ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۹۵ - ۱۸۵

بررسی اثر شوری بر بیان ژن گالاکتینول سنتاز (*GAS*)، فعالیت آنزیم-های آنتی اکسیدان، میزان کربوهیدرات و پرولین در توده‌های بومی خربزه سیستان (*Cucumis melo*)

The effect of salinity in galactinol synthase (*GAS*) gene expression, antioxidant enzymes activity, carbohydrst and prolin in sistan melon landrace (*Cucumis melo* L.)

فروزان حیدری[۱]، صالحه نادری*[۱]، حمیده خواجه[۲]، عباسعلی بهاری[۳]

۱- به‌ترتیب مربی، دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۲- کارشناس پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران
۳- استادیار، دانشگاه زنجان، ایران

Heidari F[1], Naderi S*[1], Khajeh H[2], Bahari AA[3]

1- Instructor, PhD Student , Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran
2- MSc, Agricultural Biotechnology Center, University of Zabol, Iran
3- Assistant Professor, University of Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Salehe.Naderi@Gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱ - تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/۲۵)

چکیده

شوری یکی از مشکلات در حال افزایش جهان است که سطح وسیعی از اراضی کشور ما را نیز در بر می‌گیرد. الیگوساکاریدهای خانواده رافینوز (RFOs) چندین نقش فیزیولوژیکی در گیاهان عهده-دار هستند که از جمله آن‌ها تجمع این قند در زمان تشکیل دانه در پاسخ به تنش شوری می‌باشد. سنتز گالاکتینول به‌عنوان حد واسط بوسیله گالاکتینول سنتاز (*GAS*)، اولین گام در تشکیل رافینوز می‌باشد. جهت تحمل شوری، گیاهان علاوه بر تنظیم اسمزی از مکانیسم افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز استفاده می‌کنند. در این پژوهش، به‌منظور مشخص کردن سطح بیان ژن *GAS*، نقش آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، کربوهیدرات و پرولین در ۳ توده خربزه بومی سیستان تحت تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل انجام شد. سطوح تنش شوری مورد استفاده توسط کلرید سدیم در چهار سطح صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار تهیه شد. RNA از برگ هر نمونه استخراج شد و cDNA با رونویسی معکوس ساخته شد. نتایج نشان داد با افزایش سطح شوری از صفر تا ۱۵۰ میلی مولار بیان ژن *GAS* افزایش معنی‌داری یافت به‌طوری‌که در بیش‌ترین سطح شوری (۱۵۰ میلی مولار) بیان ژن *GAS* در توده خربزه تاشکندی ۱۰/۲ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت و در توده خربزه آتش شیرازی در سطح ۱۵۰ میلی مولار بیان ژن *GAS* ۳/۷ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد. همچنین در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار بیان ژن *GAS* در توده سفیدک ۷۹/۱۹ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد که ژن مورد نظر در این توده نسبت به توده‌های دیگر افزایش بیش‌تری داشت. با افزایش غلظت شوری، در هر سه توده خربزه تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک به‌ترتیب آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT) ۸۵/۹، ۶۳/۲ و ۸۷/۱ درصد، آسکوربات پراکسیداز (APX) ٦٨/٨٩، ٣٦/٤٨ و ۹۲/۸۱ درصد، گایاکول پراکسیداز (GPX) ۸۹/۲۵، ۷۲/۸٤ و ۷۰/۳۷ درصد، کربوهیدرات ٤٠/٢، ٨٤/٤ و ۹۲/۸ و پرولین ٨٦/٦، ٨/ ٦٩ و ٨٩/٤ درصد نسبت به شاهد افزایش معنی-داری یافت بنابراین به‌نظر می‌رسد بیان ژن GAS در سه توده خربزه تحت چنین شرایطی سبب سنتز قندهای خانواده رافینوز می‌شود که برای حفاظت گیاه در برابر تنش‌های محیطی مؤثر است. همچنین از طریق فعال‌شدن دو سیستم افزایش فعالیت آنزیمی و تنظیم کننده‌های اسمزی به نوعی شرایط لازم برای ادامه بقای گیاه را فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی

آنزیم‌های آنتی اکسیدان
بیان ژن
تنش شوری
خربزه
گالاکتینول سنتاز

مقدمه

رشد و عملکرد گیاهان در بسیاری از مناطق دنیا توسط تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده متعدد محدود می‌شود و در بین تنش‌های غیر زنده، تنش شوری در سطح جهان خسارات گسترده‌ای به گیاهان وارد نموده‌است (Kawara et al. 2008). شوری زیاد خاک از جمله عوامل محدود کننده عملکرد محصولات در سرتاسر جهان به شمار می‌رود که این مسئله به خصوص در مناطق خشک و نیمه خشک به‌عنوان یکی از اساسی‌ترین مشکلات بخش کشاورزی است (Rezvani Moghadam and Koocheki 2001). در این میان، ایران با دارا بودن اقلیم گرم و خشک از این امر مستثنا نیست. به نحوی که بیش از نیمی از زمین‌های قابل کشت آن (در حدود ۲۷ میلیون هکتار) از خاک‌های شور و سدیمی تشکیل شده‌است (Rezvani Moghadam and Koocheki 2001). لذا به منظور استفاده بهینه از این اراضی و منابع آب شور، افزایش تحمل به شوری گیاهان همراه با توان تولید بالاتر یک رویکرد مهم اصلاحی است (Bahrami et al. 2009). خربزه (*Cucumis melon* L.) یکی از محصولات مهمی است که اغلب در خاک خشک و نیمه خشک کشت می‌شود و به‌عنوان یک گیاه با تحمل متوسط نسبت به شوری شناخته شده‌است (Yasar et al. 2006). خربزه گیاهی است خزنده با ریشه‌های گسترده و نسبتاً عمیق، ساقه‌ها در انواع اصلی، فرعی و ثانویه هستند و معمولاً کرک‌های سخت و زبر دارند. برگ‌ها متناوب با دمبرگ بلند و به اشکال مختلف و به صورت پنجه‌ای می‌باشند. گل‌ها به صورت نر و ماده و کامل بوده و به وسیله زنبور گرده افشانی می‌شوند (Peyvast 2006). با وجودی که خربزه یک گیاه نیمه مقاوم به شوری است، اما شوری باعث خسارت‌های متعددی مانند جلوگیری از رشد، اختلال متابولیکی، کاهش عملکرد کمی و کیفی محصول می‌شود (Zakan et al. 2005). تنش شوری یکی از مشکلات بسیار مهم برای گیاهان بخصوص در مناطق خشک به شمار می‌آید زیرا نمک رشد گیاهان و تولید محصولات کشاورزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Flowers 2004). بنابراین، مکانیسم پاسخ گیاهان به تنش شوری یا تحمل آن از لحاظ ژنتیکی و بیولوژیکی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌است (Kawara et al. 2008). تنش شوری به واسطه غلظت بالای نمک منجر به ایجاد استرس هایپراسموتیک و عدم تعادل در غلظت‌های یونی سلول و در نهایت ایجاد سمیت عمومی در گیاه می‌شود (Bahrami et al. 2009). تنش‌هایی مانند شوری و خشکی باعث افزایش انواع اکسیژن فعال (ROS) در زمان رشد گیاه می‌شود که شامل رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکس (OH)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود. اکسیژن فعال ممکن است با مولکول‌های بزرگی مانند پروتئین، لیپید و دئوکسی ریبونوکلئیک اسید واکنش دهد و باعث آسیب به غشا و فعالیت غیر عادی سلول‌ها شود (Appel et al. 2004). برای زنده ماندن در چنین شرایطی گیاهان سازوکارهای دفاعی منحصر به فردی را گسترش می‌دهند و فرآیندهایی برای سازگاری جهت افزایش تحمل شان به شرایط نامساعد را ایجاد می‌کنند (Xu et al. 2008; Mirzaee et al. 2013). دامنه وسیعی از آنزیم‌های آنتی اکسیدان در انواع ترکیبات سلولی مربوط به گیاهان مختلف شناسایی شده‌است (Jimenez et al. 2002; Gill and Tuteja 2010; Yoon 2015). فعالیت هم زمان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR)، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR)، و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) به‌عنوان قسمتی از سامانه آنتی اکسیدانی می‌تواند سلول را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن حفاظت کند (Yoon 2015; Gill and Tuteja 2010). سلول‌های گیاهی برای مقابله با اکسیژن فعال تولید شده تحت شرایط تنش با دو استراتژی اصلی یعنی کاهش اکسیژن فعال در کل ساختار آناتومی گیاه و همچنین سازگاری فیزیولوژیکی با اکسیژن فعال مقابله می‌کنند (Mittler 2004). مطالعات بسیاری در ذرت (Molazem and Azimi 2013) و گندم (Esfandiari et al. 2007) نشان می‌دهد که فعال شدن آنزیم‌های آنتی اکسیدان برای تحمل به تنش‌های غیر زنده مانند پاسخ به تنش شوری وابسته است (Mirzaee et al. 2013). مطالعات بیوشیمیایی نشان داده که در گیاهان تحت تنش خشکی و شوری تعدادی از ترکیبات آلی (محلول‌های سازگار کننده) تجمع می‌یابند، این ترکیبات تداخلی در فرآیندهای شیمیایی آن‌ها وارد نمی‌کنند. از این ترکیبات می‌توان به انواعی از کربوهیدرات‌های محلول (مانیتول، ساکارز، رافینوز و الیگو ساکارید) و ترکیبات نیتروژنه (اسید آمینه، پرولین و گلیسین بتائین) اشاره کرد. ترکیبات

سازگار کننده نقش مهمی در تنظیم اسمزی در گیاهان تحت تنش دارند (Good and Zaplachiniski 1994; Munns 1993). تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی زیادی در مقاومت به تنش‌ها همکاری دارند، یک تغییر قابل توجه این است که قندهای قابل حل شامل ساکارز، تری‌هالوز و خانواده رافینوز (RFOs) که برای حفاظت گیاه در برابر تنش‌های محیطی محلول‌های سازگار موثر می‌باشند، تجمع می‌یابند (Taji et al. 2002; Pennycooke et al. 2003; Strand et al. 2003; Peters et al. 2007; Peters and Keller 2009; Knaupp et al. 2011). گالاکتینول از دو پیش ماده UDP– گالاکتوز و میو– اینوزیتول سنتز شده که توسط گالاکتینول سنتاز کاتالیز شده‌است و یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز الیگوساکاریدهای خانواده رافینوز است (McCaskill and Turgeon 2007). سنتز گالاکتینول به‌عنوان حد واسط بوسیله گالاکتینول سنتاز (*GAS*)، اولین گام در تشکیل رافینوز می‌باشد (Bachmann et al. 1994). بسیاری از گونه‌ها رافینوزها را در پاسخ به تنش دمای کم می‌سازند. رافینوزها ممکن است به‌عنوان منبع ذخیره کربن در گیاهان مقاوم به دمای کم، به‌کار روند (Bachmann et al. 1994). همچنین در برخی مطالعات نشان داده شده‌است که ژن *GAS* در پاسخ به تعدادی از تنش‌های محیطی از قبیل شوری، خشکی، گرما و سرما فعال می‌شود (Taji et al. 2002; Santos et al.2011). پیشرفت‌های اخیر در زمینه نقشه ژنتیکی گیاهان و تکنیک های مولکولی و بیولوژی فرصت‌های تازه‌ای را برای درک ژنتیک ژن‌های متحمل به تنش و نحوه مشارکت آن‌ها در گیاهان تحت شرایط تنش در اختیار ما قرار می‌دهد. تولید گیاهان تراریخته حامل ژن‌های جدید و یا افزایش سطح بیان ژن‌هایی که درجه تحمل شوری را تحت تأثیر قرار می‌دهند، جهت افزایش تحمل تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wei 2014). به همین منظور درک پایه‌های مولکولی جهت توسعه استراتژی‌هایی که باعث بهبود تحمل شوری می‌شوند مفید به نظر می‌رسد. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی بیان ژن *GAS*، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، کربوهیدرات و پرولین در توده-های بومی خربزه سیستان تحت تنش شوری می‌باشد و بیان ژن *GAS* به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارهای تنش

سه توده محلی خربزه سیستانی از مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان زابل تهیه شد. قبل از انجام آزمایش، بذور توده‌های خربزه درون محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شد و پس از سه بار شستشو با آب مقطر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت سپس۳ بذر از هر توده به صورت جداگانه در گلدان که حاوی ماسه کاملاً شسته با آب مقطر بود کشت شد و تا ظهور دومین برگ هر روز با آب مقطر به نحوی که خروج اولین قطرات از ته گلدان مشاهده شود، آبیاری شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه بلوک کامل تصادفی در سه تکرار در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل (بیوسنتر) به اجرا در آمد. عامل اول شامل چهار سطح شوری صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار و عامل دوم سه توده خربزه بومی سیستان شامل تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک بودند. هنگامی که دومین برگ ظاهر شد، به گیاهان شاهد فقط محلول هوگلند (Hogland and Arnon 1950) افزوده شد این کار به مدت سه روز و به تدریج برای سازگار شدن گیاهان انجام گرفت. سپس نمونه‌های برگ برداشت و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مطالعه بیان ژن *GAS*

