ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶
صفحه ۲۸۳ - ۲۷۳

بررسی الگوی بیان ژن‌های آهن سوپراکسید دیسموتاز و فریتین–۳ تحت تنش شوری در برگ و ریشه نعناع فلفلی

Evaluation of the expression pattern of *Fe-superoxide dismutase* and *Ferritin-3* genes under salinity in peppermint's leaf and root

راضیه راه‌کان[۱]، حسن سلطانلو[*۱]، سیده ساناز رمضانپور[۱]، سارا خراسانی نژاد[۱]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران، استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Rahkan R[1], Soltanloo H[*1], Ramezanpour S[1], Khoarasaninejad S[1]

1- Graduate MSc Student, Associate Professors, Assistant Professor, Goegan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: soltanlooh@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

تنش شوری فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی را در گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهد. از آن جمله آسیب‌های اکسیداتیو اجزای سلولی می‌باشد که توسط گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد می‌شوند و در مقابل، آنزیم‌های آنتی اکسیدان باعث جلوگیری از این آثار مخرب می‌شوند. در این تحقیق تغییرات بیان ژن‌های آهن سوپراکسید دیسموتاز و فریتین-۳ تحت تنش شوری (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) در گیاه نعناع فلفلی با روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، یک هفته و یک ماه پس از شروع تنش از برگ و ریشه گیاه نمونه برداری انجام گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن *FeSOD* با افزایش تنش شوری در هر دو نمونه برگ و ریشه افزایش یافت، اما این افزایش بیان در برگ‌ها بیش‌تر و پایدارتر بود. در برگ‌ها ۲۴ ساعت پس از شروع تنش بیان ژن *FeSOD* کاهش یافت، اما با گذر زمان تا یک هفته افزایش در بیان این ژن مشاهده شد. پس از یک ماه اعمال تنش، بیان این ژن در نمونه برگ مجدداً به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. در ریشه نیز در نمونه‌برداری ۲۴ ساعت، بیان ژن *FeSOD* کاهش داشت، اما در زمان‌های ۴۸ ساعت، یک هفته و یک ماه پس از تنش، بیان این ژن به مقدار جزیی افزایش یافت. بیان ژن فریتین در سطوح مختلف شوری در نمونه برگ با ریشه تفاوت داشت، به طوری‌که در برگ در سطوح پایین تنش (۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار) میزان بیان ژن افزایش یافته و با افزایش سطح شوری میزان بیان ژن کاهش یافت. اما در ریشه در تمامی سطوح تنش بیان ژن کاهش نشان داد. در مورد زمان‌های مختلف نمونه‌برداری پس از شروع تنش نیز بیان ژن فریتین در برگ و ریشه با هم متفاوت بود، به گونه‌ای که در زمان‌های اولیه پس از شروع تنش (۴۸ ساعت) در برگ‌ها افزایش معنی‌داری در بیان ژن مشاهده شد و تدریجاً با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض تنش بیان ژن کاهش یافت. اما بیان این ژن در ریشه در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت و یک هفته کاهش یافته و با رسیدن به یک ماه قرارگیری در معرض تنش به میزان قابل توجهی افزایش نشان داد.

واژه‌های کلیدی

آهن سوپراکسید دیسموتاز
بیان ژن
شوری
فریتین
نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]

مقدمه

نعناع فلفلی[1] با نام علمی *Mentha piperita* L. متعلق به خانواده Lamiaceae گیاهی علفی، چند ساله و ریزوم‌دار است. این گیاه گونه‌ای هیبرید است که به‌طور طبیعی از تلاقی بین گونه‌های *Mentha aquatica* و *Mentha spicata* حاصل شده‌است. بذر آن فاقد قوه نامیه است و عمدتاً به طریق رویشی تکثیر می‌شود. نعناع فلفلی از جمله گیاهان دارویی است که به‌واسطه اثرات دارویی متعدد از دیرباز توجه محققان را به خود معطوف داشته است. مصرف این گیاه در اشکال مختلف دارویی، غذایی و بهداشتی سبب امتیاز آن نسبت به سایر گیاهان دارویی شده‌است. اثرات ثمربخش این گیاه به اسانس آن (که جزیی از متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شود) نسبت داده شده‌است، بنابراین هر عاملی که بر کمّیت و کیفیت اسانس اثرگذار باشد، مورد توجه قرار می‌گیرد (Omidbeigi 2009). شوری از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده می‌باشد که هر ساله خسارت‌های زیادی به گیاهان زراعی در سطح جهان وارد می‌نماید. اکثر گیاهان زراعی به تنش شوری حساس هستند و نمی‌توانند در شرایط شوری بسیار حاد زنده بمانند و در صورت زنده ماندن، مقدار محصول آن‌ها اندک خواهد بود. گیاهان از طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و هم‌چنین سلولی و مولکولی به این تنش پاسخ داده و خود را با شرایط محیطی منطبق و یا متحمل می‌سازند (Bray et al. 2000). به محض درک و تشخیص تغییرات درون سلولی، مسیرهای پیام-رسانی مختلفی به‌منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع شده و هریک از آن‌ها بیان دسته‌ای خاص از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را سبب می‌شوند. فعالیت کامل همه این آبشارهای پیام رسانی القا شده، منجر به انطباق گیاه و در نتیجه تحمل تنش در آن می‌شوند (Leonardis et al. 2007). گزارش شده‌است که همه تنش‌های محیطی تولید گونه‌های فعال اکسیژن[2] (ROS) را که باعث آسیب اکسیداتیو می‌شوند، هدایت می‌کنند. انواع اکسیژن فعال از میل ترکیبی بسیار بالایی جهت واکنش با بیومولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک برخوردار است. آسیب به بیومولکول‌های یاد شده به‌ترتیب سبب تخریب پروتئین‌ها، پراکسیده شدن لیپیدها، جهش در ساختار DNA و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (Ahmad et al. 2009). گیاهان برای کاستن از آسیب‌های ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال دارای ساز و کارهای آنتی اکسیدانی هستند (Agarwal and Pandey 2004). فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نقش مهمی را در پاکسازی گونه‌های اکسیژن فعال ایفا می‌کنند. این آنزیم‌ها توانایی تحمل به تنش در گیاه را افزایش داده و پیری را به تأخیر می‌اندازند (Alscher et al. 2002).

