش فعالیت سیستم پاداکسیدان و از آن جمله ژن گلو تاتیون پراکسیداز قابل انتظار می باشد. این موضوع در سایر مطالعات مشابه نیز گزارش شده است (چوی و همکاران، ۲۰۰۷؛ فوید و نوکتار، ۲۰۰۵). کاهش نسبی بیان ژن مورد مطالعه در تیمارهای خشکی شدیدتر که به طور حتم با افزایش میزان رادیکال های اکسیژن و میزان اکسیداسیون سلولی بالاتر نیز همراه است (شکل ۲) از این قاعده پیروی نمی کند. بدیهی است اولاً ظرفیت بیان یک ژن مطلق نبوده و نسبی است. ثانیاً روند فعالیت های سلولی به یکدیگر وابسته هستند. طبیعی است در تنش های شدید محیطی (نظیر خشکی) بسیاری از فعل و انفعالات معمول سلولی دچار خدشه و بعضی اوقات خسارت برگشت ناپذیر می گردند و در این شرایط مطمئناً فعالیت یک ژن برخلاف وجود محرک خارجی و یا مولکول سیگنال داخلی لزوماً افزایش نخواهد یافت (لارکیندال و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج این مطالعه نیز بیانگر کاهش فعالیت ژن گلو تاتیون پراکسیداز در شدت های بالای تنش خشکی به ویژه ۴- و ۸- بار بود (شکل ۳). در ریشه بیشترین فعالیت ژن در مرحله ساقه دهی حاصل شد. در مرحله ساقه دهی روند تقسیم سلولی و طویل شدن یاخته ها سرعت می یابد. در این راستا اهمیت جذب آب و مواد غذایی و انجام تبادلات یونی و املاح به صورت انتخابی از طریق غشا سلولی دو چندان می گردد. بر این اساس به نظر می رسد روند افزایش فعالیت ژن مورد مطالعه در ریشه در مرحله ساقه دهی حسب نیاز فیزیولوژیک گیاه قابل انتظار باشد (یانگ و همکاران، ۲۰۰۶). از دیگر نتایج جالب توجه بیان ژن مورد بررسی در

غلاف بود که با توجه به تعداد زیاد غلافها در کلزا القای نقش آنتی اکسیدانی این ژن در افزایش نسبی راندمان فتوسنتز توسط غلاف به‌ویژه پرشدن دانه‌ها می‌تواند مفید باشد (شکل ۳). همچنین این ژن در دانه نیز بیان قابل توجهی داشت. قابل توجه اینکه به جز تیمار ۸- بار تنش خشکی، در سایر تیمارها بیان این ژن ثبات بالایی نشان داد. نتیجه یک پژوهش نشان داده است بیان ژن گلوکاتایون پراکسیداز در تحریک بیان ژن‌های مالات کیناز و ایزوسترالیز ایفای نقش می‌نماید. ژن‌های مذکور کد کننده پروتئین‌هایی هستند که در چرخه اسید گلی اکسیلیک دارای اهمیت هستند. فعالیت چرخه مزبور به همراه اکسیداسیون بتا و گلوکوجنیز امکان تبدیل اسیدهای چرب به قند را فراهم می‌آورند. این مسئله در زمان جوانه زنی بذر با توجه به نیاز فراوان به انرژی بسیار مهم و حیاتی است، از این‌رو بیان قابل توجه این ژن در دانه می‌تواند نقش تاثیرگذاری در بقا و تداوم نسل گیاه ایفا نماید (اتینگر و هارادا، ۱۹۹۰).

منابع

1. Anne, C.L. and Bruno, T. 1997. Glutathione-Mediated regulation of ATP sulfurylase activity, SO_4^{2-} uptake, and oxidative stress response in intact canola roots. *Plant Physiol.* 114: 177-183.
2. Aranjuelo, I., Irigoyen, J.J. and Sánchez-Díaz, M. 2007. Effect of elevated temperature and water availability on CO_2 exchange and nitrogen fixation of nodulated alfalfa plants. *Environ. Exp. Bot.* 59:99-108.
3. Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
4. Bradford, M.M.A. 1976. Rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-254.
5. Chaves, M.M., Flexas, J. and Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103:551-560.
6. Choi, H.W., Kim, Y. J., Lee S.C., Hong, J.K. and Hwang, B. K. 2007. Hydrogen Peroxide generation by the Pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiol.* 145: 890-904.
7. Du, Y.Y., Wang, P.C., Chen, J. and Song, C.P. 2007. The comprehensive functional analysis of catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. National Natural Sci. Foundation. China. 121:16-23.

8. Ettinger, W.F., and Harada, J.J. 1990. Translational or post-translational processes affect differentially the accumulation of isocitrate lyase and malate synthase proteins and enzyme activities in embryos and seedlings of *Brassica napus*. Arch. Biochem. Biophys. 281: 139-143.
9. Foyer, C.H. and Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell. 17 : 1866 –1875.
10. Golden, T.A., Hinerfeld, D. and Melov, S. 2002. Oxidative stress and aging: beyond correlation. Aging Cell. 117–123.
11. Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J. and Gaspar, T. 1990. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. Phytochem. Anal. 1: 86-89.
12. Herbet, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J.L., Drevet, J.R. and Roeckel-Drevet, P. 2002. Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. Eur. J. Biochem. 269: 2414 – 2420.
13. Hodges, D.M., Delong, J.M., Forney, C.F. and Prange, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta. 207: 604-611
14. Jung, B.G., Lee, K.O., Lee, S.S. Chi, Y.H., Jang, H.H., and Kang, S.S. 2002. A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase. J. Biol. Chem. 277:12572 – 12578.
15. Kadivar, S., Ghavami, M., Gharacholo, M. and Delkhoosh, B. 2010. Evaluation of oil extraction of different cultivar of *Brassica napus*. J. Nut. Sci. Nut.. 2: 19-22. (In Persian)
16. Kolupae, Y., Karpets, Y.V. and Kosakivska, I.V. 2008. The importance of reactive oxygen species in the induction of plant resistance to heat stress. Plant Physiol. 34(3-4): 251-266.
17. Larkindale, J.D., Hall, J.R., Knight, M. and Vierling, E. 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. Plant Physiol. 138: 882–897.
18. Lawlor D.W., and Tezara W. 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. Ann. Bot. 103:543–549.
19. Maiorino, M., Gregolin, C. and Ursini, F. 1990. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Method Enzymol. 186: 448 – 457.

20. Panagiota F., Chrystalla, A. and Vasileios, F. 2011. Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. *Plant Signal Behav.* 6: 270–277.
21. Parry, M.A.J., Andralojc P.J., Mitchell, R.A.C., Madgwick, P.J., and Keys, A.J. 2003. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Bot.* 54:1321–1333.
22. Pitzschke, A., Forzani, C. and Hirt, H. 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Antioxidative Redox Signal.* 8: 1757–1764.
23. Pora, R.J., Thompson, W.A., and Kriedmann, P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta.*, 975:384-394.
24. Salehi, M., Koochaki, A.L., and Nasiri, M.M. 2004. The nitrogen and chlorophyll content as drought stress index in wheat. *Iran Res. Agron.* 2: 199-203. (In Persian)
25. Shariati, S., Ghazi, S.P. 2000. *Brassica napus*. Iranian Institute of Date and Information in Agron. (In Persian)
26. Sinaki, J.M., Heravan, E.M., Rad, A.H.S., Noormohammadi, G. and Zarei, G. 2007. The effects of water deficit during growth stages of canola (*Brassica napus* L.). *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 2: 417–422.
27. Smith I.K. Kendall A.C. Keys, A.J. Turner, J.C., and Lea, P.J. 1984 Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci. Lett.* 37:29-33
28. Smith, I.K. 1985. Stimulation of glutathione synthesis in photo respiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.* 79: 1044-1047.
29. Tollenaar, M. and Wu, J. 1999. Yield improvement in temperatemaize is attributable to greater stress tolerance. *Crop Sci.* 39: 1597–1604.
30. Yang, X.D., Dong, C.J. and Liu, J.Y. 2006. A plant mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: its precise localization and higher enzymatic activity. *Plant Mol. Biol.* 62: 951 – 962.



Study of In-situ Glutathion Peroxidase Gene Expression in Growth stages of *Brassica napus* at Drought Stress Condition

*S. Navabpour

Assistant Prof., Dept. Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

In order to transient Glutathion Peroxidase gene expression, protein content, chlorophyll and oxidative level in *Brassica napus* (Falcon cv.) in response to drought stress condition, the experiment has been carried out in RCBD format design with four replicates under research greenhouse condition. The drought stress treatments were included -0.5, -1, -2, -4 and -8 bar that applied in each plot by using of equivalent water. Field capacity (FC) has been used as control. The periodic water treatment has been applied every week at the four leaves growth stage. Random leaf samples have been collected to measure all mentioned trails at the growth stages (Stem elongation, flowering, Pod stage, Physiologic maturity). Root samples have been collected for gene expression at all mentioned growth stages. For grain analysis samples have been collected of maturity to measure oil percentage, protein and gene expression. The result showed leaf protein declined sharply by plant age and drought intensity, beside grain protein content showed more stability in compare with leaf protein at drought condition levels. Net grain oil percentage (grain yield * oil percentage) showed more fluctuation in compare with grain protein at drought treatment levels. Although this fluctuation was rather less for -0.5 and -1 bar in compare with other drought treatments. Leaf chlorophyll content decreased by increase drought treatments. This decrease was low up to -1 bar drought treatment and rather increase after the level of -1 bar. In contrast, the cellular oxidative level (TBARM) increased by intensity drought level, this has been caused by AOS (Active Oxygen Species) levels. The activity of glutathione peroxidase gene showed sigmoid trend mostly in all plant organs (leaf, root, pot, grain). Basically, this has implied on importance and gross range of activity this gene.

Keywords: Glutathione peroxidase; Protein; Drought stress; *Brassica napus*; transient gene expression

* Corresponding author; Email: s.navabpour@yahoo.com