برای استخراج Total RNA از برگ توده‌های خربزه، از کیت سیناژن محلول RNaX Plus همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵ درصد و آب DEPC (دی اتیل پیرو کربنات) طبق پروتکل شرکت سیناژن استفاده شد. پس از استخراج RNA کل، کیفیت آن به وسیله الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. مرحله بعد از استخراج RNA سنتز DNA معکوس با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit ساخت شرکت Vivantis بود. در ساخت cDNA از ۱۰۰۰ نانوگرم در میکرولیتر RNA در همه نمونه‌ها استفاده شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های *GAS* و *18SrDNA* با استفاده از نرم‌افزار Oligo Therapeutics و سایت Oligonucleotid Properties Calculator انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگر طراحی شده برای ژن گالاکتینول سنتاز (*GAS*) و *18SrDNA*

Gene name	Primer sequence (5'-3')	(^{o}C) T_m	GC (%)
F *GAS*	GTAGCGCTGCACATAAGTCC	54.5	64.0
R *GAS*	CTTGGACGACAGAAGGCCAT	50.4	65.0
F *18SrDNA*	GGACAGGATTGAGTCATCAG	60.5	61.3
R *18SrDNA*	CTCGATGCAAGCACATTAAC	54.3	60.2

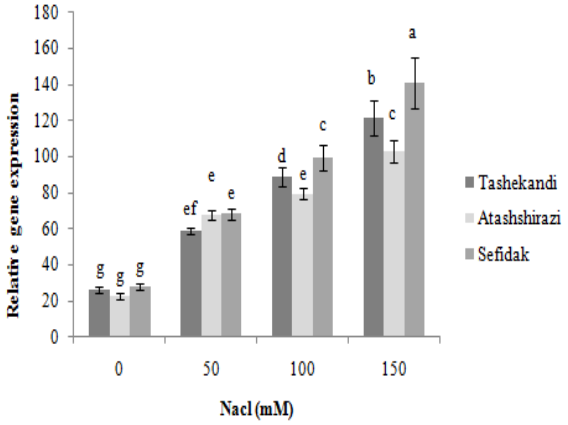
تکثیر ژن‌های *GAS* و *18SrDNA* برای اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش پی سی آر کمی بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت. از دستگاه Real Time-PCR Set Corbett (3000) و کیت Hot Tag EvaGreen qPCR master mix (ROX) شرکت سیناژن برای ارزیابی کمی بیان ژن *GAS* استفاده شد. اجزای واکنش پی سی آر کمی شامل ٤ میکرولیتر Master mix با غلظت 5x، یک میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر و ۱۳ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز بود. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از روش پی سی آر کمی یکسان و شامل یک مرحله فعال‌سازی ابتدایی آنزیم در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم شامل ٤۰ چرخه هر چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها به رشته الگو ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، بسط ترکیبی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و منحنی ذوب با افزایش دما از ۵۰ درجه تا ۹۹ درجه هر پنج ثانیه یک درجه بود. پس از انجام واکنش تکثیر به روش پی سی آر کمی داده‌های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای تجزیه داده‌ها استفاده شد.

اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی اکسیدان

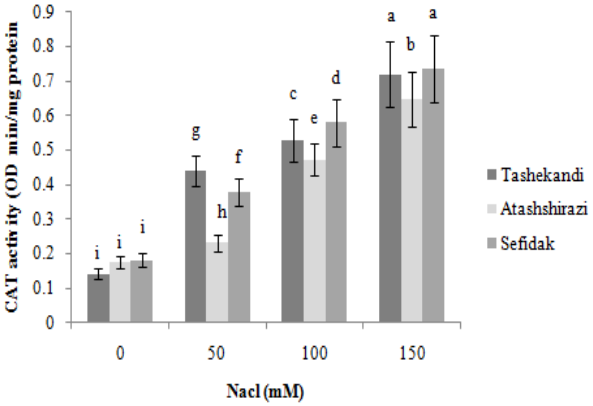
جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها، ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ برداشت و با ٤ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH=۷ ومحلول EDTA۰/۱ mM در هاون سرد کاملاً ساییده، به‌صورت همگن در آورده شدند. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه با ۱٦۰۰۰×g سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. در نهایت برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از روش Beers and Sizer (1952) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ mM با اسیدیته ۷، آب اکسیژنه ۱۵ mMو ۱۰۰ µl عصاره آنزیمی بود. افزایش جذب در طول موج ۲٤۰ به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Bju1110020) اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیمی به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان شد. واحد فعالیت به صورت تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه در وزن تر بیان شد. اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) از روش Nakano and Asada (1981) صورت گرفت. محیط واکنش آنزیم شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM و اسیدیته ۷، EDTA ۰/۱ µM و پراکسید هیدروژن یک درصد و آسکوربات ۰/۵ mM بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ µl عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۳ ml مخلوط آغاز گردید. افزایش جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر ثبت شد و به‌صورت تغییرات جذب نسبت به میلی گرم پروتئین در دقیقه در وزن تر بیان شد و آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) از روش Urbanek et al. (1991) سنجیده شد. غلظت نهایی مواد در حجم ml سه بود که شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ mM و اسیدیته ۷، EDTA ۰/۱ µM و پراکسید هیدروژن ۱۵ mM، گایاکول ۵ mM و ۵۰ µl عصاره آنزیمی بود، فعالیت آنزیمی در طول موج ٤۷۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Bju1110020) اندازه‌گیری شد. واحد فعالیت به صورت تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه در وزن تر بیان شد.

اندازه‌گیری مقدار کربوهیدرات‌های محلول

میزان کربوهیدرات‌های محلول به روش Schlegel (1956) اندازه-گیری شد. در این روش ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ به همراه ۱۰ ml اتانول ۹۵ درصد در لوله آزمایش دربسته قرار داده، به مدت



شکل ۱- میزان بیان ژن *GAS* در سه توده خربزه بومی سیستان (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) تحت تیمار با تنش شوری. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد.



شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در سه توده خربزه بومی سیستان (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) تحت تیمار با تنش شوری. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد.

یک ساعت در حمام بن‌ماری و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. پس از سرد شدن یک میلی‌لیتر از این نمونه‌ها برداشته شد و به آن یک میلی‌لیتر فنل ۰/۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد. در نهایت میزان نور جذبی در ٤٨٣ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد ومیزان کربوهیدرات‌های استخراجی بر اساس میکروگرم گلوکز در گرم وزن تر محاسبه شد.