سوپراکسید دیسموتاز[3]‌ها (SOD)، آنزیم‌های فلزی هستند که اولین خط دفاعی در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال اکسیژن می‌باشند. آنزیم‌های SOD، رادیکال سوپراکسید ($O^{\cdot-}$) تولید شده به‌وسیله زنجیره انتقال الکترون در کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها را با تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) از بین می‌برند. پراکسید هیدروژن نیز توسط کاتالازها (CAT) و پراکسیدازها (POX) در بخش‌های مختلف سلولی از بین برده می‌شود (Bowler et al. 1994). محققان متعددی به دخالت این آنزیم در حفاظت از سلول در تنش‌های مختلف اشاره کرده‌اند. فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان از جمله SOD در تمام غلظت‌های نمک در دو رقم پنبه به طور تصاعدی افزایش یافت (Desingh and Kanagaraj 2007). با افزایش غلظت کلرید سدیم، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در *Hydrilla verticillata* L. افزایش یافت (Panda and Khan 2004). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تحت تنش شوری غالباً با افزایش تحمل به شوری در ارتباط است (Mittova et al. 2004).

فریتین پروتئین ذخیره‌ای آهن است که در تمام یوکاریوت‌ها وجود دارد و از ۲۴ زیر واحد تشکیل شده‌است (Sickmann et al. 2003). در گیاهان این پروتئین توسط هسته کد شده و به پلاستیدها منتقل می‌شود. فریتین از طریق شرکت در محافظت از کلروپلاست‌ها نقش مهمی در پاسخ به تنش اکسیداتیو در گیاهان بازی می‌کند (Lobreaux et al. 1995). مطالعات مختلفی که به-منظور بررسی اثرات بیان بیشتر فریتین در سیتوپلاسم و یا پلاستیدها در گیاهان تراریخت صورت گرفته است بیانگر افزایش توان گیاه به هنگام مواجهه با تنش‌ها است. توتون تراریخت با ژن

---
1 Peppermint
2 Reactive Oxygen Species
3 Superoxide dismutase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]

فریتین که سطح بیش‌تری از فریتین را در خود بیان می‌نمود، نسبت به تنش سرما مقاومت بیشتری نشان داد (Hegeduse et al. 2002). می‌توان یک نقش فعال برای این پروتئین در شبکه تنش اکسیداتیو حدس زد چون فریتین می‌تواند به‌صورت بالقوه دسترسی به آهن را برای آنزیم‌هایی که آهن را به‌عنوان یک کوفاکتور استفاده می‌کنند، افزایش دهد (Paramonova et al. 2004). هدف از این تحقیق، بررسی مقایسه‌ای اثر تنش شوری بر بیان ژن‌های آهن سوپراکسید دیسموتاز و فریتین-۳ در برگ و ریشه نعناع فلفلی با استفاده از تکنیک Real time PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نشاهای نعناع فلفلی، که متعلق به یک توده وارداتی از انگلیس بود، از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهران تهیه شد. ابتدا این نشاها به‌منظور تکثیر در تعدادی گلدان با بستر خاک کشت شد. پس از گذشت دو ماه از بین نشاهای رشد یافته گیاهچه‌های مناسب انتخاب شده و به گلدان‌های جدید با بستر پرلیت-کوکوپیت به نسبت ۲:۱ انتقال یافت. از آن جایی که بستر پرلیت-کوکوپیت فاقد مواد غذایی است، گلدان‌ها هر روز با ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول 1x هوگلند[1] (Hoagland and Arnon 1950) آبیاری می‌شد. تنش شوری در سطوح شاهد، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار اعمال شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، یک هفته و یک ماه پس از شروع تنش از برگ‌ها و ریشه گیاه نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری در نیتروژن مایع قرار گرفته و برای استخراج RNA کل در مرحله بعد، در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از پودر کردن بافت‌های گیاهی در ازت مایع با استفاده از هاون چینی، استخراج RNA کل توسط کیت pBiozol شرکت Bioflax مطابق دستورالعمل مربوطه انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانوفتومتر شرکت IMPLEN ارزیابی شد. نمونه-های RNA به‌منظور حذف DNA ژنومی با آنزیم *DNaseI* تیمار شده، سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid شرکت فرمنتاز و با توجه به دستورالعمل مربوطه انجام شد. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 با توجه به ویژگی‌های مورد نظر برای استفاده در آزمون با روش QRT-PCR، بر اساس توالی ژن‌های مورد نظر در سایت NCBI طراحی شدند (جدول ۱). واکنش Real time PCR با استفاده از تکنولوژی رنگ سایبرگرین و کیت سایبربیوپارس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در دستگاه iQ5 شرکت BIO-RAD ایالات متحده امریکا که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد، در سه تکرار آزمایشی انجام شد. ژن گلیسر آلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به‌عنوان ژن کنترل داخلی[2] استفاده شد. درون هر تیوب از پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۰ میکرولیتر از محلول کیت، یک میکرولیتر از هر آغازگر، پنج میکرولیتر cDNA و سه میکرولیتر آب‌مقطر ریخته شد.

[1] Hoagland

[2] Housekeeping gene

جدول ۱- مشخصات آغازگرها

نام ژن	توالی 5′→3′	درصد GC	دمای ذوب	طول محصول (جفت باز)
آهن سوپراکسید دیسموتاز	L-TGGGGGAAGCATCACAGAG R-GATTCCACACCTGAGCAGCA	۵۷/۸۹ ۵۵	۶۲/۲۲ ۶۲/۴۱	۱۵۴
فریتین	L-GATCATGCGGAGAAAGGAGATG R-CCTTTACCCACTCGCCTCAA	۵۰ ۵۵	۶۳/۲۳ ۶۲/۴۳	۲۱۸
گلیسر آلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز	L-ACCCTCAACAATGCCAAACC R-GATCTCCGCCCCTAGCAAA	۵۰ ۵۷/۸۹	۶۲/۰۷ ۶۲/۵۳	۲۴۶

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]

