

ارزیابی میزان بیان برخی از ژن‌های تحمل به خشکی و تغییرات آنزیمی در ارقام منوژرم چغندر قند

سعید نواب‌پور*، سیده ساناز رمضانپور، احد یامچی، علی اصغر نصراله نژاد، سید حسین شفاپور و ابوالفضل مازندرانی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۰۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۹۸/۰۲/۱۸)

چکیده

چغندر قند یکی از گیاهان استراتژیک و صنعتی دنیا محسوب می‌گردد و نقش مهمی در تولید قند دارد. خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید چغندر قند است. بر این اساس این آزمایش در قالب طرح کرت‌های خردشده بر پایه طرح بلوک کاملاً تصادفی در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ با چهار تکرار در منطقه چناران روستای بهمن جان انجام شد. فاکتور اصلی آزمایش شامل سه دور آبیاری ۷ و ۱۴ و ۲۱ روز به‌روش قطره‌ای و فاکتور فرعی مشتمل بر چهار رقم (شامل ارقام خارجی سمنتا و پیرولا و ارقام داخلی شامل پایا (۰۱۶) و شکوفا (۰۳۴)) بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد با افزایش فواصل آبیاری از ۷ به ۲۱ روز موجب کاهش عملکرد ریشه چغندر قند از ۸۸/۷ تن در هکتار گردید. همچنین با افزایش فواصل آبیاری از ۷ به ۲۱ روز میزان اکسیداسیون سلولی که بر آوردی از فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن است، افزایش نشان داد که در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز (۲۱/۸ میکرومول بر گرم وزن تر) بیشترین مقدار آن مشاهده شد. بیشترین مقدار آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب ۱۱۹ و ۱۴۸۱ واحد استاندارد بر میلی‌گرم پروتئین بود که به ترتیب در تیمارهای آبیاری هر ۱۴ و هر ۲۱ روز مشاهده شد. نتایج بیان ژن‌های CPX1، CPX2 و NDP حاکی از افزایش میزان بیان ژن سه تحت شرایط بروز تنش خشکی بود که مبین نقش آنها در القای تحمل به خشکی بود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش خشکی، سوپراکسید دیسموتاز، چغندر قند، کاتالاز

مقدمه

خشکسالی‌ها در ایران نشان می‌دهد اقلیم ایران به‌سوی خشکی بیشتر پیش می‌رود (زارع و همکاران، ۱۳۸۳). چغندر قند یکی از محصولات زراعی با سطح کشت بسیار وسیع در ایران و جهان است. با توجه به اهمیت این محصول در چرخه غذایی کشورمان به‌نظر می‌رسد مطالعه تحمل به خشکی در ارقام مناسب و پرمحصول می‌تواند راهکار مؤثری برای کاهش هدررفت آب در بخش کشاورزی باشد (خورشید و همکاران،

براساس آمار موجود، ۴۰ درصد از کره زمین جز مناطق خشک، نیمه‌خشک و خشک نیمه‌مرطوب است. پدیده خشکسالی از نظر فراوانی، شدت و تداوم گسترش یکی از فرایندهای مهم در اکثر کشورهای جهان به‌خصوص کشور ما محسوب می‌گردد. حدود ۶۰ درصد از اراضی کشور در گستره اقلیم خشک و نیمه‌خشک واقع شده‌اند و بررسی روند

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: S.navabpour@yahoo.com

مزرعه آقای علی شیرافکن با بافت خاک متوسط (رسی - شنی) انجام شد. فاکتور اصلی آزمایش شامل سه دور آبیاری ۷ و ۱۴ و ۲۱ روز به روش قطره‌ای و فاکتور فرعی مشتمل بر چهار رقم (شامل ارقام خارجی از شرکت KWS آلمان که عبارتند از سمنتا و پیرولا و ارقام داخلی شامل پایا (۰۱۶) و شکوفا (۰۳۴) بود. تیمار آبیاری شامل آبیاری نرمال (۷ روز)، تنش خشکی ملایم (۱۴ روز) و تنش خشکی شدید (۲۱ روز) بود. از هر رقم ۴ ردیف به طول ۸ متر در زمینی به مساحت تقریبی ۱۸۰۰ مترمربع کشت شد و فاصله ردیف‌ها از هم ۵۰ سانتی‌متر بود؛ همچنین بین کرت‌ها یک ردیف نکاشت و بین بلوک‌ها هم خیابانی به عرض یک متر ایجاد شد. پس از رسیدن گیاه به مرحله رشد فیزیولوژیک (زمان برداشت محصول) برای اندازه‌گیری عملکرد ریشه در مورد کلیه ارقام در شرایط نرمال و تنش خشکی، از هر واحد آزمایشی با حذف حاشیه‌ها به‌طور تصادفی از هر ردیف در هر کرت ۵ بوته برداشت و توزین گردید. برای اندازه‌گیری صفات مولکولی و بیوشیمیایی مورد بررسی شامل میزان بیان ژن‌های تحمل به خشکی (*CPx 1*، *CPx 2* و *NDP*)، کلروفیل، میزان پرولین، سطح اکسیداسیون سلولی (*TBARM*) و میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، نمونه‌گیری از بافت برگ در سه مرحله شامل: هفت روز پس از آبیاری، چهارده روز پس از آبیاری و بیست و یک روز پس از آبیاری انجام شد. پنج برگ به‌طور تصادفی از هر تیمار برداشته شد، سپس داخل فویل آلومینیومی قرار گرفته و بلافاصله در نیتروژن مایع تا زمان رسیدن به آزمایشگاه منجمد شدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایش نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: برگ‌ها پس از شستشو با آب مقطر در محلول بافر فسفات - تریس ۰/۱۶ مول (pH=7.5) وارد، خرد و یکنواخت شد. سپس حجم مشابه بافر حاوی دیجیتونین آنزیم هضم‌کننده دیواره اضافه نموده تا فرآیند هضم غشا و دیواره‌های سلولی صورت گیرد. میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول یکنواخت‌شده برای سنجش پروتئین به روش لوری و رادال (Lowry and Radall, 1951)

(۱۳۸۳). مقاومت به خشکی صفت پیچیده‌ای است که بروز آن بستگی به برهم‌کنش میان صفات مختلف مورفولوژیکی (زودرسی، کاهش سطح برگ، لوله‌ای شدن برگ، میزان موم، سیستم ریشه‌ای کارآمد، پایداری عملکرد)، فیزیولوژیکی (کاهش تعرق، افزایش راندمان مصرف آب، بسته شدن روزنه‌ها و تنظیم اسمزی) و بیوشیمیایی (تجمع پرولین، پلی‌آمین، ترهالوز، افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و افزایش ذخیره‌سازی کربوهیدرات‌ها) دارد. مکانیزم‌های ژنتیکی کنترل‌کننده این صفات چندان شناخته شده نیستند (عروج‌نیا و همکاران، ۱۳۹۱). از آنجایی که درک درست از نحوه پاسخ گیاهان در سطح ژن به تنش آبی برای نگهداری محصول و بهبود تولید ضروری است، تلاش‌های تحقیقاتی اخیر در جهت شناسایی ژن‌های القایی به تنش آبی و پاسخ مولکولی گیاه متمرکز شده است. در این زمینه تکنیک‌های متداول مورد استفاده برای تعیین کمیت سطح نسبی بیان ژن، ریز آرایه (*micro array*) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (*RT-PCR*) است (Nolan et al., 2006). تجزیه و تحلیل با استفاده از ریز آرایه‌ها جهت استفاده در مقیاس بزرگ (به‌عنوان مثال کل ژنوم) ترجیح داده می‌شود، در حالیکه روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی به روش انتخابی برای اندازه‌گیری سطح بیان ژن در نمونه‌های متعدد که شامل تعداد محدودی از ژن‌ها است تبدیل شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی تعیین مقدار دقیق و حساس رونوشت ژن را حتی برای آن دسته از ژن‌هایی که سطوح رونوشت نسبتاً کمی دارند فراهم می‌کند (Vanguilder et al., 2008). با توجه به مطالب ذکرشده، این مطالعه جهت ارزیابی بیان افتراقی برخی ژن‌های مهم در القای تحمل به تنش خشکی به‌همراه تغییرات آنزیمی و عملکرد ریشه صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش در قالب طرح کرت‌های خردشده بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ با چهار تکرار در استان خراسان رضوی، شهرستان چناران، روستای بهمن جان

Reactive Material: در این سنجش که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است مقدار تیوباریبورتیک اسید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ حیاتی است اندازه‌گیری می‌شود. در این خصوص از روش Hagege و همکاران (۱۹۹۰) با تغییراتی استفاده گردید. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ را هموژنیزه نموده و یک میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (۱۵ w/v) به آن اضافه شد. محلول حاضر را با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به شدت مخلوط نموده (ورتکس) و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب کوچکی که پس از سانتریفوژ حاصل شد را با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو داده، ورتکس و مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نموده و آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر H_3PO_4 (۱٪) و یک میلی‌لیتر تیوباریبورتیک اسید (۰/۶ w/v) افزوده و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد سپس واکنش با سردکردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف گردید. مقدار جذب محلول حاصل با طول‌موج ۵۳۲ و ۵۹۰ به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Uvikon930 watford) اندازه‌گیری شد.

استخراج RNA: جهت استخراج RNA، یک میکرولیتر از بافر بایوزول (BIOZOL) شرکت فرمتاز داخل تیوب ریخته شد و ۰/۱ گرم برگ کوبیده شده به آن اضافه گردید. سپس نمونه با دست تکان داده شد و ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به این مایع اضافه گردید و ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز بالایی تیوب که حاوی مایع شفاف بود، به تیوب دیگری منتقل گردید و به همان میزان ایزوپروپانول به آن اضافه گردید و بعد از ۵-۴ بار تکان دادن در داخل فریزر ۲۰- به مدت زمان ۲۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از بیرون آوردن نمونه از فریزر مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، قسمت شفاف بالای تیوب حذف شد و پلت ایجاد شده جدا

برداشته شد و مقدار پروتئین آن بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. در باقیمانده محلول استخراجی فوق مقدار هر یک از آنزیم‌ها با روش‌های زیر تعیین گردید.

میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کل (Giannopolitis and Ries 1977) به شرح زیر اندازه‌گیری شد. یک گرم نمونه برگ منجمد ساییده و همگن گردید. سپس مقدار ۰/۱ گرم آن و ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش شامل (بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM، pH=7.8، متیونین ۱۳ mM، تترازایلوم $0.75 \mu M$ ، ریوفلاوین $2 \mu M$ ، EDTA ۰/۱ mM و $100 \mu l$ آنزیم استخراج) مخلوط و یکنواخت شد. مخلوط در شرایط نوری ۵۰۰۰ لوکس به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شده و کالیبراسیون با افزودن یک واحد آنزیم سوپراکسید برای احیا ۵۰ درصد تترازایلوم افزوده و میزان فعالیت با طول‌موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری خوانده شد.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز I با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴) به شرح زیر تعیین گردید. ۰/۵ گرم نمونه یخ‌زده برگ کوبیده و به میزان ۰/۱ آن در ۳ میلی‌لیتر بافر واکنش شامل (بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM، pH=7.8، استاندارد هیدروژن پراکسید و آنزیم استخراج $200 \mu l$) مخلوط و یکنواخت شد. میزان جذب محلول در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری خوانده گردید.

اندازه‌گیری کلروفیل: برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل از روش Pora و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد. در این روش، مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ منجمد، کاملاً خرد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط گردید. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با دور ۳۰۰۰ rpm، مقدار ۲ میلی‌لیتر از سوپ بالایی نمونه در کوت ریخته و میزان جذب (A) در طول‌موج‌های $663/6$ و $646/6$ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر WAP مدل S۲۰۰۰ UV/vis ثبت گردید. میزان کلروفیل (Chla) a و کلروفیل (Chlb) b و کل کلروفیل براساس فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$Chla (mg.gr^{-1}) = 12.25 A_{663.6} - 2.55 A_{646.6}$$

$$Chlb (mg.gr^{-1}) = 20.31 A_{646.6} - 4.91 A_{663.6}$$

اندازه‌گیری TBARM (Thiobarbituric Acid)

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژنهای مورد مطالعه

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای ذوب	طول محصول واکنش	شماره دسترسی در پایگاه NCBI
CPx1	For: 5'-AAGCTCATGCTCCAATGGC-3' Rev: 5'-GAGATAGACTTGGTGACATCGG-3'	۵۸	۴۴۹	BI096062
CPx2	For: 5'-GTCTCATCAACTACGGCC-3' Rev: 5'-CCTCTCGTCGCACTCAATC-3'	۵۷	۴۶۹	AW067625
NDP	For: 5'-GATCAAGCCTGATGGTGTCC-3' Rev: 5'-GCTCTGCCAGTGGACAACA-3'	۵۹	۳۶۱	BI543256
18S rRNA	For: 5'-TGACGGAGAATTAGGGTTCG-3' Rev: 5'-CCCCAATGGATCCTCGTTA-3'	۵۹	۲۰۰	-

رشته cDNA، در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی (Real-Time PCR) استفاده شد. این روش با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I (ساخت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران) و در دستگاه iQ5 (شرکت بیورد، آمریکا) انجام شد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار 18S rRNA که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها است، استفاده شد. مشخصات آغازگرهای مورد بررسی که با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی شد در جدول ۱ آمده است. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Rest مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز داده‌ها: تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.2 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل 2010 انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی و عملکرد ریشه تحت تنش خشکی: نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه (جدول ۲) نشان داد اثر بلوک برای تمامی صفات غیرمعنی‌دار و اثر تنش، رقم و اثر متقابل تنش در رقم برای تمامی صفات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید.

کلروفیل a: نتایج مقایسه میانگین اثر تنش بر روی میزان کلروفیل a (جدول ۳) نشان داد با افزایش تنش خشکی مقدار کلروفیل a افزایش یافت و اختلاف بین تیمارها معنی‌دار گردید. بیشترین و کمترین میزان کلروفیل a، ۷/۲۱ و ۵/۸۲

گردید و ۱ میلی‌لیتر اتانول به آن اضافه شد. تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید و دوباره فاز بالایی حذف گردید و پلت RNA در دمای اتاق خشک شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر آب مقطر، به پلت ایجادشده اضافه گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده به ترتیب با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید.

ساخت cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی (Real-Time PCR):

به‌میزان ۵ میکرولیتر از هر نمونه RNA بعد از تیمار DNaseI داخل تیوب ریخته شد و به هر تیوب ۱ میکرولیتر آغازگر oligodT اضافه گردید. سپس ۵ میکرولیتر آب DEPC افزوده شد تا به حجم ۱۱ برسد و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. ۴ میکرولیتر بافر ۵x ساخت cDNA، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP با غلظت ۱۰ میکرومولار و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Ribolock Rnase inhibitor اضافه و با آب DEPC به حجم ۱۹ میکرولیتر رسید. سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه قرار داده شدند و ۱ میکرولیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (Revert Aid M.Mulv) شرکت فرمنتاز اضافه شده و مخلوط واکنش در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت قرار گرفت و جهت توقف واکنش، برای ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و در نهایت به‌میزان ۳۸۰ میکرولیتر به آن آب مقطر اتوکلاو شده اضافه گردید. از این

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی و عملکرد ریشه تحت تنش خشکی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				کلروفیل a	کلروفیل b	اکسیداسیون سلولی	آنزیم کاتالاز	آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز	عملکرد ریشه
		اکسیداسیون سلولی	آنزیم کاتالاز	آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز	عملکرد ریشه						
تنش	۲	۰/۱۰۹ ^{ns}	۰/۰۲۹ ^{ns}	۰/۳۲۳ ^{ns}	۱۱۱ ^{ns}	۲۳۵/۶ ^{ns}	۵/۱۳ ^{ns}				
خطای ۱	۶	۰/۰۹۶	۰/۰۱۶	۰/۲۹۲	۷۱/۱	۱۵۸/۳	۵/۹۵				
رقم	۳	۶/۶۰ ^{**}	۰/۹۳۶ ^{**}	۱۹/۵ ^{**}	۳۵۳۷ ^{**}	۵۱۹۳۷ ^{**}	۲۳۴ ^{**}				
تنش × رقم	۲	۰/۴۱۵ ^{**}	۰/۳۷۴ ^{**}	۲/۳۸ ^{**}	۸۲۲ ^{**}	۳۴۲۲ ^{**}	۳۲/۴ ^{**}				
خطای ۲	۲۷	۰/۰۴۴	۰/۰۱۱	۰/۲۰۷	۴۸/۹	۹۷/۹	۵/۱۲				
ضریب تغییرات	-	۲/۴	۲/۱	۳/۲	۳/۴	۴/۶	۳/۳				

ns و ** به ترتیب، غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

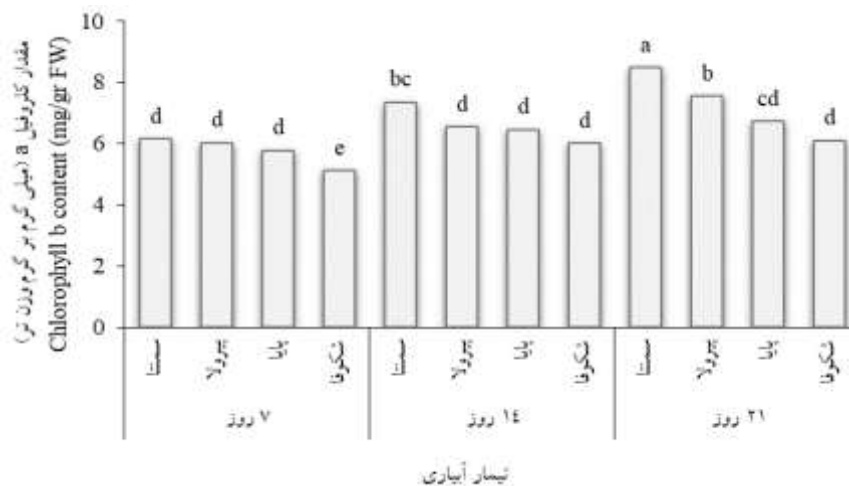
جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات ساده صفات بیوشیمیایی و عملکرد ریشه تحت تنش خشکی

صفات	کلروفیل a	کلروفیل b	اکسیداسیون سلولی (میکرومول بر گرم وزن تر)	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	عملکرد ریشه (تن در هکتار)	مقادیر	
							برگ	پایه
تنش خشکی	۵/۷۶ ^c	۱/۹۸ ^b	۹/۸۷ ^c	۹۱/۶ ^c	۱۳۷۲ ^c	۸۸/۷ ^a	۷ روز	۱۴ روز
	۶/۵۸ ^b	۲/۶۴ ^a	۱۵/۴ ^b	۱۱۹ ^a	۱۴۴۸ ^b	۸۳/۱ ^b	۲۱ روز	
رقم	۷/۲۱ ^a	۲/۹۱ ^a	۲۱/۸ ^a	۱۱۷ ^a	۱۴۸۱ ^a	۷۶/۱ ^c	سمتا	پیرولا
	۷/۳۲ ^a	۲/۹۸ ^a	۱۳/۷ ^c	۱۲۵ ^a	۱۴۵۶ ^a	۸۹/۱ ^a	پایه	شکופا
	۶/۷۰ ^b	۲/۸۴ ^a	۱۵/۲ ^b	۱۱۰ ^b	۱۴۵۰ ^a	۸۸/۳ ^a		
	۶/۳۱ ^b	۲/۱۹ ^b	۱۵/۴ ^b	۱۰۷ ^b	۱۴۲۹ ^b	۷۹/۷ ^b		
	۵/۷۳ ^c	۲/۰۴ ^b	۱۸/۵ ^a	۹۵/۸ ^c	۱۳۹۹ ^c	۷۳/۵ ^c		

مقادیری که دارای حروف مشابه هستند اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

ارقام افزایش یافت و در شرایط آبیاری هر ۱۴ و ۲۱ روز مقدار کلروفیل a در رقم سمتا (به ترتیب ۷/۳۵ و ۸/۴۷ میلی گرم بر گرم وزن تر) بیشتر از سایر ارقام بود و اختلاف معنی داری با سایر ارقام نشان داد. در تیمار آبیاری هر ۷ و ۱۴ روز اختلاف بین مقدار کلروفیل a در ارقام پیرولا و پایا معنی دار نبود اما در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز مقدار کلروفیل a در رقم پیرولا افزایش بیشتری یافت و اختلاف آن با رقم پایا معنی دار گردید. مقدار کلروفیل a در رقم شکوفای تیمار آبیاری هر ۷ روز ۵/۱

میلی گرم بر گرم وزن تر بود که به ترتیب در تیمار آبیاری هر ۲۱ و ۷ روز مشاهده شد. این نتایج با نتایج Nadali و همکاران (۲۰۱۰) مبنی بر افزایش معنی دار محتوای کلروفیل برگ چغندر قند تحت تنش خشکی مطابقت داشت. طبق گزارش Mensha و همکاران (۲۰۰۶) میزان کلروفیل برگ در کنجد تحت تنش خشکی افزایش یافت و تا پایان فصل بدون تغییر باقی ماند. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × رقم (شکل ۱) نشان داد با افزایش فواصل آبیاری مقدار کلروفیل a در همه



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر تنش × رقم بر روی محتوای کلروفیل a. میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ براساس آزمون LSD نیستند.

کلروفیل b در رقم پیرولا بیشترین افزایش را نشان داد و مقدار آن به ۳/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید و این درحالی بود که اختلاف آن با محتوای کلروفیل b رقم سمتا (۲/۹۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) معنی‌دار نگردید. در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز شرایط متفاوت بود و رقم سمتا بیشترین محتوای کلروفیل b (۳/۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را نشان داد و اختلاف آن با سایر ارقام معنی‌دار گردید. در تمامی تیمارهای آبیاری رقم شکوفا کمترین مقدار محتوای کلروفیل b را دارا بود اما اختلاف آن با رقم پایا معنی‌دار نبود.

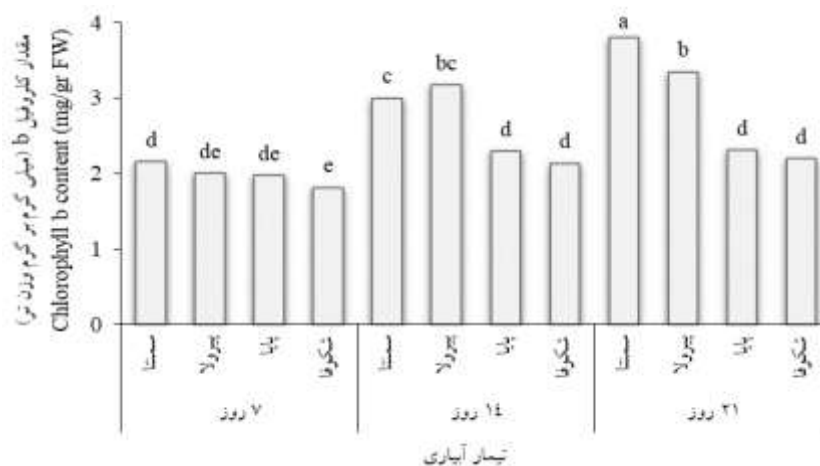
اکسیداسیون سلولی: مقایسه میانگین اثر تنش خشکی بر میزان اکسیداسیون سلولی (جدول ۳) نشان داد با افزایش فواصل آبیاری و بروز تنش خشکی مقدار اکسیداسیون سلولی در برگ افزایش یافته و بیشترین و کمترین مقدار اکسیداسیون سلولی (۲۱/۸ و ۹/۸۷ میکرومول بر گرم وزن تر) به ترتیب در تیمارهای آبیاری هر ۲۱ و ۷ روز مشاهده گردید و اختلاف بین تیمارها معنی‌دار گردید. به‌طور کلی بروز تنش خشکی موجب افزایش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن گردیده که آثار مخربی بر روی سلول‌ها داشته در نتیجه موجب افزایش میزان اکسیداسیون سلولی می‌گردد (Navabpour et al., 2003).

در شکل ۳ مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × رقم نشان داده شده است. نتایج نشان‌دهنده روند افزایشی میزان

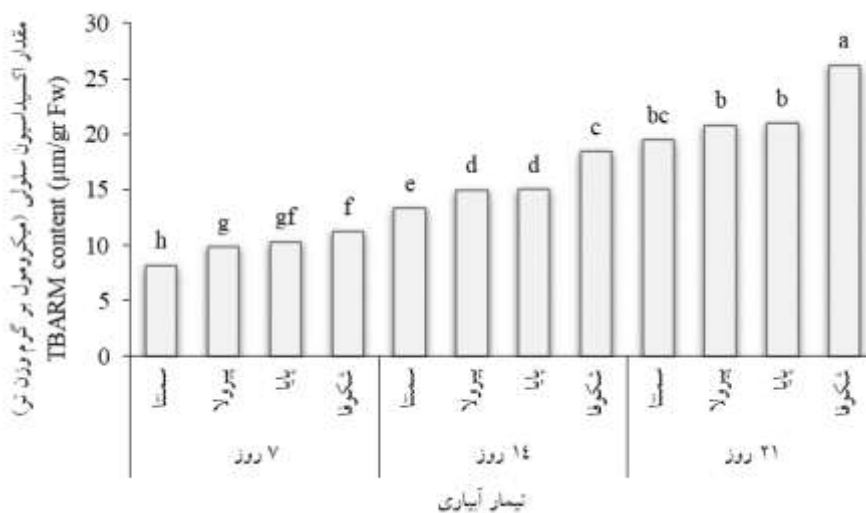
میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود که کمترین مقدار کلروفیل a را داشت و اختلاف آن با سایر ارقام معنی‌دار بود. همچنین با وجود افزایش مقدار کلروفیل a در این رقم در تیمارهای ۱۴ و ۲۱ روز (به ترتیب ۶ و ۶/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) باز هم کمترین مقدار کلروفیل a را نشان داد.

کلروفیل b: نتایج مقایسه میانگین اثر تنش بر روی کلروفیل b (جدول ۳) نیز نتایج مشابه با کلروفیل a نشان داد. با افزایش فواصل آبیاری از ۷ روز به ۱۴ روز میزان کلروفیل b از ۱/۹۸ به ۲/۶۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر افزایش یافت که اختلاف بین این دو تیمار معنی‌دار گردید، اما از تیمار آبیاری هر ۱۴ روز به تیمار آبیاری هر ۲۱ روز میزان کلروفیل b (۰/۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) افزایش یافت که اختلاف این دو تیمار معنی‌دار نگردید. این نتایج با نتایج Nadali و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت (Nadali et al., 2010).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × رقم برای صفات میزان کلروفیل b (شکل ۲) نشان داد بیشترین محتوای کلروفیل b در تیمار آبیاری هر ۷ روز مربوط به رقم سمتا با ۲/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود که اختلاف آن با ارقام پیرولا و پایا (به ترتیب ۲ و ۱/۹۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) معنی‌دار نشد ولی اختلاف آن با رقم شکوفا (۱/۸۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) معنی‌دار گردید. با افزایش فواصل آبیاری به ۱۴ روز محتوای



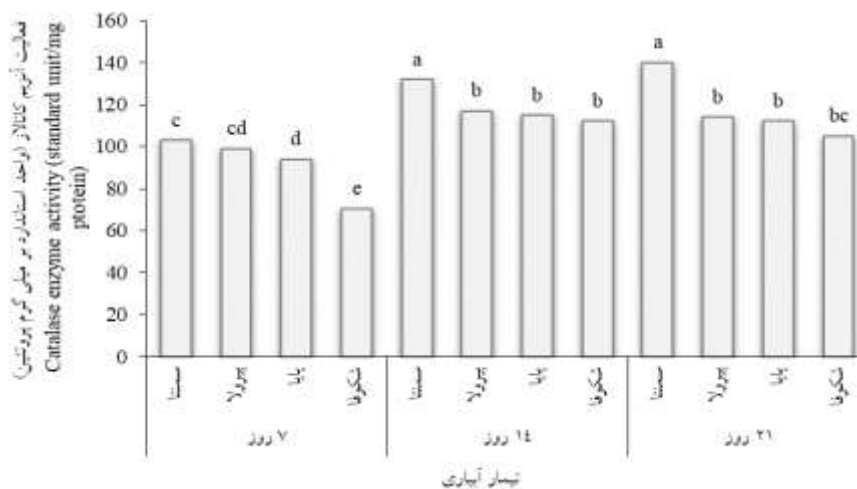
شکل ۲- مقایسه میانگین اثر تنش × رقم بر روی محتوای کلروفیل b. میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ براساس آزمون LSD نیستند.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر تنش × رقم بر روی میزان اکسیداسیون سلولی. میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ براساس آزمون LSD نیستند.

آنزیم کاتالاز: همان‌طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود با افزایش فواصل آبیاری از ۷ روز به ۱۴ روز با بروز تنش خشکی مقدار آنزیم کاتالاز افزایش چشمگیری یافت و مقدار آن از ۹۱/۶ (واحد استاندارد بر میلی‌گرم پروتئین) به ۱۱۹ (واحد استاندارد بر میلی‌گرم پروتئین) افزایش یافت و اختلاف بین تیمارها معنی‌دار گردید. اما با افزایش فاصله آبیاری از ۱۴ روز به ۲۱ روز و شدت یافتن تنش خشکی مقدار آنزیم کاتالاز ۲ واحد استاندارد بر میلی‌گرم پروتئین کاهش یافت با این وجود اختلاف بین تیمارها معنی‌دار نگردید. نتایج ایلکایی و همکاران (۱۳۹۱) نشان داد بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

اکسیداسیون سلولی در ارقام با افزایش فواصل آبیاری و بروز تنش خشکی است. کمترین میزان اکسیداسیون سلولی ۸/۲ میکرومول بر گرم وزن تر بود که در تیمار آبیاری هر ۷ روز و در رقم سمنا مشاهده شد که با افزایش فواصل آبیاری به ۱۴ و ۲۱ روز این مقدار به ترتیب به ۱۳/۳ و ۱۹/۵ میکرومول بر گرم وزن تر افزایش یافت. به‌طورکلی در بین ارقام کمترین مقدار اکسیداسیون سلولی در هر سه تیمار مربوط به رقم سمنا بود که اختلاف آن با سایر ارقام معنی‌دار بود. همچنین رقم شکوفا در هر سه تیمار آبیاری هر ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بالاترین مقدار اکسیداسیون سلولی را دارا بود.



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر تنش × رقم بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز. میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ براساس آزمون LSD نیستند.

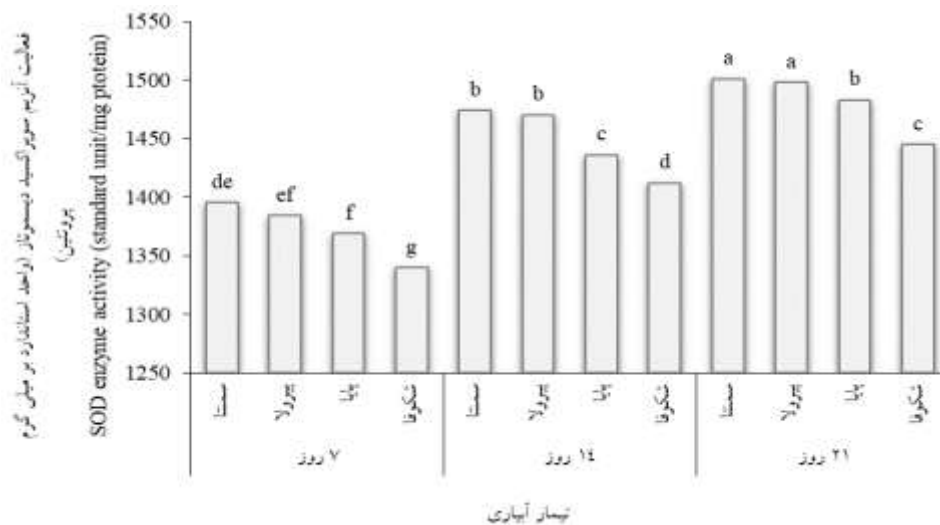
سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش خشکی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج حاکی از افزایش مقدار این آنزیم تحت تنش خشکی است به گونه‌ای که اختلاف بین تیمارهای مختلف آبیاری معنی‌دار گردید و بیشترین و کمترین مقدار این آنزیم (به ترتیب ۱۴۸۱ و ۱۳۷۲ واحد استاندارد بر میلی‌گرم پروتئین) به ترتیب در تیمار آبیاری هر ۷ و ۲۱ روز مشاهده گردید که با نتایج ایلیکایی و همکاران (۱۳۹۱) مبنی بر افزایش فعالیت این آنزیم تحت تنش خشکی مطابقت داشت. محققین نشان داده‌اند که غلظت آنزیم‌های اکساینده در شرایط تنش دو برابر شده و لذا باعث افزایش مقاومت به تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند و از طرفی بیان داشته‌اند تنش خشکی (که از جمله تنش‌های اکسیداتیو به‌شمار می‌رود) نیز میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهد (Lascano *et al.*, 2005). هر چند میزان این فعالیت، بسته به حساسیت ارقام مختلف و همچنین پتانسیل ژنتیکی گونه‌های مختلف، متفاوت است (Masoumi *et al.*, 2010; Manavalan *et al.*, 2009).

مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × رقم بر روی مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۵) نشان داد با بروز تنش خشکی که در نتیجه افزایش فواصل آبیاری رخ داد، مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش معنی‌داری یافت و مقدار این آنزیم در همه ارقام در شرایط آبیاری هر ۲۱ روز بیشترین

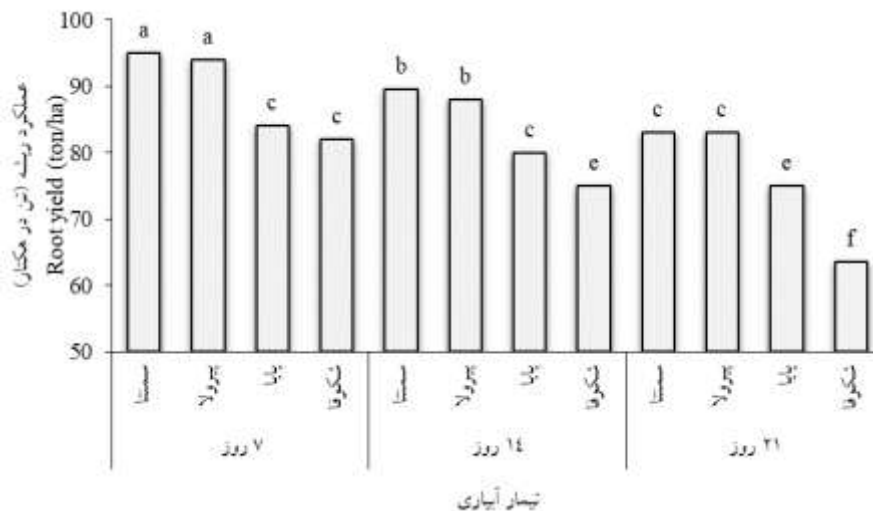
در چغندر قند ۱۱۸/۵۸ (میلی‌گرم پروتئین/واحد) بود که تحت تنش خشکی مشاهده شد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × رقم نشان داد مقدار آنزیم کاتالاز در همه ارقام با افزایش فواصل آبیاری از هر ۷ روز به هر ۱۴ روز و با بروز تنش خشکی افزایش معنی‌داری یافت ولی با افزایش فواصل آبیاری به هر ۲۱ روز و افزایش تنش خشکی، مقدار این آنزیم تنها در رقم سمتا افزایش معنی‌داری یافت و در سه رقم دیگر مقدار آنزیم کاتالاز کاهش نشان داد. بیشترین مقدار آنزیم کاتالاز مربوط به رقم سمتا بود (۱۴۰ واحد استاندارد بر میلی‌گرم پروتئین) که در شرایط تیمار آبیاری هر ۲۱ روز مشاهده گردید. کمترین مقدار آنزیم کاتالاز در تیمار آبیاری هر ۷ روز و در رقم شکوفا (۷۰/۵ واحد استاندارد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد که اختلاف آن با سایر ارقام معنی‌دار گردید. همچنین بیشترین مقدار افزایش آنزیم کاتالاز در رقم شکوفا مشاهده شد که مقدار آن از ۷۰/۵ واحد استاندارد بر میلی‌گرم پروتئین در تیمار آبیاری هر ۷ روز به ۱۱۲ واحد استاندارد بر میلی‌گرم پروتئین در تیمار آبیاری هر ۱۴ روز افزایش یافت.

سوپراکسید دیسموتاز: مقایسه میانگین مقدار آنزیم



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر تنش × رقم بر روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز. میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ براساس آزمون LSD نیستند.



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × رقم برای عملکرد ریشه. میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ براساس آزمون LSD نیستند.

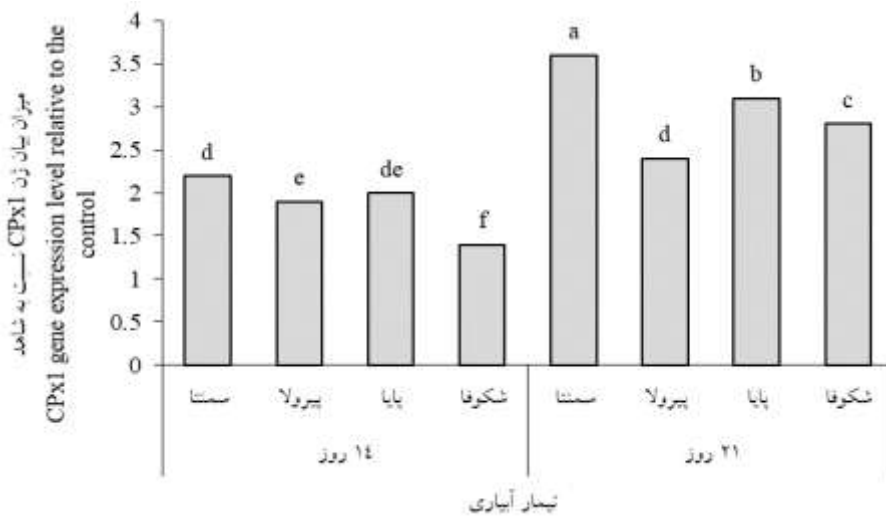
مقدار عملکرد ریشه کاهش یافت و کمترین مقدار عملکرد ریشه (۷۶/۱ تن در هکتار) در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز مشاهده شد. مقدار عملکرد ریشه در تیمار آبیاری هر ۷ و ۱۴ روز به ترتیب ۸۸/۷ و ۸۳/۱ تن در هکتار بود و اختلاف بین تیمارها برای این صفت معنی‌دار گردید. کاهش عملکرد ریشه در شرایط کم آبیاری به دلیل کاهش سطح برگ‌ها، مواد فتوسنتزی و به دنبال آن کاهش مواد ذخیره‌ای در ریشه است که در نتایج سایر محققین نیز گزارش شده است (عروج‌نیا و همکاران، ۱۳۹۱؛ جوزی و زارع ایبانه، ۱۳۹۴).

مقدار را نشان داد و اختلاف معنی‌داری با تیمارهای آبیاری هر ۷ و ۱۴ روز داشت. در بین ارقام مورد مطالعه رقم داخلی شکوفه کمترین مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را در هر سه تیمار آبیاری نشان داد و اختلاف آن با سایر ارقام معنی‌دار بود و رقم سمتا در هر سه تیمار آبیاری بیشترین مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را دارا بود که اختلاف آن با رقم پیرولا معنی‌دار نگردید ولی با سایر ارقام اختلاف معنی‌داری نشان داد. **عملکرد ریشه:** مقایسه میانگین اثر تنش بر روی میزان عملکرد ریشه (جدول ۳) نشان داد با افزایش فواصل آبیاری

جدول ۴- تجزیه واریانس میزان بیان ژن‌های دخیل در واکنش به تنش خشکی

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییر
NDP	CPx2	CPx1		
۳/۰۳**	۲/۹۲۵**	۱/۸۷۶**	۲	تنش
۰/۸۸۸**	۰/۷۶۳**	۰/۲۹۴**	۳	رقم
۰/۱۹۶**	۰/۶۲۷**	۰/۸۸۹**	۶	تنش × رقم
۰/۰۴۵	۰/۰۴۹	۰/۰۶۹	۲۴	خطا
۵/۲	۴/۱	۳/۶	-	ضرب تغییرات

** معنی داری در سطح احتمال یک درصد

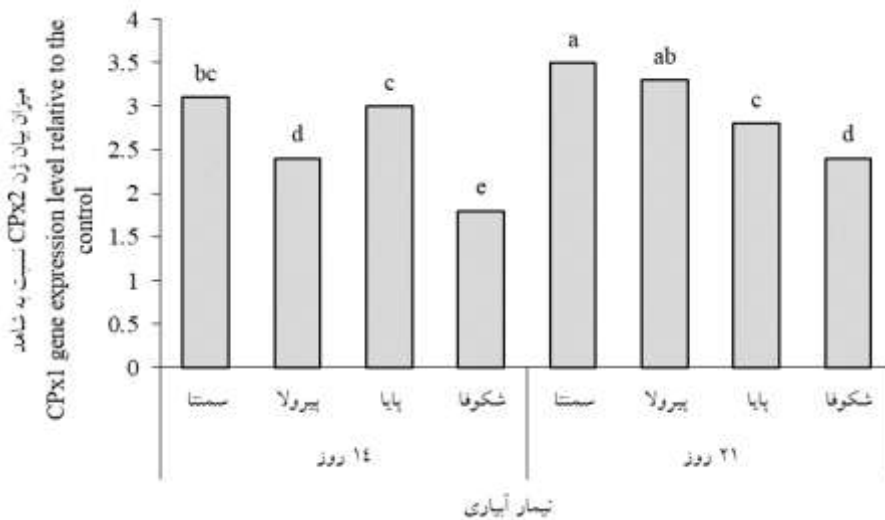


شکل ۷- میزان بیان ژن *CPx1* در ارقام چغندر قند تحت تأثیر سطوح خشکی. میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ براساس آزمون LSD نیستند.

نتایج تجزیه واریانس میزان بیان ژن‌های دخیل در واکنش به خشکی: همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، اثر تنش، رقم و اثر متقابل تنش × رقم بر روی میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه (*CPx1*، *CPx2* و *NDP*) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید که نشان‌دهنده میزان بیان متفاوت این ژن‌ها تحت شرایط مختلف است.

بیان ژن *CPx1*: همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود میزان بیان ژن *CPx1* در تیمار آبیاری هر ۱۴ و ۲۱ روز نسبت به تیمار شاهد (تیمار آبیاری هر ۷ روز) در همه ارقام افزایش نشان داد که اختلاف میزان بیان این ژن بین این دو تیمار نیز معنی‌دار شد. در بین ارقام مورد مطالعه رقم سمتا در هر دو تیمار آبیاری هر ۱۴ و ۲۱ روز (به ترتیب ۲/۲ و ۳/۶ برابر نسبت

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × رقم بر روی عملکرد ریشه (شکل ۶) نشان داد در تمامی ارقام عملکرد ریشه با افزایش فواصل آبیاری کاهش یافت. به‌طور کلی همان‌طور که در شکل ۳ و ۴ نیز مشاهده می‌شود ارقام سمتا و پیرولا در تمامی تیمارها عملکرد ریشه بالاتری نسبت به سایر ارقام داشتند. مقدار عملکرد ریشه ارقام سمتا و پیرولا از تیمار آبیاری هر ۷ روز به ۱۴ روز به ترتیب ۵/۵ و ۶ تن کاهش یافت و در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز به ترتیب ۶/۵ و ۵ تن کاهش نسبت به تیمار آبیاری هر ۱۴ روز نشان دادند. همچنین کمترین مقدار عملکرد ریشه مربوط به رقم شکوفا (۶۳/۵ تن در هکتار) بود که در شرایط آبیاری هر ۲۱ روز مشاهده گردید و اختلاف آن با سایر ارقام معنی‌دار شد.



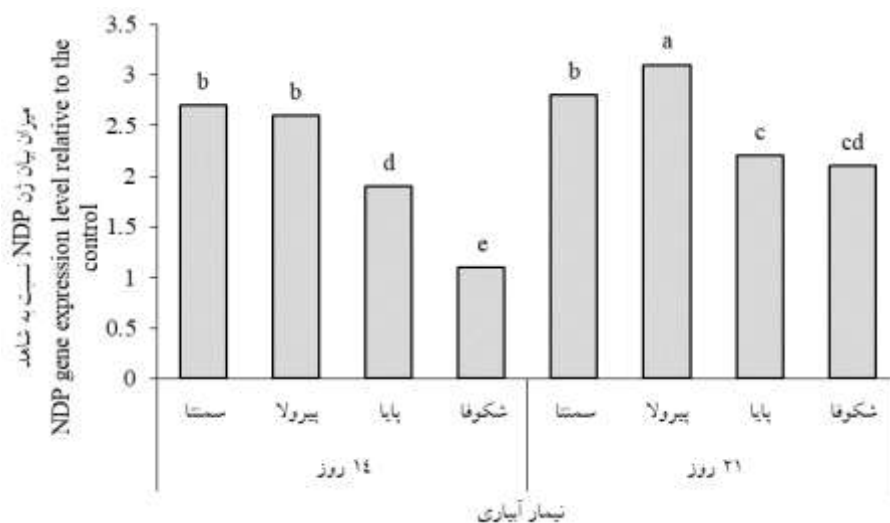
شکل ۸- میزان بیان ژن *CPx2* در ارقام چغندر قند تحت تأثیر سطوح خشکی. میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ براساس آزمون LSD نیستند.

میزان بیان ژن *CPx2* در تمامی ارقام با افزایش فواصل آبیاری و بروز تنش افزایش یافت. ژن *CPx2* نیز در بیان پروتئین ۲- سیس پراکسی ردوکسین نقش دارد. این پروتئین در تعدیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species) نقش داشته و افزایش آن تحت تنش خشکی در نتایج شایان‌فر و همکاران (۱۳۹۳) گزارش شده است. با توجه به این موضوع افزایش میزان بیان ژن *CPx2* تحت شرایط تنش خشکی که در نتایج رجبی و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش شده است توجیه پذیر است (Rajabi et al., 2007).

بیان ژن *NDP*: نتایج میزان بیان ژن *NDP* (شکل ۹) تحت تنش خشکی نسبت به تیمار شاهد (آبیاری هر ۷ روز) نشان داد در تمامی ارقام بیان این ژن افزایش یافته است. در هر دو شرایط آبیاری هر ۱۴ و ۲۱ روز ارقام سمنا و پیرولا بیان بالاتری نسبت به سایر ارقام در رابطه با این ژن نشان دادند. در تیمار آبیاری هر ۱۴ روز رقم سمنا بیشترین مقدار بیان ژن *NDP* (۲/۷ برابر نسبت به تیمار شاهد) را نشان داد ولی اختلاف آن با رقم پیرولا معنی‌دار نگردید اما در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز بیشترین مقدار بیان این ژن مربوط به رقم پیرولا بود (۳/۱ برابر نسبت به تیمار شاهد) که اختلاف آن با رقم سمنا نیز معنی‌دار نگردید. رقم شکوفا در تیمار آبیاری هر ۱۴

به تیمار شاهد) بالاترین میزان بیان این ژن را نشان داشت که در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز میزان بیان بالاتری داشت. همچنین افزایش دو برابری میزان بیان ژن *CPx1* در رقم شکوفا در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز (۲/۸ برابر نسبت به تیمار شاهد) نسبت به تیمار آبیاری هر ۱۴ روز (۱/۴ برابر نسبت به تیمار شاهد) قابل ملاحظه بود اما با این وجود کمترین مقدار بیان را نسبت به سایر ارقام برای این ژن نشان داد. ژن *CPx1* کدکننده پروتئین ۲- سیس پروکسی ردوکسین است. افزایش میزان این پروتئین تحت تنش خشکی در نتایج سایر محققین گزارش شده است (Huang et al., 2012; شایان‌فر و همکاران، ۱۳۹۳) که می‌تواند به علت افزایش بیان این ژن در شرایط تنش باشد. همچنین شایان‌فر و همکاران (۱۳۹۳) گزارش نمودند افزایش میزان پروتئین سیس پروکسی ردوکسین تحت تنش خشکی هم در ارقام حساس و هم در ارقام متحمل به خشکی افزایش یافت که این افزایش در ارقام متحمل بیشتر بود.

بیان ژن *CPx2*: در رابطه با میزان بیان ژن *CPx2* نتایج نشان داد (شکل ۸) رقم سمنا با افزایش ۳/۱ برابری در تیمار آبیاری هر ۱۴ روز و افزایش ۳/۵ برابری در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز نسبت به تیمار آبیاری هر ۷ روز (شاهد) بیشترین مقدار افزایش این ژن تحت تنش خشکی را دارا بود. همچنین



شکل ۹- میزان بیان ژن *NDP* در ارقام چغندر قند تحت تأثیر سطوح خشکی. میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ براساس آزمون LSD نیستند.

شرایط تنش خشکی را می‌توان ناشی از این امر دانست. افزایش میزان آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در نتیجه افزایش فواصل آبیاری و بروز تنش خشکی با توجه به نقش این آنزیم‌ها در تعدیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن مورد انتظار بود که در این تحقیق ارقام متحمل (پیرولا و سمتا) به تنش خشکی بالاترین سطوح این آنزیم‌ها را نشان دادند. افزایش میزان فواصل آبیاری سبب کاهش رطوبت خاک و بروز تنش خشکی می‌گردد و موجب کاهش عملکرد ریشه در چغندر قند می‌شود. همچنین نتایج میزان بیان ژن‌ها نشان داد با افزایش فواصل آبیاری میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه افزایش یافت. ژن‌های *CPx1* و *CPx2* در بیان پروتئین ۲- سیس پروکسی ردوکسین نقش دارند. این پروتئین در تعدیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش داشته و با توجه به اینکه تحت تنش خشکی میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد، افزایش میزان بیان ژن‌ها *CPx1* و *CPx2* را می‌توان یک مکانیسم مقاومتی برای افزایش تولید پروتئین ۲- سیس پروکسی ردوکسین، که در جهت تعدیل اثر رادیکال‌های آزاد تولید می‌شود به حساب آورد. ژن *NDP* آنزیم نوکلئوزید دی‌فسفات کیناز را کد می‌کند که در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش مهمی دارد در بین ارقام مورد مطالعه رقم سمتا نسبت به سایر ارقام در اغلب صفات برتری داشت بنابراین می‌توان

روز با بیان ۱/۱ برابری نسبت به شاهد کمترین مقدار بیان را برای این ژن داشت و اختلاف آن با سایر ارقام معنی‌دار شد اما در تیمار آبیاری هر ۲۱ روز این مقدار به ۲/۱ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت و اختلاف آن با میزان بیان این ژن در رقم پایا (۲/۲ برابر نسبت به تیمار شاهد) معنی‌دار نبود. محصول بیان ژن *NDP* آنزیم نوکلئوزید دی‌فسفات کیناز است که در متابولیسم، رشد و پاسخ به تنش‌ها در گیاهان نقش دارد. این آنزیم در متابولیسم نوکلئوتید و نگهداری تعادل بین ATP سلولی و دیگر نوکلئوزید تری‌فسفات‌ها نقش دارد و در سنتز بازهای پورین و پیریمیدین شرکت دارد (Hajheidari et al., 2005). افزایش میزان بیان ژن *NDP* تحت تنش خشکی در نتایج رجیبی و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش شده است (Rajabi et al., 2007).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد افزایش فواصل آبیاری موجب بروز تنش خشکی شده و در این شرایط میزان کلروفیل برگ افزایش یافته و با افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) میزان اکسیداسیون سلولی در برگ‌ها نیز افزایش یافت. با افزایش میزان فتوسنتز میزان مواد انتقالی به ریشه بیشتر شده و یکی از دلایل افزایش درصد قند ریشه در

کشت این رقم را در مناطق با آب آبیاری محدود توصیه نمود. برتری داشت و در سطوح تنش پایداری بیشتری برای صفات همچنین در بین ارقام داخلی رقم پایا نسبت به رقم شکوفا مورد مطالعه نشان داد.

منابع

- ایلکایی، م.، فروزش، پ.، حبیبی، د.، طالقانی، د.، ف.، رجبی، ا.، عروج‌نیا، س. و داوودی فرد، م. (۱۳۹۱) بررسی خصوصیات بیوشیمیایی چغندر قند تحت شرایط تنش خشکی. مجله زراعت و اصلاح نباتات ۸: ۸۷-۹۹.
- جوزی، م. و زارع ایبانه، ح. (۱۳۹۴) تأثیر سلوح کود نیتروژن و کم آبیاری بر عملکرد کی و کیفی چغندر قند. چغندر قند ۳۱: ۱۵۶-۱۴۱.
- خورشید، ع. م.، مصباح، م.، رنجی، ذ.، امیری، ر. و فتحی، م. ر. (۱۳۸۳) بررسی پاسخ به انتخاب در نسل‌های مختلف چغندر قند تحت شرایط تنش شوری و خشکی. چغندر قند ۲۰: ۲۵-۱۵.
- زارع، م.، زینالی خانقاه، ح. و دانشیان، ج. (۱۳۸۳) ارزیابی تحمل برخی ژنوتیپ‌های سویا به تنش خشکی. مجله علوم کشاورزی ایران ۳۵: ۸۶۷-۸۵۹.
- شایان‌فر، ع.، توکل افشاری، ر.، علیزاده، ه. و رسول‌نیا، ع. (۱۳۹۳) بررسی الگوی پروتئوم محور جنین گندم (*Triticum aestivum*) تحت تنش خشکی در دو رقم حساس و متحمل به خشکی طی فاز دوم جوانه‌زنی. نشریه علوم فناوری بذر ایران ۳: ۲۳۲-۲۲۳.
- عروج‌نیا، س.، حبیبی، د.، طالقانی، د.، ف.، شریفی دولت آبادی، س.، پازوک، آ.، معاونی، پ.، رحمانی، م. و فرشادی، م. (۱۳۹۱) ارزیابی عملکرد و اجزای مختلف عملکرد ژنوتیپ‌های مختلف چغندر قند تحت تنش خشکی. مجله زراعت و اصلاح نباتات ۸: ۱۴۴-۱۲۷.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 105: 121-126.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J. and Gaspar, T. (1990) Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis* 1: 86-89.
- Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S. Y., Ober, E. S. and Hosseini Salekdeh, G. (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteom* 5: 950-960.
- Huang, H., Moller, I. M. and Song, S. Q. (2012) Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *Journal of Proteomics* 75: 1247-1262.
- Lascano, H. R., Antonicelli, G. E., Luna, C. M., Melchiorre, M. N., Gomez, L. D., Racca, R. W., Trippi, V. S. and Casano, L. M. (2005) Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 1095-1102.
- Lowry, O. and Radall, R. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal Biochemical Chemistry* 193: 680-685.
- Manavalan, L. P., Guttikonda, S. K., Tran, L. S. P. and Nguyen, H. T. (2009) Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant and Cell Physiology* 50: 1260-1276.
- Masoumi, H., Masoumi, M., Darvish, F., Daneshian, J., Nourmohammadi, G. H. and Habibi, D. (2010) Change in several antioxidant enzymes activity and seed yield by water deficit stress in soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 38: 50-59.
- Mensha, J. K., Obadoni, B. O., Eroutor, P. G. and Onome, I. F. (2006) Simulated flooding and drought effects on germination, growth and yield parameters of Sesame (*Sesamum indicum* L.). *African Journal of Biotechnology* 5: 1249-1253.
- Nadali, I., Paknejad, F., Moradi, F., Vazan, S., Tookalo, M., Jami Al-Ahmadi, M. and Pazoki, A. (2010) Effect of foliar application of methanol on sugar beet (*Beta vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science* 4: 398-401.
- Navabpour, S., Morris, K., Harrison, E., Makerness, S. and Buchanan-Wollaston, V. (2003) Expression of senescence enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal Experimental of Botany* 54: 2285-2292.
- Nolan, T., Hands, R. E. and Bustin, S. A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1: 1559-1582.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 975: 384-394.

Rajabi, A., Ranji, Z., Griffiths, H. and Ober, E. S. (2007) A preliminary study on genotypic differences in transcript abundance of drought-responsive genes in sugar beet. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 3599-3605.

Vanguilder, H. D., Vrana, K. E. and Freeman, W. N. (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44: 619-626.

Evaluation of some drought tolerance genes expressions and enzymatic changes in sugar beet monogerm cultivars

Saeid Navabpour*, Seyedeh Sanaz Ramezanzpour, Ahad Yamchi, Ali Aaghar Nasrollahnezhad, Seyed Hossein Shafapoor, Abolfazl Mazandarani

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

(Received: 20/02/2019, Accepted: 05/08/2019)

Abstract

Sugar beet is a strategic and industrial crop and important in sugar production. Drought is a limited factor in sugar beet yield. Base on this, an experiment carried out using a split-plot format in the randomized complete block design with 4 replications in 1394-5 at Chenaran area (Bahman Jan village). The main plot included three drop irrigation regimes: 7, 14 and 21 days interval as normal, mild and intensive stress, subplot included four cultivars: Iranian cultivars, Paya and Shukufa and foreign cultivars Sementa and Pirola from German company KWS. The results showed, drought treatments decreased total yield. Also, drought stress increased chlorophyll (a and b) and TBARM as cellular oxidative index. It seems increased in chlorophyll is a mechanism for increasing drought tolerant. The maximum amount of catalase (119 unit) and superoxide (1481 unit) enzymes were obtained in mild and intensive drought treatment respectively. The expression of all three genes (CPX1, CPX2 and NDP) were increased by drought treatment, indicating the important role of these genes in drought tolerant.

Key words: Catalase enzyme, Drought stress, Gene expression, Sugar beet, Superoxide dismutase enzyme