اندازه‌گیری پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates et al. (1973) استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم از اندام هوایی و ریشه توسط ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک سه درصد در هاون چینی کاملا ساییده و در نهایت با کاغذ صافی صاف شد. به ۲ml از محلول حاصل، ۲ml معرف ناین‌هیدرین اضافه و پس از قرارگیری در حمام آب جوش به مدت یک ساعت، لوله‌های محتوی محلول حاصل در یخ قرار گرفت تا سرد شدند. بعد از این مرحله، ٤ml تولوئن اضافه شد. از فاز رویی برای اندازه‌گیری میزان پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد. با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار پرولین برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

تجزیه وتحلیل آماری

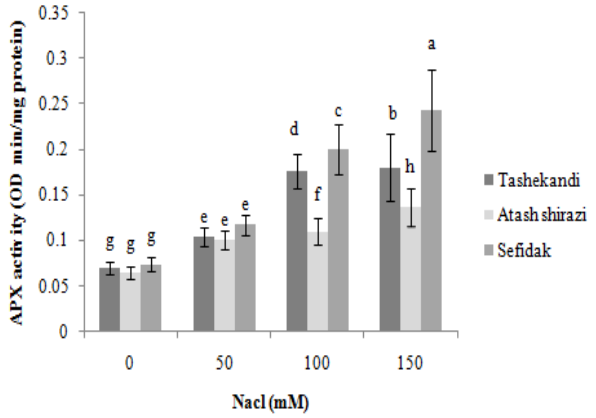
همه آزمایش‌ها با سه تکرار به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج

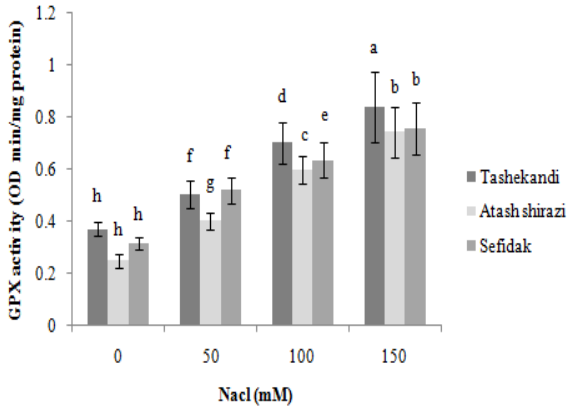
نتایج بررسی میزان بیان ژن *GAS* در توده‌های بومی خربزه تحت تاثیر شوری نشان داد که با افزایش شوری از صفر (نمونه شاهد) تا ۱۵۰ میلی مولار، میزان بیان ژن *GAS* در هر سه توده خربزه (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) از یک روند افزایشی پیروی می‌کند. در سطح شوری ۵۰ میلی‌مولار بیان ژن *GAS* در هر سه توده خربزه (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) به‌ترتیب ۱/۵، ۱/۸ و ۱/۸ برابر نسبت به نمونه کنترل افزایش نشان داد که این افزایش بیان در سطح پنج درصد معنی‌دار شد. در سطح شوری ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش بیان ژن *GAS* در هر سه توده مشاهده شد به طوری‌که در توده تاشکندی ٤/۲ برابر و در توده سفیدک ٦/٤ برابر نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد و در توده آتش شیرازی همان نسبت ۱/۵ برابر نسبت به شاهد افزایش بیان نشان داد. در سطح شوری ۱۵۰ میلی مولار افزایش بیان ژن *GAS* در توده سفیدک به بالاترین حد رسید و ۱۹/۷۹ برابر نسبت به شاهد در سطح پنج درصد افزایش نشان داد به‌همین ترتیب در توده‌های تاشکندی و آتش شیرازی بیان ژن مورد نظر به‌ترتیب ۱۰/۲ و ۷/۳ برابر نسبت به شاهد افزایش مشاهده شد (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که شوری تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) دارد (جدول ۲). مقایسه میانگین نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

در توده‌های بومی خربزه سیستان (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) سیر افزایشی دارد به طوری‌که بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح شوری ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد و در توده‌های تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک به‌ترتیب ۸۵/۹، ۶۳/۲ و ۸۷/۱ درصد نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۲). نتایج تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که شوری تاثیر معنی-داری بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) تحت تأثیر شوری نشان داد که فعالیت این آنزیم با افزایش غلظت شوری از صفر (نمونه شاهد) تا ۱۵۰ میلی مولار از یک روند افزایشی پیروی می‌کند. به طوری‌که درسطح شوری ۱۵۰ میلی مولار شوری در توده‌های تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک نسبت به شاهد ۶۸/۸۹، ۳۶/۴۸ و ۹۲/۸۱ درصد باعث افزایش معنی‌داری در میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) شد (شکل ۳).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس مشاهدات مربوط به میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) نشان داد، شوری باعث افزایش این صفت به طور معنی‌داری شده‌است (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین بررسی میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) تحت تأثیر شوری نشان داد بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) در سطح شوری ۱۵۰ میلی‌مولار شوری در هر سه توده بومی خربزه مشاهده شد و به‌همین ترتیب میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) در توده‌های تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک ۸۹/۲۵، ۷۲/۸۴ و ۷۰/۳۷ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ٤). تأثیر شوری بر میزان کربوهیدرات در توده‌های خربزه نتایج حاصل از آنالیز واریانس مشاهدات نشان داد که شوری تأثیر معنی‌داری بر میزان کربوهیدرات توده‌های بومی خربزه سیستان داشت (جدول۲). مقایسه میانگین نتایج بررسی میزان کربوهیدرات تحت تأثیر شوری نشان داد میزان کربوهیدرات در غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) شوری افزایش نشان داد به طوری‌که در سطح تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار میزان کربوهیدرات در هر سه توده خربزه تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک به‌ترتیب ۴۰/۲، ۸٤/٤ و ۹۲/۸ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۳- میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در سه توده خربزه بومی سیستان (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) تحت تیمار با تنش شوری. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری در سطح پنج درصد می‌باشد.

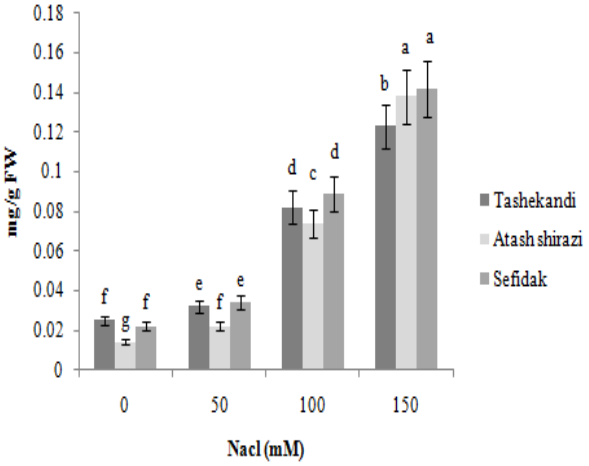


شکل ٤- میزان فعالیت آنزیم گایاگول پراکسیداز (GPX) در سه توده خربزه بومی سیستان (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) تحت تیمار با تنش شوری. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد.