پس از تهیه حجم مورد نظر واکنش Real time PCR به شرح جدول ۲ انجام شد. پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه و بین دمای ۹۵–۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور بررسی اختصاصیت واکنش PCR رسم شد. اطلاعات به‌دست آمده از دستگاه Real time PCR توسط نرم‌افزار REST تجزیه و تحلیل شده و نمودارهای مربوطه با نرم‌افزار Excel رسم شدند. بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از فرمول Pfaffl et al. (2002) محاسبه شد:

$$\mathrm{Ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(\text{MEAN cotrol} - \text{MEAN sample})}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(\text{MEAN cotrol} - \text{MEAN sample})}}$$

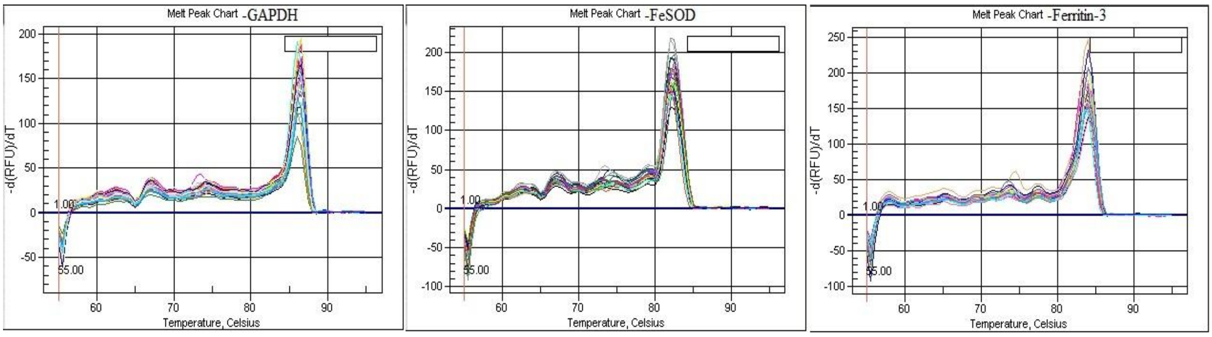
نتایج

مقدار آغازگر و دمای مرحله اتصال آغازگر از فاکتورهای اساسی در بهینه‌سازی واکنش Real-time PCR محسوب می‌شوند. شرایط بهینه طوری فراهم شد که بازدهی واکنش در بهترین حالت ممکن باشد و هیچ محصول غیر اختصاصی در طول واکنش تولید نشود که این امر با استفاده از منحنی ذوب تأیید شد. از این منحنی برای تعیین پرایمر دایمر جهت بهینه‌سازی واکنش و اطمینان از عدم حضور احتمالی رشته‌های غیر اختصاصی استفاده می‌شود. نمونه‌هایی از منحنی تکثیر و منحنی ذوب ژن‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده‌است. نتایج نشان داد که بیان ژن *FeSOD* با افزایش سطوح شوری در برگ افزایش یافت و در سطح ۱۵۰ میلی‌مولار به بیش‌ترین مقدار خود رسید (۵٫۵۱ برابر نسبت به شاهد) (شکل ۳). به‌عبارت دیگر بیان این ژن در برگ با افزایش تیمار شوری یک روند افزایشی داشت و رفته رفته با افزایش سطح تنش میزان بیان ژن افزایش یافت.

جدول ۲– چرخه حرارتی Real-time RT-PCR

زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	مرحله	تعداد چرخه	چرخه
۳۰	۹۵	۱	۱	۱
۱۰	۹۵	۱		
۱۰	۶۲	۲	۴۰	۲
۲۰	۷۲	۳		
۱۰	۵۵⟶ ۹۵	۱	۸۱	۳ (منحنی ذوب)

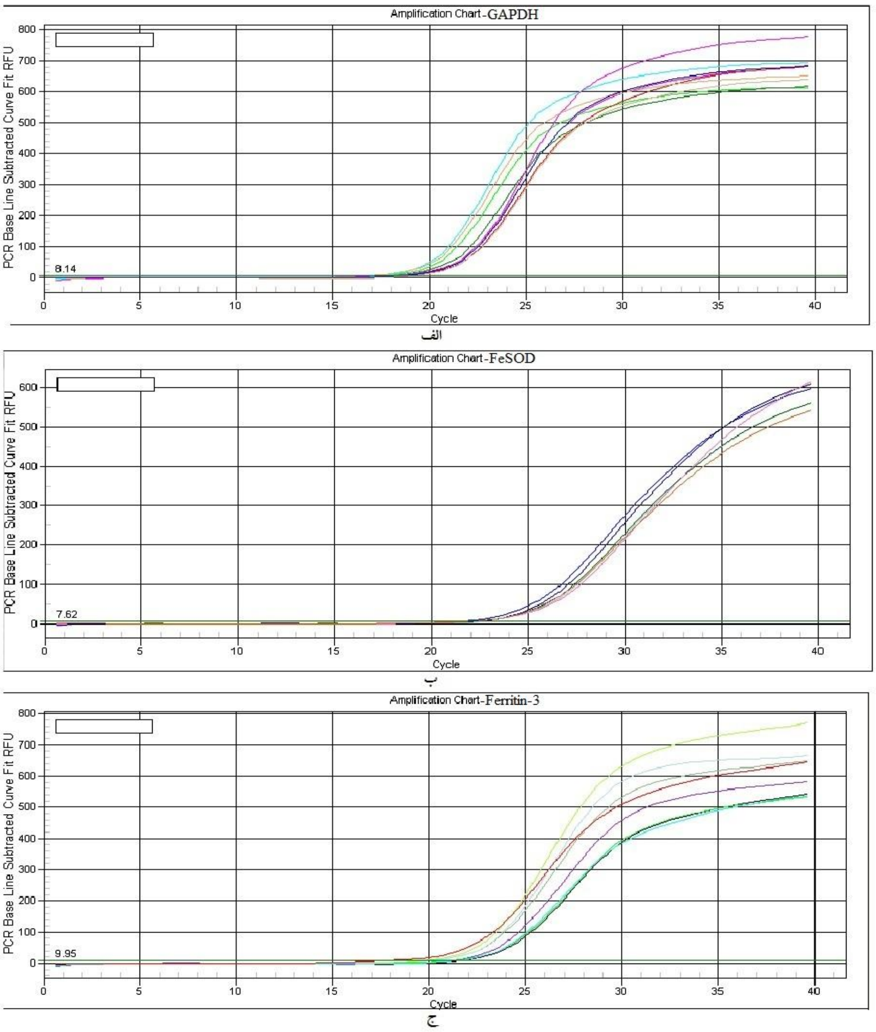
هم‌چنین مشاهده شد که میزان بیان این ژن در ریشه در سطوح اولیه تنش یعنی ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار NaCl به تدریج افزایش یافت و بیش‌ترین میزان افزایش بیان نیز مربوط به همین سطوح بود (به‌ترتیب ۱٫۶۹ و ۱٫۸۷ برابر نسبت به شاهد). اما در سطح ۷۵ میلی‌مولار NaCl میزان بیان آن کاهش یافت (۱٫۰۰۲- برابر نسبت به شاهد). سپس در تیمارهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار افزایش بسیار جزیی در بیان این ژن مشاهده شد (به‌ترتیب ۱٫۴۳ و ۱٫۱۴ برابر نسبت به شاهد) (شکل ۳). در کل می‌توان گفت بیان ژن *FeSOD* در ریشه نیز همانند برگ افزایش یافت، گرچه در برخی سطوح تنش مقدار افزایش بیان جزیی و بیش‌ترین افزایش بیان مربوط به سطوح اولیه تنش بود.



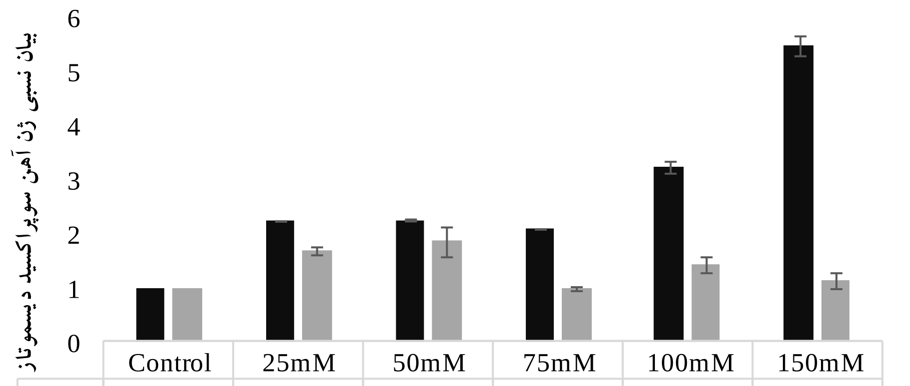
الف ب ج

شکل۱– نمونه‌ای از منحنی ذوب ژن‌های مورد مطالعه، الف) GAPDH، ب) FeSOD و ج) Ferritin

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]



شکل ۲- نمونه‌ای از منحنی تکثیر ژن‌های مورد مطالعه، الف) GAPDH، ب) FeSOD و ج) Ferritin

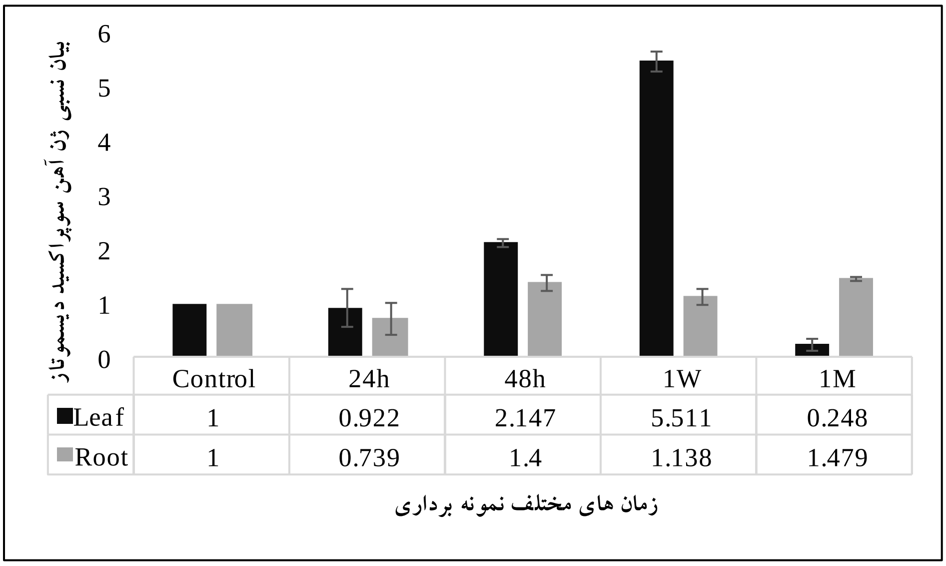


	Control	25mM	50mM	75mM	100mM	150mM
Leaf	1	2.238	2.266	2.094	3.249	5.511
Root	1	1.686	1.866	0.998	1.435	1.138

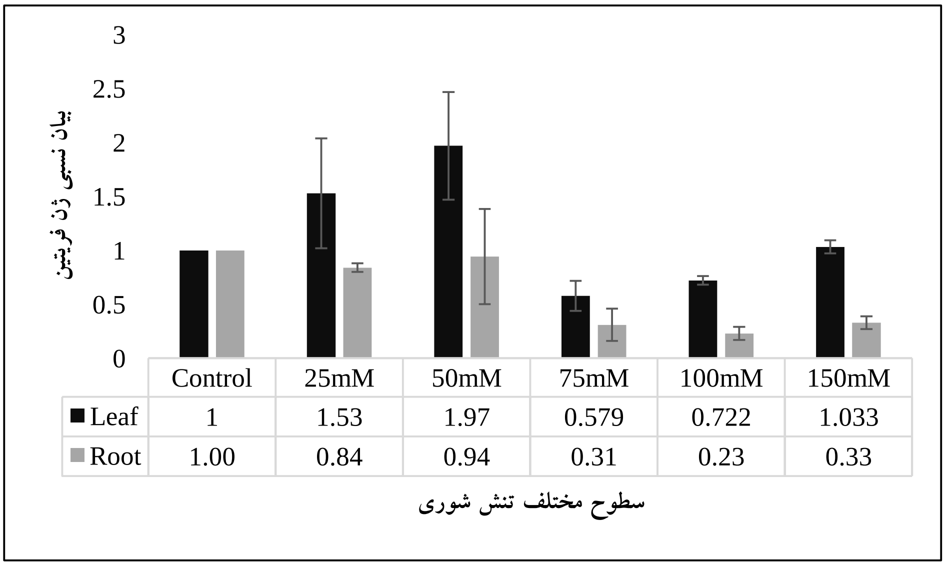
سطوح مختلف تنش شوری

شکل ۳- بیان نسبی ژن آهن سوپراکسید دیسموتاز در پاسخ به سطوح مختلف تنش شوری در برگ و ریشه نعناع فلفلی

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]



شکل ٤- بیان نسبی ژن آهن سوپراکسید دیسموتاز در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در برگ و ریشه نعناع فلفلی



شکل ٥- بیان نسبی ژن فریتین در پاسخ به سطوح مختلف تنش شوری در برگ و ریشه نعناع فلفلی

در این آزمایش در زمان‌های مختلف (۲٤ و ٤۸ ساعت، یک هفته و یک ماه) پس از شروع تنش از ریشه و برگ گیاه نعناع فلفلی نمونه‌برداری شد تا علاوه بر بررسی تغییرات بیان ژن با تغییر سطوح تنش، روند تغییرات با گذر زمان نیز مورد بررسی قرار گیرد. مشاهده شد که در ساعات اولیه پس از شروع تنش (۲٤ ساعت) بیان ژن *FeSOD* در برگ به مقدار جزیی کاهش یافت (۱٫۰۸- برابر نسبت به شاهد)، اما با گذر زمان افزایش در بیان این ژن مشاهده شد، به گونه‌ای که ٤۸ ساعت پس از شروع تنش بیان این ژن ۲٫۲ برابر و یک هفته پس از شروع تنش ۵٫۵ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. اما پس از یک ماه اعمال تنش کاهش معنی‌داری در بیان این ژن در برگ مشاهده شد و میزان بیان ژن در این تیمار تقریباً چهار برابر نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ٤).

همانند برگ در ریشه نیز در نمونه‌برداری ۲٤ ساعت (پس از شروع تنش) ژن *FeSOD* یک کاهش بیان جزیی داشت (۱٫۳۵- برابر نسبت به شاهد)، اما در زمان‌های ٤۸ ساعت، یک هفته و

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]

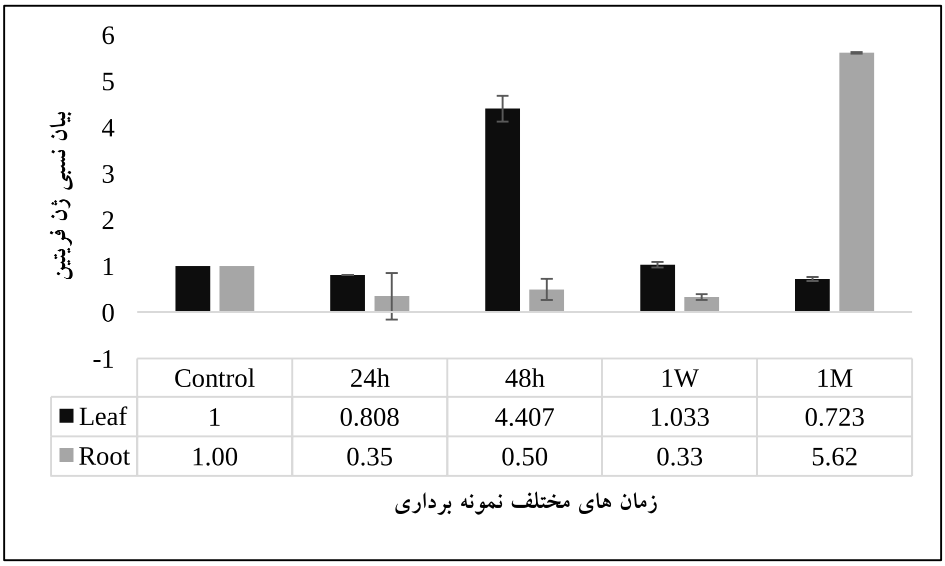
یک ماه بیان این ژن به مقدار جزیی افزایش یافت (به‌ترتیب ۱٫۴، ۱٫۱۴ و ۱٫۴۸ برابر نسبت به شاهد) (شکل ٤).

بیان ژن فریتین در برگ در سطوح اولیه تنش یعنی ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار NaCl به تدریج افزایش یافت، به گونه‌ای که مقدار افزایش بیان ژن در این دو سطح به‌ترتیب ۱٫۵ و ۲ برابر نسبت به شاهد بود. در سطوح ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار کاهش در بیان این ژن مشاهده شد (به‌ترتیب ۱٫۷۳- و ۱٫۳۸- برابر نسبت به شاهد)، ولی در بیش‌ترین سطح تنش (۱۵۰ میلی‌مولار) مجدداً بیان ژن به مقدار جزیی افزایش یافت (۱٫۰۳ برابر نسبت به شاهد) (شکل ۵).

نتایج هم‌چنین نشان داد که ژن فریتین در تمام سطوح شوری در ریشه کاهش بیان داشت. در سطوح اولیه تنش میزان کاهش بیان کمتر بوده (به‌ترتیب ۱٫۱۹- و ۱٫۰۶- نسبت به شاهد در تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار) ولی با افزایش غلظت نمک میزان کاهش بیان افزایش یافت (به‌ترتیب ۳٫۲۳-، ٤٫۳۵- و ۳٫۰۳- برابر نسبت به شاهد در تیمارهای ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) و بیش‌ترین مقدار کاهش در سطح ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (٤٫۳۵- برابر نسبت به شاهد) (شکل ۵).

در مقایسه بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری پس از شروع تنش در برگ مشاهده شد که ۲٤ ساعت پس از اعمال تنش بیان ژن فریتین نسبت به شاهد کاهش یافت (۱٫۲٤- برابر نسبت به شاهد)، اما ٤۸ ساعت پس از شروع تنش میزان بیان این ژن افزایش معنی‌داری داشت و بیان آن حدوداً چهار برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. افزایش بیان این ژن در نمونه‌برداری یک هفته جزیی و غیر معنی‌دار بود (۱٫۰۳ برابر نسبت به شاهد). اما یک ماه پس از شروع تنش بیان این ژن مجدداً کاهش یافت (۱٫۳۸- برابر نسبت به شاهد) (شکل ٦).

نتایج نشان داد که در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت و یک هفته پس از شروع تنش بیان ژن فریتین در ریشه کاهش یافت (به‌ترتیب ۲٫۸٦-، ۲- و ۳٫۰۳- برابر نسبت به شاهد)، سپس افزایش معنی‌داری در بیان این ژن در نمونه‌برداری یک ماه پس از شروع تنش مشاهده شد و بیان این ژن در این تیمار ۵٫٦ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. (شکل ٦).



	Control	24h	48h	1W	1M
Leaf	1	0.808	4.407	1.033	0.723
Root	1.00	0.35	0.50	0.33	5.62

شکل ٦- بیان نسبی ژن فریتین در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در برگ و ریشه نعناع فلفلی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]

بحث

گیاهان غالباً در معرض شرایط تنش می‌باشند و این شرایط، آن‌ها را از رسیدن به پتانسیل ژنتیکی کامل باز می‌دارد و تولیدات گیاهی را در پهنه جهانی محدود می‌سازد. گیاهان نیز از طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و هم‌چنین سلولی و مولکولی به این تنش‌ها پاسخ داده و خود را با شرایط محیطی منطبق و یا نسبت به آن متحمل می‌سازند (Bray et al. 2000). به محض درک و تشخیص تغییرات درون سلولی، مسیرهای پیام‌رسانی مختلفی به‌منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع شده و هریک از آن‌ها بیان دسته‌ای خاص از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را سبب می‌شوند. شناسایی این گونه ژن‌ها و تعیین الگوی بیان آنها در پاسخ به انواع تنش‌ها موجب خواهد شد تا درک بهتری از عملکرد آن‌ها در سازگار نمودن گیاهان به انواع تنش‌ها حاصل شود و راهکارهای مؤثری در اصلاح گیاهان جهت بهبود تحمل به تنش ایجاد شود (Leonardis et al. 2007). ژن‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر (آهن-سوپراکسید دیسموتاز و فریتین-۳) از جمله ژن‌های القا شده در پاسخ به انواع تنش‌ها در سلول هستند و هر یک نقش‌های متفاوتی را در این راستا بر عهده دارند. سوپراکسید دیسموتازها (SOD)، آنزیم‌های فلزی هستند که تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به اکسیژن و هیدروژن پراکسید را کاتالیز می‌کنند و اولین خط دفاعی در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال اکسیژن محسوب می‌شوند (Bowler et al. 1994). فریتین پروتئین ذخیره‌ای آهن است و توانایی ذخیره ۴۵۰۰ اتم آهن در هر مولکول خود را دارد. این عنصر آهن آزاد اضافی را پنهان می‌کند و از تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل در اثر واکنش فنتون جلوگیری می‌کند (Lobreaoux et al. 1995).

همان‌طور که در بخش نتایج نیز ذکر شد، بیان ژن *Fe-SOD* در برگ با افزایش تیمار شوری به تدریج افزایش یافت و در بیش‌ترین سطح تنش (۱۵۰ میلی‌مولار) به بیش‌ترین مقدار خود رسید. در ریشه نیز بیان این ژن با افزایش تیمار شوری افزایش یافت اما بیش‌ترین مقدار افزایش بیان مربوط به سطوح اولیه تنش (۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار) بود. این نتایج با نتایج به‌دست آمده از مطالعه Ghajar (2013) که اثر تنش شوری را بر اندام هوایی گیاه نعناع فلفلی با تکنیک cDNA-AFLP بررسی کرد، مطابقت دارد. این محقق اعلام نمود که بیان ژن آهن سوپراکسید دیسموتاز با اعمال تنش شوری آغاز شده و با افزایش میزان تنش، بیان ژن به مقدار قابل توجهی افزایش می‌یابد. Soleimani et al. (2012) در بررسی اثر شوری بر گیاه زیره سبز مشاهده کردند که با افزایش تیمار شوری تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار بیان ژن‌های *Fe-SOD* افزایش یافت. در برگ خلر اعمال تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کل و آیزوزیم Fe-SOD را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد (Esfandiari et al. 2010). فعالیت SOD تحت تنش کلرید سدیم در ریشه و اندام هوایی جو افزایش یافت، اما این افزایش در ریشه پایدارتر بود (Kim et al. 2005). فعالیت آنزیم SOD در اندام هوایی و ریشه با افزایش شوری در گیاه *Catharanthus roseus* کاهش یافت، در حالی که در سطوح شوری پایین، فعالیت آنزیم در ریشه به‌طور مشخصی افزایش نشان داد (Jaleel 2009). این محقق عنوان نمود که کاهش فعالیت SOD می‌تواند پیامد تعدیل ساخت و تجمع آنزیم‌های کم فعال و یا تغییر و تبدیل بیشتر SOD باشد. Bowler et al. (1994) گزارش کردند که *FeSOD* در کلروپلاست‌ها حضور و فعالیت دارد و اغلب فراوان‌ترین SOD حاضر در برگ‌های سبز است. از آن جایی که سلول‌های ریشه فاقد کلروپلاست هستند، می‌توان استنباط کرد که این ژن یا در ریشه بیان نمی‌شود یا مقدار بیان آن بسیار ناچیز است.

نتایج مطالعه حاضر هم‌چنین نشان داد که در ساعات اولیه پس از اعمال تنش (۲۴ ساعت) بیان ژن *FeSOD* در برگ به مقدار جزیی کاهش یافت اما پس از آن با گذر زمان تا یک هفته یک روند افزایشی در بیان این ژن مشاهده شد. سپس مجدداً در تیمار یک ماه بیان آن به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. در ریشه نیز در نمونه‌برداری ۲۴ ساعت ژن *FeSOD* یک کاهش بیان جزیی داشت اما در زمان‌های ۴۸ ساعت، یک هفته و یک ماه بیان این ژن به مقدار جزیی افزایش یافت. آنزیم‌های آنتی اکسیدان را می‌توان به دو گروه طبقه‌بندی کرد، گروهی که در یک فاز سریع از تنش اکسیداتیو واکنش می‌دهند مانند کاتالازها و گلوتاتیون پراکسیداز، و گروه دیگر که کمی دیرتر پاسخ می‌دهند، کمی قبل از اینکه آسیب قابل مشاهده شروع به پیشرفت نماید مثل

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]

آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتازها (Willekens et al. 1994). بر اساس آنچه گفته شد سوپراکسید دیسموتازها جز ژن‌هایی هستند که در پاسخ به تنش طولانی مدت فعال می‌شوند، بنابراین افزایش بیان این ژن در تیمارهای ۴۸ ساعت و یک هفته در مطالعه حاضر قابل توجیه است. از طرفی نتایج نشان می‌دهد که با افزایش میزان شوری، مقدار ROSهای تولید شده در سلول افزایش و سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه فعال می‌شود و با افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان اولین سد دفاعی در مقابل حمله رادیکال‌های اکسیژن، در مقابل خسارات ناشی از تنش شوری مقاومت می‌نماید و تا زمانی‌که گیاه قادر به مهار حجم سوپراکسید تولید شده در گیاه باشد، این فرآیند ادامه دارد (MirMohammadi-Meibodi and Ghareyazi 2002). شاید بتوان گفت که علت کاهش بیان ژن *FeSOD* پس از یک ماه قرارگیری در معرض تنش این باشد که حجم SOD تولید شده دیگر توان مهار عوامل اکسیداتیو را ندارد و تعادل بین ROS تولید شده و پاسخ آنتی‌اکسیدانی گیاه بر هم می‌خورد. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در ریشه‌ها و اندام هوایی جو در پاسخ به تنش شوری توسط Kim et al. (2005) مورد بررسی قرار گرفت. آنها گزارش کردند که در ریشه، فعالیت SOD یک روز پس از تیمار شوری ۳۷ درصد افزایش یافت، اما این مقدار به تدریج پنج روز پس از تیمار شوری کاهش یافت. نتایج آنها با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر مغایرت دارد. شاید علت این تفاوت به ایزوفرم‌های مختلف SOD مربوط باشد. در گیاهان سه شکل اصلی از این آنزیم‌ها وجود دارد که بر اساس یون فلزی به کار رفته در ساختارشان به *MnSOD*، *Cu/ZnSOD* و *FeSOD* طبقه‌بندی می‌شوند. مکان فعالیت این ایزوفرم‌ها نیز با هم متفاوت است، *MnSOD* در میتوکندری، *Cu/ZnSOD* در سیتوسل و کلروپلاست و *FeSOD* در کلروپلاست حضور دارند (Bowler et al. 1994). بیان جزیی *FeSOD* در ریشه را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که این ایزوفرم در کلروپلاست‌ها فعال است و سلول‌های ریشه فاقد کلروپلاست هستند.

همان‌طورکه در قسمت نتایج توضیح داده شد، بیان ژن فریتین در برگ در سطوح اولیه تنش (۲۵ و ۵۰ میلی مولار) به‌تدریج افزایش یافت، اما در سطوح بعدی کاهش در بیان این ژن مشاهده شد. در ریشه نیز بیان این ژن در تمام سطوح تنش کاهش یافت. Ghajar (2013) با مطالعه اثر تنش شوری بر اندام هوایی گیاه نعناع فلفلی اعلام کرد که ژن فریتین در شرایط طبیعی در گیاه شاهد بیان نشد اما با اعمال تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بیان شده و با افزایش سطح شوری به ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، بیان آن متوقف شد که این با نتایج به دست آمده از این تحقیق مطابقت دارد. Paramonova et al. (2004) تغییرات فراساختاری در سلول کامل و اندامک‌ها، به‌ویژه کلروپلاست‌های *Mesembryanthemum crystallinum* را در طول تنش شوری مطالعه کردند. مشاهده شد که تجمع فریتین در کلروپلاست‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و حداکثر تجمع فریتین در مکان‌های افزایش تجمع H_2O_2 یافت شد. Li et al. (2008) نیز تغییرات در آنزیم‌های آنتی اکسیدان و تجمع فریتین در برگ‌های گیاهچه‌های جو (*Hordeum vulgare*) در معرض تنش شوری را بررسی کردند. مشاهده شد که تیمار شوری تولید فریتین را افزایش می‌دهد. Wardrop et al. (1999) cDNAهای چهار زیر واحد مختلف فریتین را در لوبیای چشم بلبلی (*cp1*، *cp2*، *cp3* و *cp5*) گزارش کردند، که در برگ و ریشه با سطوح مختلفی از بیان حضور دارند. در حقیقت، زیر واحدهای فریتین ممکن است بر طبق گونه، متابولیسم، مرحله رشدی یا هموستازی کلی آهن به صورت افتراقی بیان شوند. اگرچه در بسیاری از مطالعات افزایش بیان ژن فریتین در پاسخ به تنش‌های مختلف گزارش شده‌است، نتایج مطالعه حاضر کاهش بیان این ژن را در همه سطوح تنش شوری در ریشه نشان می‌دهد. در گیاهان، فریتین توسط هسته کد شده و به پلاستیدها منتقل می‌شود (Harrison and Arosio 1996). هم‌چنین فریتین از طریق شرکت در محافظت از کلروپلاست‌ها نقش مهمی در پاسخ به تنش اکسیداتیو در گیاهان بازی می‌کند (Lobreaux et al. 1995). علت کاهش بیان این ژن در ریشه را می‌توان این‌گونه استنباط کرد که ریشه‌ها فاقد کلروپلاست و پلاستید هستند و نمی‌توانند جایگاه مناسبی برای حضور و فعالیت فریتین باشند.

نتایج مطالعه حاضر هم‌چنین نشان داد که الگوی بیان ژن فریتین در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در برگ و ریشه گیاه نعناع فلفلی کاملاً با هم متفاوت است، به‌گونه‌ای که بیان این ژن در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]

برگ در ساعات اولیه پس از اعمال تنش (۴۸ ساعت) و در ریشه با اعمال تنش طولانی‌مدت (یک ماه) افزایش یافت. مشابه با نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر، در یک مطالعه نقش فریتین در پاسخ به تنش اکسیداتیو به واسطه‌ی نمک در مانگرو (*Avicennia marina*) بررسی شد، افزایش سطوح رونوشت فریتین-۱ در برگ با ۱۲ ساعت تیمار تنش شوری و سپس کاهشی با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض تنش شوری مشاهده شد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که تجمع رونوشت فریتین-۱ یک پاسخ مستقیم و کوتاه مدت به تنش شوری بود (Jithesh et al. 2006). گیاهان *Pyrus pyrifolia* سطوح بالای بیان همه چهار ژن فریتین (*PpFer1*، *PpFer2*، *PpFer3* و *PpFer4*) را پس از تیمار شوری (۲۰۰ میلی مولار NaCl)، با نشان دادن دو پیک در شش ساعت و ۲۴ ساعت پس از شروع تیمار بروز دادند، به استثنای *PpFer2* که هیچ باندی برای پیک دوم نشان نداد (Xi et al. 2010). در بررسی اثر تنش شوری بر گیاه برنج نشان داده شد که رونوشت‌های فریتین پس از تنش شوری کوتاه و بلند مدت تقریباً ۳/۵ و ۵/۲ برابر بالاتر از شاهد بود (Parker et al. 2006). نتایج آن‌ها با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر مطابقت دارد. در گیاهان فریتین توسط هسته کد شده و به پلاستیدها منتقل می‌شود (Harrison and Arosio 1996). از طرفی، شواهد حضور فریتین در میتوکندری گیاه اخیراً در آرابیدوپسیس و نخود فرنگی گزارش شده‌است (Zancani et al. 2004). احتمالاً افزایش بیان فریتین پس از یک ماه اعمال تنش شوری می‌تواند به فعال شدن ایزوفرم میتوکندریایی فریتین در ریشه پس از اعمال تنش بلند مدت مربوط باشد. علت دیگری که می‌توان برای افزایش بیان ژن فریتین پس از یک ماه اعمال تنش شوری بیان نمود این است که این ژن در شرایط تنش در برگ‌ها بیان شده و سپس به ریشه‌ها منتقل شده‌است.

منابع

Agarwal S, Pandey V (2004) Antioxidant enzyme resposes to NaCl stress in Cassia angustifolia. Biologia Plantarum 48: 555-560.

Ahmad P, Jaleel C, Azooz M, Gowher N (2009) Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. Botany Research International 2: 11-20.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 53: 1331-1341.

Bowler C, Camp WV, Montago MV, Inze D (1994) Superoxide dismutase in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 13: 199-218.

Bray EA, Bailey-Serres J, and Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, Buchannan B, Jones R (Eds.). Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. 1158-1249.

Desingh R, Kanagaraj G (2007) Influence of salinity stress on photosynthesis and antioxidative systems in two cotton varieties. General and Applied Plant Physiology 33:221-234.

Esfandiari E, Abbasi A, Enayati W, Mosavi SB (2010) Different behavior of root and leaf in Grass Pea landraces in response to oxidative stress caused by salinity. Journal of Agricultural and Sustainable Production 20: 65-75. (In Farsi).

Ghajar H (2013) Identification, isolation and characterization of differentially expressed genes in response to salinity in *Mentha piperita* L. by cDNA-AFLP technique. Dissertation, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. (In Farsi).

Harrison PM, Arosio P (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochem. Biochimica et Biophysica Acta 1275: 161-203.

Hegeduse A, Erde S, Janda T, Szalai J, Dubits D, Horrath G (2002) Effects of low temperature stress on ferritin or aldose reductase overexpressing transgenic tobacco plants. Biochimica et Biophysica Acta Szeged. 46: 97-98.

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif.: College of Agriculture, University of California, 1-32.

Jaleel CA (2009) Soil salinity regimes alters antioxidant enzyme activities in two varieties of *Catharanthus roseus*. Botany Research International 2:64-68.

Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida AK (2006) Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. Plant Cell Reports 25: 865-876.

Kim SY, Lim JH, Park MR, Kim YJ, Park TI, Seo YW, Choi KG, Yun SJ (2005) Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 38:218-224.

Leonardis AMD, Marone D, Mazzucotelli E, Neffar F, Rizza F, Fonzo ND, Cattivelli L, Mastrangelo AM (2007) Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. Plant Science 172: 1005-1016.

Li QY, Niu HB, Yin J, Wang MB, Shao HB, Deng DZ, Chen XX, Ren JP, Li YC (2008) Protective role of

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]

exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgar*). Colloids and Surfaces B: Bioinnterfaces 65: 220-225.
Lobreaoux S, Thoiron S, Briat JI (1995) Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. Plant Journal 8: 443-449.
MirMohammadi-Meibodi AM, Ghareyazi B (2002) Physiologic and improvement aspects of plant saline stress. Isfahan Industrial University Press, Isfahan, Iran. (In Farsi).
Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M (2004) Salinity upregulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. Journal of experimental Botany 55:1105-1113.
Omidbeigi R (2009) Production and processing of medicinal plants. Astane Ghodse Razavi Publications. Vol 2, 5th edn. Mashhad, Iran. (In Farsi).
Panda SK, Khan MH (2004) Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. Braz. Journal of Plant Physiology 16: 115-118.
Paramonova NV, Shevyakova NI, Kuznetsov VV (2004) Ultrastructure of chloroplasts and their storage inclusions in the primary leaves of *Mesembryanthemum crystallinum* affected by putrescine and NaCl. Russian Journal of Plant Physiology 51: 86-96.
Parker R, Flowers TJ, Moore AL, Harpham NVJ (2006) An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. Journal of Experimental Botany 57: 1109-1118.
Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 30: 1-10.
Sickmann A, Rienders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schöfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. PNAS 23: 13207-13212.
Soleimani Z, Safipour Afshar A, Bahrami AR (2012) Gene expression of superoxide dismutase in the *Cuminum cyminum* L. under salt stress. In: 12th Iranian Genetics Congress. Iran, Tehran, Shahid Beheshti University 1-5. (In Farsi).
Wardrop AJ, Wicks RE, Entsch B (1999) Occurrence and expression of members of the ferritin gene family in cowpeas. Biochemistry Journal 337: 523-530.
Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D, Langebartels C, Sandermann H (1994) Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. Plant Physiology 106: 1007-1014.
Xi L, Xu K, Qiao Y, