

مقایسه بیان ژن *Rboh* در هندوانه زراعی (*Citrullus lanatus*) و هندوانه وحشی (*Citrullus colocynthis*) تحت تأثیر تنش خشکی

نسرین صلاحی، زهرا سلیمانی، اکبر صفی‌پور افشار* و فاطمه سعید نعمت‌پور

نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۴

چکیده

هندوانه وحشی (*Citrullus colocynthis*) یک گونه بسیار متحمل به خشکی از خانواده کدوئیان است که در مناطق خشک دنیا از جمله در بیابانهای منطقه مدیترانه و خاورمیانه پراکندگی دارد. یکی از راهکارهای احتمالی دخیل در پاسخ تحمل این گیاه، می‌تواند بیان بالای ژن *Rboh* باشد که محصول پروتئینی آن در تولید مولکولهای سیگنال ROS نقش دارد. در این پژوهش بیان ژن *Rboh* تحت تأثیر خشکی در *C. colocynthis* و هندوانه زراعی مطالعه شد. بذرها پس از ضدعفونی و جوانه زنی در ژرمیناتور به گلدانهای حاوی ماسه منتقل شدند. گیاهان در مرحله ۵ برگی تحت تیمار PEG8000 ۱۵ درصد قرار گرفتند و در زمانهای صفر، ۳، ۹، ۱۸ ساعت پس از اعمال تیمار میزان نسبی آب برگها و تغییرات بیان ژن *Rboh* به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار میزان نسبی آب در برگهای هر دو گیاه بود اما این کاهش در هندوانه وحشی به طور قابل توجهی کمتر بود. در پی اعمال تنش خشکی بیان نسبی ژن *Rboh* در هر دو گونه افزایش یافت اما هندوانه وحشی از سطح بیان بالاتری برخوردار بود. بیان نسبی *Rboh* که یک نقش مهم در پاسخ به محرک استرس ایفاء می‌کند، در هندوانه وحشی با تیمار PEG با سرعت و شدت بیشتری نسبت به هندوانه زراعی القاء شد. این نتایج می‌تواند مؤیدی بر ایفای نقش کلیدی *Rboh* در تحمل *C. colocynthis* در برابر تنش خشکی باشد.

واژه‌های کلیدی: میزان نسبی آب، هندوانه زراعی، هندوانه وحشی، Real Time PCR.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۱۱۸۶۸۸۷، پست الکترونیکی: asafshar@iaun-neyshabur.ac.ir

مقدمه

که بخشی از این اکسیژنهای واکنشگر در آپوپلاست سلولهای گیاهی تولید می‌شوند تا بتوانند در پاسخ پاتوژن (۳۴)، تغییرات بیوفیزیکی در دیواره سلولی (۲۳) و به عنوان میانجیهای علامت‌دهی سیستمی (۲۴) مشارکت کنند.

سوپراکسید آپوپلاستی می‌تواند توسط همولوگهای اکسیداز انفجار تنفسی (*Rboh*) تولید شود. پروتئینهای *rboh* به دلیل همسان بودن دمین کاتالیک آنها با زیرواحد gp91^{phox} از *Rboh* پستانداران نام‌گذاری شده‌اند. انتقال الکترون و تولید سوپراکسید زمانی رخ می‌دهد که دمین کاتالیک الکترونهای

کم آبی مهم‌ترین تنش محیطی و عامل اصلی کاهش رشد و بازدهی گیاهان است. تحمل به تنش خشکی یک پدیده پیچیده شامل تعدادی فرآیندهای فیزیکی-بیوشیمیایی است که در طول مراحل مختلف رشد گیاه فعال می‌شوند (۱۲). تولید اکسیژنهای واکنشگر (ROS) در سطح سلول، یکی از اولین وقایع شناخته شده از پاسخهای دفاعی گیاهان است. در طول یک دهه گذشته نقشهای متعددی برای اکسیژنهای واکنشگر شامل سوپراکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکالهای هیدروکسیل (HO^\cdot) در طول چرخه حیات سلول شناخته شده است (۳۰). مشخص شده

بوده و یک گیاه دارویی مهم محسوب می‌گردد (۲۷).

با توجه به نقش ژن *Rboh* در تحمل تنش‌های غیرزیستی در گیاهان مختلف و تحمل بالای هندوانه وحشی به تنش خشکی، هدف از این مطالعه بررسی مقایسه‌ای بیان این ژن در هندوانه زراعی و وحشی در شرایط تنش خشکی می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی و تیمارها: بذر گیاه مقاوم به خشکی هندوانه وحشی (*C. colocynthis*) از منطقه گچساران واقع در استان کهگیلویه و بویراحمد و بذر هندوانه زراعی (*C. lanatus*) توده محلی منطقه نیشابور واقع در استان خراسان رضوی تهیه شد. بذرها پس از ضدعفونی جهت جوانه‌زنی در ژرمیناتور با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از جوانه زنی به گلدانهای حاوی ماسه منتقل شده و در شرایط کنترل شده، فتوپریود ۱۶ ساعت و دمای بین ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آبیاری به صورت روزانه با محلول هوگلند انجام شد. پس از رسیدن به مرحله ۵ برگگی، گیاهان به طور کامل از گلدانها خارج و به ظروف شیشه‌ای حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند دارای PEG8000 ۱۵ درصد منتقل شدند و در زمانهای صفر، ۳، ۹ و ۱۸ ساعت پس از اعمال تیمار، ریشه و ساقه گیاهان جداگانه برداشت و جهت آنالیزهای بعدی در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. گیاهان شاهد نیز به محلول مشابه اما فاقد PEG8000 منتقل شدند.

اندازه گیری محتوی نسبی آب (RWC): برای اندازه‌گیری محتوی نسبی آب در زمانهای مذکور از آخرین برگ نمو یافته گیاه نمونه برداری و وزن تر (FW) آنها اندازه‌گیری شد. سپس برای تعیین وزن تورگور (TW) نمونه‌های مذکور به مدت ۴ ساعت در آب مقطر غوطه‌ور شده و سپس وزن آنها اندازه‌گیری شد. وزن خشک (DW) این نمونه‌ها پس از قرار گرفتن در آون به مدت ۲۴ ساعت در

بین سلولی را از NADH یا NADPH گرفته و آنها را به O_2 خارج سلولی منتقل می‌کند (۱۵). خانواده ژنی *Rboh* زیر واحد کلیدی آنزیم Noxs (NADPH oxidase) را کد می‌کند و به همین دلیل گاهی NADPH اکسیداز نامیده می‌شود (۳۲). پروتئینهای *rboh* عامل بخش عمده‌ای از ROS تولید شده در فرآیندهای دفاع در برابر پاتوژن می‌باشند. نقش این پروتئین در فرآیندهای مختلف دیگری، شامل رشد طولی گیاهچه (۷)، رشد راسی ریشه‌های موئین (۲۱)، رشد لوله‌های گرده (۳۱)، جوانه زنی بذر (۲۴) و در حسگرهای مکانیکی (۲۲) شناخته شده است.

بر اساس آخرین یافته‌ها تاکنون ده *Rboh* در آرکیدوپسیس شناسایی شده است (۶) که عملکردهایی در پاسخهای دفاعی گیاهان به استرس‌های زیستی دارند (۳۲ و ۳۳). همچنین پروتئین کد شده توسط *RbohD*، که به طور پیوسته در گیاه آرکیدوپسیس بیان می‌شود در علامت‌دهی سیستمی توسط ROS آپوپلاستی، که در اثر زخمی شدن و یا استرس‌های غیرزیستی مثل گرما، سرما، نور شدید، شوری و خشکی راه‌اندازی می‌شوند، دخیل هستند (۲۰).

خانواده کدوئیان شامل چندین گونه زراعی مهم اقتصادی مثل هندوانه زراعی، خربزه، خیار، کدو حلوايي، کدو تنبل و کدو قلیایی است (۹). برای مقاوم کردن هندوانه زراعی به پاتوژنها، دمای پایین خاک، شوری و استرس کم آبی، این گیاه به پایه گونه‌های مقاومی همچون *C. maxima*، *Cucurbita moschata*، پیوند زده می‌شود (۳۶ و ۳۷). یک گونه از این خانواده و از جنس *Citrullus* که به طور وسیعی در مناطق خشک و بیابانی ایران می‌روید و به خوبی با شرایط استرس کم آبی وفق یافته است، به لحاظ ژنتیکی منبعی غنی برای ارتقاء مقاومت به خشکی می‌باشد و قرابت زیادی با گونه هندوانه زراعی دارد (۲۵). این گونه (*C. colocynthis*) که به زبان محلی سیب تلخ، کدوی تلخ و هندوانه ابوجهل نیز نامیده می‌شود، گیاهی علفی و چند ساله است، منبعی غنی از روغنهای ارزشمند

designer طراحی شدند. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژن *Rboh* و β -actin در جدول ۱ مشخص شده است. برای هر واکنش ۳ تکرار در نظر گرفته شد. حجم مخلوط واکنش برای هر نمونه، ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBER Green، ۳ میکرولیتر از cDNA ساخته شده، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۶/۲ میکرولیتر آب مقطر استریل فاقد RNase، بود که پس از آماده و لود شدن در چاهکهای پلیت مخصوص به دستگاه ABI منتقل گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با شرایط زیر انجام شد: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ تکرار با چرخه‌های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها به الگو و ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد جهت سنتز cDNA. کمیت سنجی بیان نیز به روش $\Delta\Delta C_T$ (comparative C_T method) و با تعیین نسبت بیان ژن هدف (*Rboh*) به ژن کنترل داخلی (β -actin) صورت گرفت:

$$\Delta\Delta C_T = (C_T; rboh - C_T; actin)_{stressed} - (C_T; Target - C_T; actin)_{control}$$

جدول ۱ - توالی پرایمرهای استفاده شده در آنالیزهای Real time PCR

نام آغازگر	توالی ۳' - ۵'	طول الیگونوکلوئوتید	طول قطعه سنتز شده
RBOH (Forward)	GAGCGTGTACGAGGAAGG	۱۸	۹۰
RBOH (Reverse)	CGAGTCCCTGATACCACAT	۱۹	
ACT (Forward)	CAACATACATAGCAGGCACA	۲۰	۹۰
ACT (Reverse)	TGACTGAGGCTCCACTCAAC	۲۰	

آنالیز آماری: برای تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹،۲ استفاده شد. جهت مقایسه میانگینها از آزمون LSD استفاده شد و سطح معنی داری $p \leq 0.05$ لحاظ گردید. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel (Microsoft office 2013) انجام شد. جهت آنالیز داده‌های حاصل از QRT-PCR از نرم‌افزار دستگاه Real Time PCR استفاده شد.

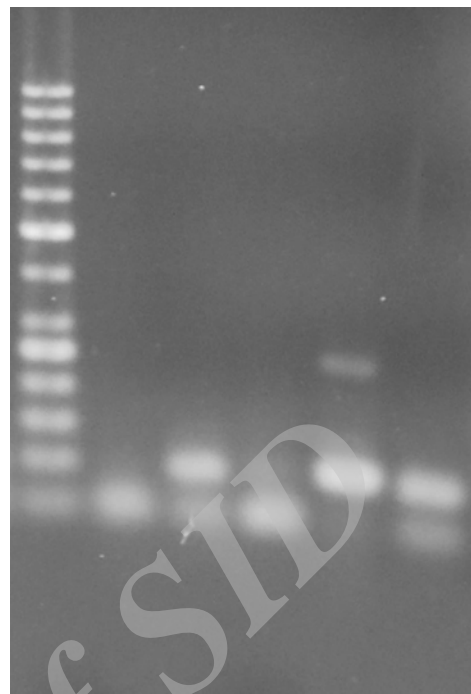
دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، اندازه‌گیری شد. RWC طبق فرمول $RWC = [(FW - DW) / DW] \times 100$ محاسبه شد (۲۹).

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA کل با استفاده از کیت جداسازی (Intron) eassy BlueTM انجام گرفت. برای حذف DNA ژنومی، RNA استخراج شده با DNase I (Fermentas) و بر اساس دستورالعمل شرکت تیمار شد. ساخت cDNA با کیت Power cDNA Synthesis (Intron) طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از Oligo dT و آنزیم AMV RT انجام شد.

اندازه‌گیری بیان کمی ژن: مقایسات کمی در بیان ژن *Rboh* به روش Real time SYBER Green PCR و با استفاده از دستگاه ABI Step-One (Applied Biosystems, USA) و نرم‌افزار اختصاصی دستگاه (Software v2.1) انجام شد. ژن β -actin اختصاصی هندوانه وحشی (GH626171) به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده و به طور موازی با ژن هدف تکثیر شد و برای نرمال کردن و کمیت سنجی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده بر اساس نواحی حفاظت شده توالی *Rboh* هندوانه وحشی (EU580727.2) با استفاده از نرم‌افزار Beacon

ژن خانه دار β -actin نشان از تکثیر اختصاصی است. همچنین منحنیهای ذوب حاصل از دستگاه Real Time PCR حاکی از تکثیر تنها یک قطعه برای هر کدام از ژنهای فوق و نیز عدم تشکیل پرایمر دایمر در واکنش می‌باشد (شکل ۲).

محتوای نسبی آب (RWC): مقدار RWC برگها به طور معنی‌داری در هر دو گونه پس از اعمال تنش، نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. همچنین، گذشت زمان نیز بر کاهش مقدار RWC، دارای اثر معنی‌دار بود و بیشترین کاهش در زمان ۱۸ ساعت پس از تنش مشاهده شد. محتوای نسبی آب در نمونه‌های کنترل *C. colocynthis* و هندوانه زراعی در زمان صفر حدود ۹۰ درصد بود. پس از تیمار با PEG، محتوای نسبی آب برگ در هر دو گونه کاهش یافت (شکل ۳). به طوری که پس از ۹ ساعت در هندوانه زراعی و وحشی به ترتیب به ۵۰ درصد و ۶۸ درصد رسید. با این حال در *C. colocynthis* به تدریج RWC در سطح ۶۰ درصد تثبیت شد، درحالی که محتوای نسبی آب برگ هندوانه زراعی با افزایش زمان تیمار به ۱۸ ساعت تا ۳۰ درصد کاهش یافت و در نهایت منجر به پژمردگی برگها شد.



شکل ۱- الکتروفورز محصول واکنش QRT-PCR روی ژل آگارز ۲ درصد، خط ۱: خطکش مولکولی 50bp شرکت Fermentase، خط ۲: کنترل منفی β -actin، خط ۳: قطعه تکثیر شده از ژن β -actin، خط ۴: کنترل منفی *Rboh*، خط ۵: قطعه تکثیر شده از ژن *Rboh* به طول ۹۰ جفت باز، خط ۶: کنترل منفی *Rboh*، خط ۷: قطعه تکثیر شده از ژن *Rboh* به طول ۹۰ جفت باز

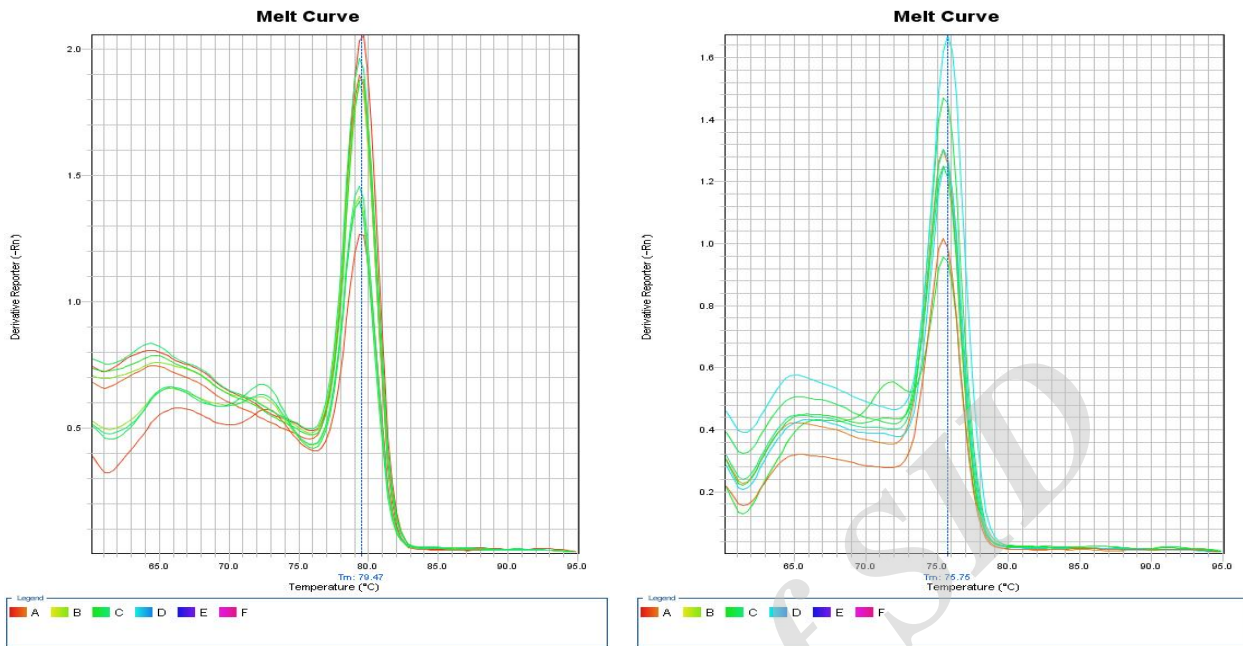
نتایج

QRT-PCR: برای اطمینان از انجام موفق و هدفمند PCR محصول واکنش که به روش QRT-PCR انجام شده بود، روی ژل آگارز ۲ درصد بارگیری شد (شکل ۱). وجود تک باندهای مربوط به قطعات ۹۰ جفت بازی از ژن *Rboh* و

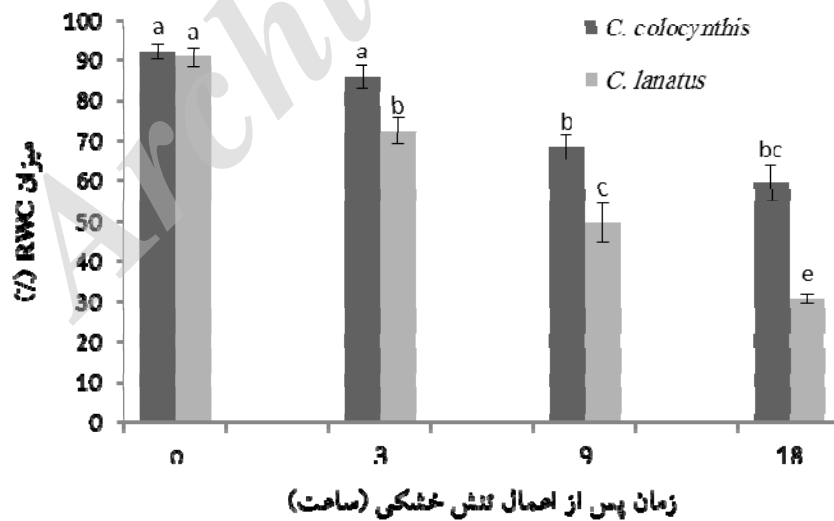
جدول ۲- تجزیه واریانس میزان نسبی آب و بیان نسبی ژن *Rboh*

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییر
بیان نسبی ژن <i>Rboh</i>	میزان نسبی آب		
۶/۲۸**	۱۴۵۷/۰۴**	۱	نوع گیاه
۱۵/۰۰**	۲۵۷۱/۴۹**	۳	زمان
۲/۵۳**	۲۱۳/۶**	۳	نوع گیاه*زمان
۰/۰۳۲	۷۵/۹۶	۱۶	خطا
۸/۵۰	۱۲/۷۵		ضریب تغییرات

*، **، ns به ترتیب، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیر معنی‌دار



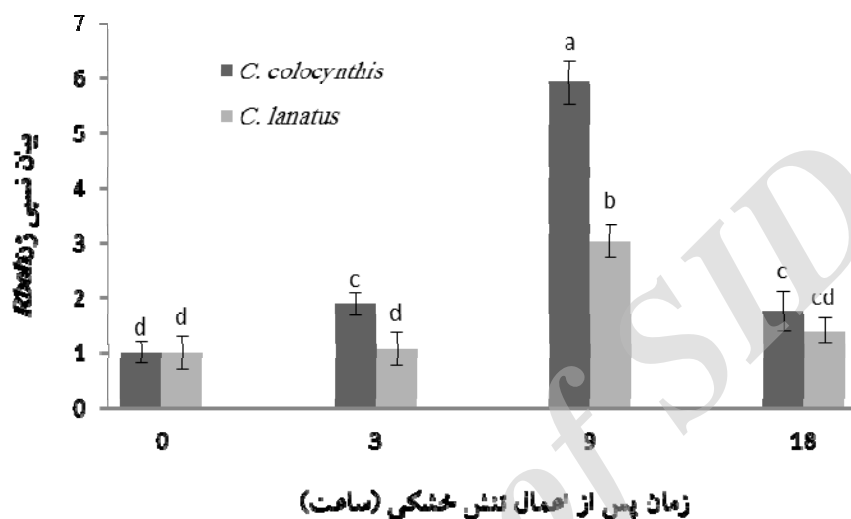
شکل ۲- منحنی ذوب محصولات تکثیر شده در واکنش QRT-PCR. ژن اکتین (سمت راست) و ژن *Rboh* (سمت چپ). وجود یک پیک بیانگر تکثیر فقط یک محصول در واکنش می‌باشد.



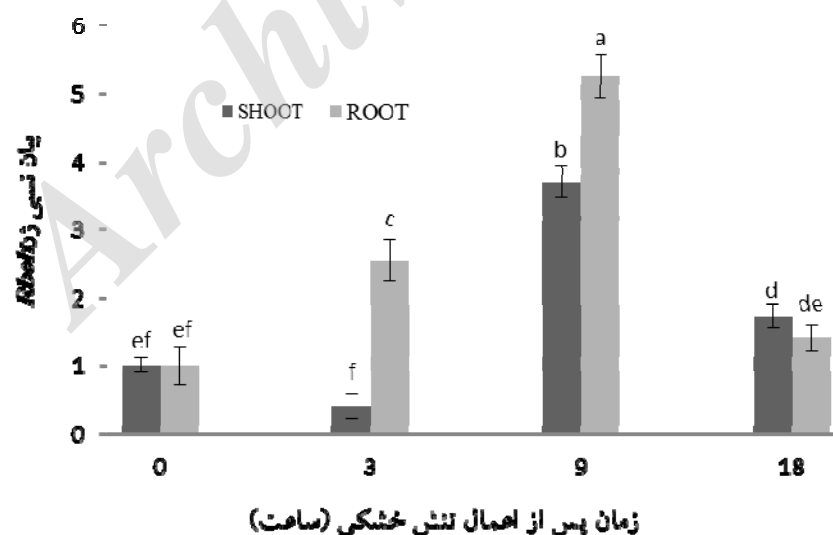
شکل ۳- اثر متقابل زمان و نوع گیاه بر میزان RWC. (میانگین‌ها حاصل ۳ تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون LSD است. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشند).

طوری که در این زمان بیان نسبی ژن *Rboh* در هندوانه وحشی و زراعی به ترتیب ۵/۹ و ۳ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت اما با افزایش زمان تیمار به ۱۸ ساعت کاهش قابل توجه و معنی‌داری در بیان ژن هر دو گونه مشاهده شد (شکل ۴).

بیان نسبی ژن *Rboh*: پس از اعمال تنش، به طور کلی میزان بیان نسبی ژن *Rboh* در هر دو گونه افزایش یافت اما رقم وحشی از سطح بیان نسبی بالاتری برخوردار بود و این سطح بیان نسبی در رقم وحشی و به ویژه پس از ۹ ساعت اعمال تنش به طور قابل ملاحظه‌ای القاء شد به



شکل ۴- مقایسه بیان نسبی ژن *Rboh* در دو گونه *C. lanatus* و *C. colocynthis* در زمان‌های متفاوت پس از اعمال تنش خشکی (PEG). (حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون LSD است. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشند.)



شکل ۵- مقایسه بیان نسبی ژن *Rboh* در ریشه و ساقه گیاه *C. colocynthis* در زمان‌های متفاوت پس از اعمال تنش خشکی (PEG). (حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون LSD است. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشند.)

گیری شد. کاهش RWC برگ گیاهان تیمار شده و تثبیت میزان آن در برگ هندوانه وحشی در سطح ۶۰ درصد و کاهش میزان آن در هندوانه زراعی تا پژمردگی برگها بیانگر این است که *C. colocynthis* دارای برخی مکانیسمهای مقابله با تنش خشکی می‌باشد.

آنالیز بیان نسبی ژن با استفاده از Real-time PCR در این مطالعه نشان داد که تنش خشکی به طور معنی داری باعث افزایش بیان نسبی ژن *Rboh* در بخشهای هوایی و ریشه گیاه *C. colocynthis* شد. به عبارت دیگر خشکی باعث تنظیم مثبت ژن *Rboh* در این گیاه شده است. هر چند که بیان نسبی این ژن در گیاه *C. lanatus* نیز تحت تأثیر خشکی قرار گرفت اما این افزایش فقط در زمان ۹ ساعت بعد از تنش خشکی قابل ملاحظه بوده و در مقایسه با افزایش سطح بیان نسبی در *C. colocynthis* در همان زمان نیز کمتر بود. تنظیم الگوهای بروز مکانی و زمانی ژنهای ویژه تنش، بخشی مهم از واکنش به تنش در گیاهان است. این مطالعه نشان داد که میزان بیان نسبی ژن *Rboh* در ریشه و ساقه گیاه *C. colocynthis* متفاوت است. به طوری که القاء در ریشه ها سه ساعت زودتر رخ داد و بین زمان ۳ تا ۹ ساعت به بیشترین مقدار خود رسید. در حالی که در ساقه ها بین زمان ۹ تا ۱۸ ساعت اوج مقدار بیان نسبی مشاهده شد. که این میزان در مقایسه با ساقه ها نیز رقم کمتری بود. این مشاهدات می‌تواند نشان دهنده وابسته به بافت بودن الگوی بیان ژن در این گیاه باشد. اختلاف وابسته به بافت در الگوی بیان نسخه‌های ژنی تحت تأثیر تنشهای مختلف بین ریشه و ساقه در بسیاری گونه‌های گیاهی گزارش شده است (۳، ۱۴ و ۱۸).

در مطالعه‌ای Si و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند تغییرات بیان ژن تحت تنش خشکی در ریشه‌های گیاه هندوانه وحشی ۴ ساعت زودتر از ساقه‌ها رخ داد که نشان دهنده واکنش زودتر ریشه‌ها به خشکی نسبت به ساقه‌ها می‌باشد، و ممکن است برخی سیگنالها همچون ABA از

همچنین بررسی سطوح بیان نسبی ژن *Rboh* در پی اعمال تنش خشکی (PEG)، حاکی از افزایش بیان نسبی *Rboh* هم در ریشه و هم در ساقه هر دو رقم بود. با این تفاوت که القاء در ریشه زودتر از ساقه رخ داد. بیشترین سطح القاء در ریشه‌ها در بین زمانهای ۳ و ۹ ساعت مشاهده شد و پس از آن تا زمان ۱۸ ساعت روند نزولی گردید. در ساقه‌ها نیز بیشترین القاء در زمان ۹ ساعت رخ داد اما این میزان در مقایسه با ریشه کمتر بوده و همچنین بین زمان صفر و ۳ ساعت میزان القاء کاهش نشان داد (شکل ۵).

بحث

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که تولید ROS و فعالیت Nox (NADPH oxidase) در گیاهان تحت تأثیر استرسهای محیطی مختلف شامل خشکی (۱، ۳ و ۴)، ABA، تیمار Ca^{2+} (۱۱) و تیمار نیکل (۸) القاء می‌شود. همچنین تولید ROS به عنوان یک مکانیسم تنظیمی مهم در درک و پاسخ گیاهان به تنشها بوده (۲) و Noxها به عنوان یک مرکز مولکولی مهم در هنگام علامت دهی وابسته به ROS در پاسخ گیاهان به تنش عمل می‌کنند (۱۹).

پروتئینهای مختلف Nox در آراییدوپسیس عملکردهای متفاوتی نشان داده‌اند (۱۹). برای مثال، RbohC در رشد راسی ریشه‌های موئین ایفای نقش می‌کند (۳۱)، RbohB در بذر، پس از رسیدن آن عمل می‌کند (۲۳) و RbohD و RbohF در پاسخ به پاتوژن و بسته شدن روزنه‌ها عمل می‌کنند (۳۸). اگرچه مکانیسم عملکرد RbohD و RbohF در پاسخ به تنشها مشابه است، اما مشخص شده RbohD فعالیت بیشتری در تولید ROS دارد (۱۶) که نشان دهنده تنوع در فعالیت آنها است. در ذرت ۴ ژن کد کننده پروتئینهای Nox کلون شده و مشخص شده است که سطح بیان آنها تحت تأثیر ABA متفاوت می‌باشد (۱۷).

در این پژوهش به منظور تأیید القای شرایط تنش خشکی پس از استفاده از PEG محتوای آب نسبی برگ اندازه

نتایج این تحقیق می‌تواند گامی در راستای آنالیز عملکردی *Rboh* و کاربرد آن در ارتقا کیفیت ژنتیکی گیاه در شرایط تنش کم آبی باشد. البته مطالعات بیشتر از جمله تشخیص تنظیم سیستم علامت‌دهی که تولید و فعالیت *Rboh* را کنترل می‌کند، همچنین بررسی میزان بیان این ژن در مراحل مختلف رشد و نمو، دانش نقش بیولوژیکی و عملکرد *Rboh* در رشد و نمو گیاه و همچنین پاسخ به استرس‌های گوناگون زیستی و غیرزیستی را افزایش خواهد داد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت و پشتیبانی مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور انجام شده است که بدین وسیله تشکر قدردانی می‌شود.

ریشه به ساقه منتقل شوند تا بیان ژن را در ساقه‌ها تنظیم کنند (۲۸). شناسایی و سهم نسبی سیگنالها در ریشه تحت تأثیر تنش کم آبی هنوز هم بحثی چالش بر انگیز است (۳۵) اما به نظر می‌رسد *Rboh* به عنوان یک میانجی حساس، چند منظوره و قویاً تنظیم شده از سیگنالهای محیطی و رشدی باشد (۱۳).

برای بالا بردن کیفیت و بازدهی هندوانه زراعی معمولاً آن را به یک گیاه پایه مقاوم پیوند می‌زنند. ویژگیهای ریشه از اولین اولویتها در تعیین تحمل به خشکی در گونه‌های مختلف گیاهان است (۵، ۱۰ و ۲۶). با توجه به رویش هندوانه وحشی در مناطق خشک و بیابانی و از آنجایی که در این تحقیق بیان نسبی ژن *Rboh* در هندوانه وحشی تحت تأثیر تنش خشکی افزایش نشان داد، شاید بتوان از این گیاه به عنوان یک پایه بالقوه برای پیوند به هندوانه زراعی و یا برای بهبود تحمل به خشکی از طریق دستکاری ژنتیکی استفاده کرد.

منابع

- امینی، ز و حداد، ر (۱۳۹۲) نقش رنگیزه‌های فتوستتزی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (زیست‌شناسی ایران). جلد ۲۶، شماره ۳، صفحه ۲۵۱-۲۶۵.
- فرزانه، م، معتمد، ن، رستگار جزی، ف. و ابراهیم زاده، ح. (۱۳۹۳) افزایش بیان ژن P5CS در گیاهچه زیتون تحت تنش شوری. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (زیست‌شناسی ایران). جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۱۱۹-۱۲۴.
- Baisakh N, Subudhi PK, and Parami NP. (2006) cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. Plant Science. 170(6): 1141-1149.
- Duan ZQ, Bai L, Zhao ZG, Zhang GP, Cheng FM, Jiang LX, and Chen KM. (2009) Drought-Stimulated Activity of Plasma Membrane Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase and Its Catalytic Properties in Rice. Journal of integrative plant biology. 51(12): 1104-1115.
- Fernández-García N, Martínez V, Cerdá A, and Carvajal M. (2002) Water and nutrient uptake of grafted tomato plants grown under saline conditions. Journal of Plant Physiology. 159(8): 899-905.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, and Jones JD. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature. 422(6930): 442-446.
- Frahry G and Schopfer P. (2001) NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay. Planta. 212(2): 175-183.
- Hao F, Wang X, and Chen J. (2006) Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. Plant Science. 170(1): 151-158.
- Hussain AI, Rathore HA, Sattar MZ, Chatha SA, Sarker SD, and Gilani AH. (2014) *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): a review of its phytochemistry, pharmacology,

- traditional uses and nutritional potential. *Journal of Ethnopharmacology*. 155(1): 54-66.
10. Jensen PJ, Rytter J, Detwiler EA, Travis JW, and McNellis TW. (2003) Rootstock effects on gene expression patterns in apple tree scions. *Plant molecular biology*. 53(4): 493-511.
 11. Jiang M and Zhang J. (2003) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant, Cell & Environment*. 26(6): 929-939.
 12. Kar RK. (2011) Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. *Plant Signal Behavior*. 6(11): 1741-5.
 13. Kaur G, Sharma A, Guruprasad K, and Pati PK. (2014) Versatile roles of plant NADPH oxidases and emerging concepts. *Biotechnology advances*. 32(3): 551-563.
 14. Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, and Bohnert HJ. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell*. 13(4): 889-905.
 15. Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, and Lamb C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cell*. 10(2): 255-266.
 16. Kimura S, Kaya H, Kawarazaki T, Hiraoka G, Senzaki E, Michikawa M, and Kuchitsu K. (2012) Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1823(2): 398-405.
 17. Lin F, Ding H, Wang J, Zhang H, Zhang A, Zhang Y, Tan M, Dong W, and Jiang M. (2009) Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. *Journal of Experimental Botany*. erp157.
 18. Liu X and Baird WV. (2003) The ribosomal small-subunit protein S28 gene from *Helianthus annuus* (Asteraceae) is down-regulated in response to drought, high salinity, and abscisic acid. *American journal of botany*. 90(4): 526-531.
 19. Marino D, Dunand C, Puppo A, and Pauly N. (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in plant science*. 17(1): 9-15.
 20. Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, and Mittler R. (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*. 2(84): ra45-ra45.
 21. Monshausen G, Bibikova T, Messerli M, Shi C, and Gilroy S. (2007) Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(52): 20996-21001.
 22. Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, and Gilroy S. (2009) Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in Arabidopsis roots. *The Plant Cell*. 21(8): 2341-2356.
 23. Müller K, Carstens AC, Linkies A, Torres MA, and Leubner-Metzger G. (2009) The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening. *New Phytologist*. 184(4): 885-897.
 24. Müller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszka A, and Leubner-Metzger G. (2009) In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*. 150(4): 1855-1865.
 25. Rahimi R, Amin G, and Ardekani MR. (2012) A review on *Citrullus colocynthis* Schrad.: from traditional Iranian medicine to modern phytotherapy. *Journal of Alternative Complementary Medicine*. 18(6): 551-4.
 26. Ruiz JM, Ríos JJ, Rosales MA, Rivero RM, and Romero L. (2006) Grafting between tobacco plants to enhance salinity tolerance. *Journal of plant physiology*. 163(12): 1229-1237.
 27. Shafaei H, Rad JS, Delazar A, and Behjati M. (2014) The effect of pulp and seed extract of *Citrullus Colocynthis*, as an antidiabetic medicinal herb, on hepatocytes glycogen stores in diabetic rabbits. *Advanced Biomedical Research*. 3: 258.
 28. Si Y, Zhang C, Meng S, and Dane F. (2009) Gene expression changes in response to drought stress in *Citrullus colocynthis*. *Plant Cell Report*. 28(6): 997-1009.
 29. Smart RE and Bingham GE. (1974) Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*. 53(2): 258-260.

30. Swanson S and Gilroy S. (2010) ROS in plant development. *Physiologia Plantarum*. 138(4): 384-392.
31. Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, and Dolan L. (2008) Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science*. 319(5867): 1241-1244.
32. Torres MA and Dangl JL. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current opinion in plant biology*. 8(4): 397-403.
33. Torres MA, Dangl JL, and Jones JD. (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(1): 517-522.
34. Torres MA, Jones JD, and Dangl JL. (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology*. 141(2): 373-378.
35. Wi SJ, Kim SJ, Kim WT, and Park KY. (2014) Constitutive S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression increases drought tolerance through inhibition of reactive oxygen species accumulation in Arabidopsis. *Planta*. 239(5): 979-88.
36. Yetisir H, Çaliskan ME, Soylu S, and Sakar M. (2006) Some physiological and growth responses of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai] grafted onto *Lagenaria siceraria* to flooding. *Environmental and experimental botany*. 58(1): 1-8.
37. Yetisir H and Sari N. (2003) Effect of different rootstock on plant growth, yield and quality of watermelon. *Animal Production Science*. 43(10): 1269-1274.
38. Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, and Wang X. (2009) Phospholipase Dα1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 21(8): 2357-2377.

Comparative expression of *Rboh* gene in *Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis* under drought stress

Salahi N., Soleimani Z., Safipour Afshar A. and Saeid Nematpour F.

Biology Dept., Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, I.R. of Iran

Abstract

Citrullus colocynthis is a very drought tolerant cucurbit species which widely distributed in the deserts of Mediterranean region and Middle East. One of the possible mechanisms involved in the tolerance response of this plant could be overexpression of *Rboh* gene which its protein product are involved in the production of ROS signal molecules. In this research, *Rboh* gene expression during drought stress, were studied in *C. colocynthis* and watermelon. Seeds after sterilization and germination in germinator transfer to pots containing sand and 5 leave plants treated by PEG 8000 15%. At times zero, 3, 9, 18 hours after treatment relative water content of leaves and Quantitative gene expression of *Rboh* by Real Time PCR method was studied. The results showed a significant decrease in relative water content in both species but in *C. colocynthis* this decrease was less remarkably. After PEG treatment the expression of *Rboh* increased in two species but expression level in *C. colocynthis* was more than watermelon. Expression of *Rboh* which play an important role in response to stress stimulus, was rapidly and strongly induced by PEG treatment in *C. colocynthis* rather than *C. lanatus*. The result can be a confirmation that *Rboh* Play a critical role in *C. colocynthis* tolerant against the drought stress.

Key words: *C. colocynthis*, *C. lanatus*, Real Time PCR, RWC, Watermelon.