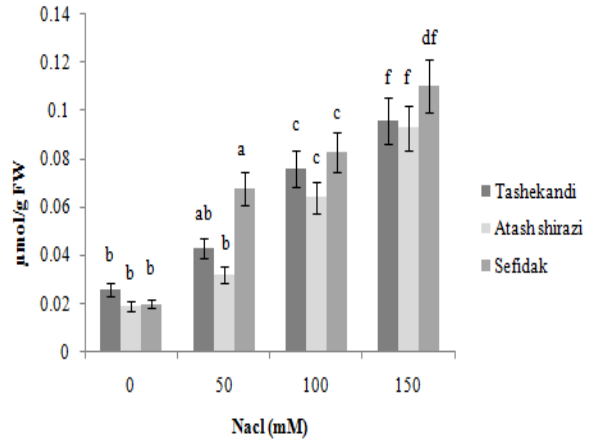
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که شوری تاثیر معنی‌داری بر میزان پرولین توده‌های خربزه دارد (جدول ۲). مقایسه میانگین نتایج حاصل از تأثیر تنش شوری بر میزان پرولین اندام هوایی نشان داد با افزایش غلظت شوری از صفر (نمونه شاهد) تا ۱۵۰ میلی مولار میزان پرولین از یک روند افزایشی پیروی می‌کند. به طوری که در سطح شوری ۱۵۰ میلی مولار میزان پرولین در توده‌های خربزه تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک نسبت به شاهد ٦/٨٦، ٨ /٦٩ و ٤/٨٩ درصد افزایش معنی‌داری یافت (شکل ٦).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک متأثر از سطوح مختلف تیمار شوری در سه توده بومی خربزه سیستان

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	گایاکول پراکسیداز	کربوهیدرات	پرولین
بلوک	۲	۱۳۲۷/۸	۵۷۱۸/۲	٤۱۰/٤۱	۰/۰۰۲۳۳	۰/۰۰٤۵۳۹
شوری	۳	٤۷۵۹۹/٦**	۹۱۱۲٦/۹**	۳۷۲۹۹/٤**	۰/۰۲٤۷۲**	۰/۰۰۹۲۵۹**
توده	۲	۲٦۹۵۵/٤**	۲٤۸۷٦/٤**	۳۳٦۹۵/۱**	۰/۰۱۰۵۰**	۰/۰۰٤۲۳۰**
شوری × توده	۳	۷۹۹۷۷/۲**	۲٦۰٤۳/۷**	۲۰۵۷/۷۹**	۰/۰۱۵۵٦**	۰/۰۰۵۰۱۳۲**
خطا	۲۲	۲۸۹٤۹/۱	۳۳۳۸/۷	۲۱۷/۲	۰/۰۰۱۲۷۳	۰/۰٤۷۱٤
ضریب تغییرات		۳/۹	٤/٤	۲/٦	۵/٤	۹/٦



شکل ۵- میزان کربوهیدرات در سه توده خربزه بومی سیستان (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) تحت تیمار با تنش شوری. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد.



شکل ٦- میزان پرولین در سه توده خربزه بومی سیستان (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) تحت تیمار با تنش شوری. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد.

بحث

اخیراً پیشرفت بزرگی درباره انتقال سیگنال تنش شوری در گیاهان روی داده است (Kaur and Ligterink 2005). انواع مختلفی از ژن‌ها و رونوشت آن‌ها در پاسخ به تنش‌های گوناگون و در نقش‌های مختلف دخالت دارند که درک این نقش‌ها به حل مشکلات مقاومت به تنش شوری و خشکی کمک بسیاری می‌کند (Wei 2014). تا کنون تلاش‌های بسیاری در جهت فهم مکانیسم سلولی و مولکولی گیاهان متحمل به تنش شوری با هدف بهبود تحمل این گیاهان به این تنش رخ داده است (Knaupp et al. 2011). شواهد فراوانی نشان داده که در مواجهه با شوری تغییرات فراوانی در بیان ژنی رخ می‌دهد (Wei 2014). به منظور بقا در شرایط تنش، گیاهان به تغییرات رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمی پاسخ داده و سازگار می‌شوند. این سازگاری، شامل القای بیان ژن و سنتز تعدادی از پروتئین‌ها می‌باشد. گیاهان تحت تنش شوری، تغییراتی در فعالیت آنزیم‌ها، تجمع mRNA، فتوسنتزها، میزان کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدها از خود نشان می‌دهند. ژن‌های کد کننده پروتئین‌ها با توالی مشابه پروتئازها، که به‌وسیله شوری القا می‌شوند، از *Pisum sativum* L. *Arabidobsis thaliana* جدا شده‌اند (Ingram and Bartels 1996). سنتز اولیگو ساکاریدهای خانواده رافینوز در فرایندهای فیزیولوژیکی و رشدی در گیاهان مستلزم شده‌است. آنزیم گالاکتینول سنتاز، تشکیل گالاکتینول را از UDP- گالاکتوز و میو- اینوزیتول ، کاتالیز می‌کند (Galye et al. 2003). اعضای خانواده Cucarbitacea، Scorpholariacea، Labiatae و احتمالاً دیگر خانواده‌های گیاهی، مقادیر زیادی از

اولیگوساکاریدهای خانواده رافینوز را در بافت‌های خود جایگزین می‌کنند (Zimmerman and Ziegler 1975; Turgeon et al. 2001). بعضی گونه‌های گیاهی رافینوزها را در پاسخ به تنش درجه حرارت پایین می‌سازند. گالاکتینول سنتاز تشکیل گالاکتوز از گالاکتینول و الیگوساکاریدهای خانواده رافینوز را کاتالیز می‌کند. رابطه گالاکتینول سنتاز نسبت به خشکی و شوری به خوبی استناد شده‌است (Galye et al. 2003). تحقیق حاضر نخستین گزارش تأثیر شوری بر بیان ژن *GAS* در توده‌های بومی خربزه سیستان (تاشکندی، آتش شیرازی و سفیدک) است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که بیان ژن‌های *GAS* آرابیدوپسیس (*AtGolS1* و *AtGolS2*) در پاسخ به تنش شوری و خشکی افزایش یافته بودند در حالی‌که *AtGolS3* در پاسخ به درجه حرارت پایین تجمع یافته بود (Taji et al. 2002). دو ژن *GAS* به نام‌های *GmGAS1* و *GmGAS2* در خربزه کلون شده بود (Galye et al. 2003). در خربزه رافینوز و استاکیوز جایگزین قند در بافت آن شده و نیز در بذور بالغ تجمع می‌یابند (Galye et al. 2003). بیان ژن گالاکتینول سنتاز و فعالیت آن در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در بعضی از گونه‌های گیاهی اشاره شده‌است (Chunliu et al. 2013). فعالیت گالاکتینول سنتاز در دانه‌های لوبیا قرمز (*Phaseolus vulgaris*) بر اثر قرارگیری در شرایط آب و هوای سرد افزایش یافت (Liu et al. 1998). در این تحقیق تحت تأثیر شوری میزان بیان ژن *GAS* در سه توده بومی خربزه سیستان بررسی شد. نتایج بررسی بیان ژن *GAS* بیانگر این است که بیان ژن *GAS* تحت تیمار غلظت‌های مختلف شوری سیر افزایشی دارد به طوری‌که بیش‌ترین مقدار بیان ژن *GAS* در غلظت شوری ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد و در غلظت شوری ۵۰ میلی‌مولار کم‌ترین میزان بیان ژن مشاهده شد ولی هم‌چنان نسبت به شاهد در غلظت‌های مختلف شوری بیان ژن *GAS* افزایش معنی‌داری در هر سه توده بومی خربزه سیستان مشاهده شد. به این ترتیب که بیان ژن *GAS* در توده خربزه بومی تاشکندی در سه سطح شوری (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. در توده آتش شیرازی هم در سطوح مختلف شوری (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) بیان ژن مورد نظر افزایش نشان داد ولی نسبت به توده‌های دیگر این افزایش کمتر بود. در توده سفیدک بین سطح تظاهر ژن *GAS* تحت حالات مختلف شوری و کنترل، تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود داشت به‌علاوه بیان ژن *GAS* در این توده نسبت به دیگر توده‌های مورد آزمایش افزایش معنی‌دار بیش‌تری مشاهده شد. بنابراین تحمل به تنش شوری در میان توده‌های مورد بررسی در سفیدک بیشتر و در توده آتش شیرازی کمتر ولی همچنان نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. نکته در خور تأمل در بیان این ژن که پس از انجام واکنش پی سی آر کمی مشخص شد این بود که قبل از اعمال تنش شوری در سه توده خربزه بومی سیستان تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بیان این ژن مشاهده نمی‌شد و میزان بیان در این ژنوتیپ‌ها نزدیک به هم بود اما پس از اعمال تنش تفاوت در بیان افزایش یافت که این مسئله بیانگر این است که ژن *GAS* در اثر تنش شوری در توده‌ها القا شد و تحت تنش الگوی بیان در توده‌ها تفاوت نشان داد. تحت شرایط نامساعد محیطی، تعداد زیادی رادیکال آزاد اکسیژن در سلول‌های گیاهی تجمع می‌یابند و باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و در نهایت منجر به کاهش رشد و حتی در موارد شدیدتر مرگ گیاه می‌شود. گیاهان در مقابل این شرایط به‌وسیله سامانه آنزیمی می‌توانند رادیکال آزاد اکسیژن را تخریب کنند. سامانه آنزیمی شامل آنزیم‌های آنتی اکسیدان از قبیل آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) می‌باشد. پراکسید هیدروژن به‌صورت طبیعی اغلب از زنجیره انتقال الکترون و بعضی از واکنش‌های آنزیمی در کلروپلاست گیاهان ایجاد می‌شود (Liu et al. 2013). نتایج تجزیه آماری داده‌ها در جدول ۲ نشان می‌دهد، تفاوت معنی‌داری بین توده‌ها، سطوح مختلف شوری و اثر متقابل این دو بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) وجود دارند. با بالا رفتن میزان شوری از شاهد به ۱۵۰ میلی مولار بر میزان فعالیت تمامی این آنزیم‌ها افزوده شد. Neill et al. (2002) گزارش دادند تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان علاوه بر تغییرات یونی و تنظیم کننده‌های اسمزی می‌تواند به‌عنوان یکی از موارد تأثیر گذار تنش شوری بر گیاهان در نظر گرفته شود. بسته به میزان حساسیت گونه گیاهی، مرحله رشد، شدت و مدت تنش غلظت و فعالیت این نوع آنزیم-

ها تغییر خواهند کرد. بر اساس نظر Mckersie and Leshem (1993) آنزیم کاتالاز (CAT) در پراکسیزوم، سیتزول و میتوکندری وجود دارد و سبب تبدیل H_2O_2 به H_2O و O_2 می‌شود. هم‌چنین آنزیم APX از آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون در ابتدای سیکل گلوتاتیون آسکوربات استفاده می‌کند و نقش مهمی در سمیت زدایی H_2O_2 در سلول دارد. نتایج حاصل از داده‌های این آزمایش نشان داد در سه توده بومی خربزه سیستان هر سه نوع آنزیم آنتی‌اکسیدان با هم فعال شده، سبب کاهش اثرات سوءتنش اکسیداتیو بر گیاهان می‌شوند. در جدول ۲ مشاهده می‌شود شوری تأثیر معنی‌داری بر میزان تجمع دو تنظیم کننده اسمزی کربوهیدرات و پرولین در بافت سبز بخش هوایی توده‌های خربزه دارد. با بالا رفتن میزان شوری شاهد به ۱۵۰ میلی مولار بر غلظت هر دو آن‌ها افزوده شد. بر اساس پژوهش‌ها، تنش‌های محیطی به ویژه تنش شوری، موجب افزایش قندهای محلول نظیر ساکارز، گلوکز و فروکتوز می‌شود (Sotripopoulos 2007; Dasgan 2015)، زیرا قندها از اسمولیت‌های سازگار به شمار می‌آیند و سبب تنظیم اسمزی، حفظ تورگر سلولی و پایداری پروتئین‌ها می‌شوند (Ashraf 2004). بنابراین تجمع قندهای محلول، سبب افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش شوری می‌شوند. افزایش محتوای قندهای محلول در شرایط تنش شوری در سایر بررسی‌ها نیز گزارش شده‌است (Ashraf 2004; Sotripopoulos 2007; Dasgan 2015) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. سلول با سنتز و تجمع ترکیبات تنظیم کننده اسمزی به تنش شوری پاسخ می‌دهد. تجمع پرولین قدر مطلق پتانسیل اسمزی سلول را افزایش می‌دهد، سلول را در برابر آسیب‌های اسموتیک از طریق تثبیت پروتئین‌ها و غشای سلولی و تنظیم pH و تورژسانس محافظت می‌کند و به این ترتیب زمینه تحمل تنش شوری را فراهم می‌کند (Saleh and Maftoun 2008) تجمع پرولین در شوری‌های بالا ممکن است به‌خاطر کاهش اکسیداسیون پرولین یا تحریک سنتز آن از گلوتامات یا افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز باشد (Weisany et al. 2012). با توجه به افزایش فعالیت اورنیتین آمینوترانسفراز و پیرولین۵-کربوکسیلات ردوکتاز، آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز پرولین و هم‌چنین به دلیل مهار پرولین اکسیداز و پرولین دهیدروژناز و پرولین کربوکسیلاز میزان پرولین در شوری افزایش می‌یابد (Weisany et al. 2012). بررسی‌ها نشان دادند که با افزایش سطوح تنش شوری، مقدار پرولین افزایش یافت (Molazem et al. 2010; Weisany et al. 2012) که با نتایج حاصل مطابقت نشان داد. همراه با بالا رفتن سطح شوری از شاهد به ۱۵۰ میلی‌مولار، غلظت این دو ترکیب هم‌زمان افزایش یافت که نشان دهنده استفاده از هر دو نوع این ترکیبات آلی برای تنظیم اسمزی در گیاه خربزه است. به‌نظر می‌رسد این گیاه تحت تنش شوری برای تخریب H_2O_2 ایجاد شده در سلول‌های گیاهی سامانه آنزیمی خود را فعال نموده و در نتیجه بیان ژن *GAS* افزایش می‌یابد. همچنین گمان می‌رود که بیان ژن *GAS* در ۳ توده خربزه بومی سیستان تحت چنین شرایطی سبب سنتز قندهای قابل حل همچون قندهای خانواده رافینوز شود که برای حفاظت گیاه در برابر تنش‌های محیطی مؤثر است و می‌تواند به گیاه برای تحمل به تنش شوری کمک کند. بنابراین افزایش فعالیت ژن *GAS* می‌تواند باعث تحمل و زنده ماندن گیاه تحت تنش شوری شود. بدیهی است تحقیقات بیش‌تری برای نشان دادن چگونگی مکانیسم افزایش بیان ژن *GAS* تحت تنش شوری مورد نیاز است، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که خانواده رافینوز مخصوصاً رافینوز در مقاومت نسبت به سرما هم در گیاهان چوبی (Strimbeck et al. 2007) و هم در گیاهان علفی هم‌چون آرابیدوپسیس (Taji et al. 2002; Klotke et al. 2004; Rohde et al 2004; Knaupp et al. 2011) و یونجه تأثیر مهمی از خود نشان دادند (Cunningham et al. 2003). بررسی‌ها نشان داد افزایش بیان ژن *GAS* در یونجه نقش مهمی در تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند (Zhuo et al. 2013). افزایش بیان سه ژن *GolSs* (*CaGol1*، *CaGol2* و *CaGol3*) در قهوه (*Coffea arabica*) همراه با افزایش رافینوز و استاکیوز باعث تحمل به تنش‌های کمبود آب، شوری زیاد و گرما شد (Santos et al. 2011). طی بررسی‌های انجام شده تنش شوری باعث افزایش بیان ژن آسکوربات پراکسیداز (*APX*) در توده‌های خربزه بومی سیستان شد (Montazerinezhad 2014). در این مطالعه نیز با گزارش‌های ذکر شده بیان ژن *GAS* با افزایش سطح شوری افزایش یافت. بنابراین ما معتقدیم که *GAS* نقش بسزایی در

گیاهان تحت تنش برعهده دارد و فعالیت خود را با رونویسی و بیان ژن *GAS* تنظیم می‌کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه آقای محسن نادری و خانم سمیه منتظری‌نژاد و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

Appel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.

Ashraf M (2004) Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. Flora 199: 362-376.

Bachmann M, Matile P, Keller F (1994) Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. Plant Physiology 105:1335-1345.

Bahrami S, Solouki M, Siassar BA, Ghanbari A (2009) Evalution of TaGSK1 gene expression in selected wheat genotypes as salinity markerassisted selection. Biotechnology 8: 281-284.

Bates LS, Waldren SP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Beers GR, Sizer IW **(**1952) Aspectro photometric method for measuring the breakdown to hydrogen peroxide by catalase. Biology Chemistry 195:133-140.

Chunliu Z, Ting W, Shaoyun L, Yaqing Z, Xiaoguang L, Zhenfei G (2013) Acold responsive galactinol synthase gene form Medicago multiple tolerances to abiotic stresses. Physiologia Plantarum 149:67-78.

Cunningham SM, Nadeau P, Castonguay Y, Laberge S, Volenee JJ (2003) Raffinose and stachyose accumulation, galactinol synthase expression, and winter injury of contrasting alfalfa germplasms. Crop Science 43:562-570.

Dasgan HY (2015) The effectiveness of grafting to improve salt tolerance of sensitive Melon when the tolerant Melon is use as rootstock. Procedia Environmental Sciences 29: 268.

Esfandiari E, Shakiba MR , Mahboob SA, Alyari H, Firozabad M (2007) Effect of water stress on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation of wheat seedlings. Agriculture Science 19: 130-138.

Flowers TJ (2004) Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany 55: 307-319.

Gayle MV, Edith EH, Haritatos RT (2003) Galactinol synthase gene expression in melon. Journal of the American Society For Horticultural Science 128:8-15.

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

Good AS, Zaplachiniski S (1994) The effects of drought on free amino acid accumulation and protein synthesis in Brassica napus. Physiologia Plantarum 90: 9-14.

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water culture method for growing plant without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347:32-33.

Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual Review of Plant Physiology 47:377-403.

Jimenez A, Creissen G, Kular R, Firmin J, Robinson S, Phil M (2002) Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. Planta 214: 751-758.

Kaur N, Ligterink AT (2005) Signal transduction pathway under abiotic stress in plant. Current Science 86: 1771-1780.

Kawara K, Mochida K, Ogihara Y (2008) Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. Functional and Integrative Genomics 8: 277- 286.

Klotke J, Kopka J, Gatzke N, Heyer AG (2004) Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation - evidence for a role of raffinose in cold acclimation. Plant Cell and Environment 27:1395-1404.

Knaupp M, Mishra KB, Nedbal L, Heyer AG (2011) Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles. Planta 234:477-486.

Liu JJ, Krenz DC, Galvez AF, Lumen BO (1998) Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. Plant Science 134:11-20.

Liu D, Pei ZF, Naeem MS, Ming DF, Liu HB, KhanF, Zhou WJ (2013) 5-Aminolevulinic Acid Activates Antioxidative Defence System and Seedling Growth in *Brassica napus* L. under Water-Deficit Stress. Journal of Agronomy and Crop Science 197:284-295.

McCaskill A, Turgeon R (2007) Phloem loading in Verbascum phoeniceumL. depends on the synthesis of raffinose-family oligosaccharides. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 104:19619-19624.

Mc Kersie DB, Leshem Y (1994) Stress and Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers. London.

Mirzaee M, Moieni A, Ghanati F (2013) Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two Canola (*Brassica napus* L.) cultivars Tabacco. Agricultural Science Technology 15: 593-602.

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

Molazem D, Azimi J (2013) Morphological changes of maize cultivars under condition of soil salinity. International Journal of Agriculture and Crop Science 6: 866-868.

Molazem D, Qurbanov EM, Dunyamaliyev SA (2010) Role of proline, Na and chlorophyll content in salt tolerance of corn (*Zea mays* L.). American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 9: 319-324.

Montazerinezhad s (2014) Ascorbat peroxidase (APX) gene expression in sistan melon landrace (*Cucumis melo* L.) using Real Time- PCR under salt stress. Disseratation, University of Zabol, Iran.

Munns R (1993) Physiological process limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. Plant Cell and Environment 16:15-24.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidaes in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22:867-880.

Neill S, Desika R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide signaling curropin. Plant Biology 5:388-395.

Pennycooke JC, Jones ML, Stushnoff C (2003) Down-regulatingα-galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. Plant Physiology 133:901-909.

Peters S, Mundree SG, Thomson JA, Farrant JM, Keller F (2007) Protection mechanisms in the resurrection plant Xerophyta viscose (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. Journal of Experimental Botany 58:1947-1956.

Peters S, Keller F (2009) Frost tolerance in excised leaves of the common bugle (*Ajuga reptans* L.) correlates positively with the concentrations of raffinose family oligosaccharides (RFOs). Plant Cell and Environment 32:1099-1107.

Peyvast GH (2006) Planting, Dissemination of Agriculture science.

Rezvani Moghaddam P, Koocheki. A (2001) Research history on salt affected lands of Iran: Present and future prospects-Halophytic ecosystem. International Symposium on Prospects of Saline Agriculture in the GCC countries, Dubai, UAE.

Rohde P, Hincha DK, Heyer A (2004) Heterosis in the freezing tolerance of crosses between two *Arabidopsis thaliana* accessions (Columbia-0 and C24) that show differences in nonacclimated and acclimated freezing tolerance. Plant Journal 38:790-799.

Saleh J, Maftoun M (2008) Interactive Effects of NaCl Levels and Zinc Sources and Levels on the Growth and Mineral Composition of Rice. Journal of Agriculture Science and Technology 10: 325-336.

Santos TB, Budzinski IG, Marur CJ, Petkowicz CL, Pereira LF, Vieira LG (2011) Expression of three galactinol synthase isoforms in (*Coffea arabica* L.) and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. Plant Physiolology and Biochemistry 49: 441-448.

Schlegel HG (1956) Die verwertung organischer sauren durch chlorella in lincht. Planta 47: 510.

Sotripopoulos TE (2007) Effect of NaCl and CaCl2 on grown and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugar in the apple rootstock M4 cultured in vitro. Biologia Plantrum 51: 177-180.

Strand A, Foyer CH, Gustafsson P, Gardestrom P, Hurry V (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. Plant Cell and Environment 26:523-535.

Strimbeck GR, Kjellsen TD, Schaberg PG, Murakami PF (2007) Cold in the common garden: comparative low-temperature tolerance of boreal and temperate conifer foliage. Trees-Structure and function 21:557-567.

Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi Turgeon R, Medville R, Nixon KC (2002) The evolution of minor vein phloem and phloem laoding. American Journal of Botany 88:1331-1339.

Urbanek H, Kuzniak-Gebarowska E, Herka, K (1991) Elicition of defense responses in bean leaves by Botrytis cinerea polyglacturonase. Journal of Plant Physiology 13:43-50.

Wei S (2014) Comparative Analysis of Gene Expression in Two Muskmelon Cultivars (*Cucumis melo* L.) under salt stress. Journal of Integrative Agriculture 13: 2132-2140.

Weisany W, Sohrabi Y, Heidari Gh, Siosemardeh A, Ghassemi-Golezani K (2012) Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). Plant Omics Journal 5: 60-67.

Xu J, Zhang Y, Guan Z, Wei W, Han L, Chai T (2008) Expression and function of two dehydrins under environmental stresses in (*Brassica juncea* L.). Molecular Breeding 21: 431-438.

Yasar BF, Kusvuran S, Ellialtioglu S (2006) Determination of anti-oxidant activities in some melon (*Cucumis melo* L.) varieties and cultivars under salt stress. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 81:627-630.

Yoon JY (2015) Evaluation of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities from transgenic hairy root cultures of gherkin (*Cucumis anguria* L.). South African Journal of Botany 100: 80-86.

Zakan Sivritepe HO, Nuray S, Atilla E, Turhan. E (2005) The effects of NaCl pre-treatments on salt tolerance of melons grown under long-term salinity. Scientia Horticulturae 106: 568-581.

Zhuo C, Wanga T, Lu S, Zhao Y, Lia X, Guo Z (2013) A cold responsive galactinol synthase gene from *Medicago falcata* (MfGolS1) is induced by myo-inositol and confers multiple tolerances to abiotic stresses. Physiologia Plantarum 149: 67-78.

Zimmerman MH, Ziegler H (1975) List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates, p. 480-503. In Zimmerman MH, Milburn GA (Ed.) Transport in plant: Phloem transport. Springer, New York.

Modern Genetics Journal
Vol 11, Number 2, Summer 2016, Quaternary

The effect of salinity in galactinol synthase (*GAS*) gene expression, antioxidant enzymes activity, carbohydrst and prolin in sistan melon landrace (*Cucumis melo* L.)

Heidari F[1], Naderi S[*1] , Khajeh H[2], Bahari AA[3]

1. Coach, Ph.D Student , Agriculture Faculty, University of Zabol, Iran
2. Master of Agricultural Biotechnology Center, University of Zabol, Iran
3. Assistant Professor, University of Zanjan, Iran
* Corresponding Author, Email: Salehe.Naderi@Gmail.com

A B S T R A C T

Salinity is a major problems in a wide area of Iran. Oligosaccharides of Raffinose family (RFOs) perform several physiological functions in plants such as accumulation of the suger in response to salt stress during seed forming. The synthesis of galactinol, mediated by galactinol synthase (*GAS*), is the first committed step in RFO formation. In order to resist to salinity, plants not only use osmotic regulation but also use a mechanism for increasing activity of antioxidant enzymes. In the present study, In order to determine *GAS* gene expression level, the role of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and gayacol peroxidase (GPX), carbohydrat and proline levels in 3 selected Sistanian melon landraces (*Cucumis melo* L.) which are under salinity, a factorial arrangement in randomized complete block design with three replications experiment was done in Center of Agricultural Biotechnology of Zabol University. Four concentrations including 0, 50, 100 and 150 mM NaCl were used in this study. RNA was extracted from leaf samples and cDNA was designed using reverse transcription. The result showed that *GAS* gene expression increased by increasing salinity level from 0 to 150 mM. In comparison with control, in the highest level of salinity (150 Mm) *GAS* gene expression level increased 10.2-fold in Tashekandi landrace, 7.3-fold in Atashshirazi landrace and 19.79-fold in Sefidak landrace. The gene has the highest level of expression in Sefidak landrace comparing to other landraces. When salinity stress increased in three melon landraces of Tashekandi, Atashshirazi and Sefidak, antioxidant enzymes such as catalase (CAT) 85.9, 63.2 and 87.1 percent, ascorbate peroxidase (APX) 68.89, 36.48 and 92.81 percent, gayacol peroxidase (GPX) 89.25, 72.84 and 70.37 percent, carbohydrat 40.2, 84.4 and 92.8 percent and proline 86.6, 69.8 and 89.4 percent increased in comparison to control.It seems that expression of *GAS* gene synthesizes the sugars of raffinose family in three selected melon landraces in such condition which is effective for plant protection against the environmental stresses. This can help the plant for enduring under the salinity stress. It also provides the condition for plant endurance through the activity of two systems the enzyme activity increase and osmotic regulations.

Key Words

Antioxidative enzyme, Galactinol synthase gene, Gene expression, Melon, salt stress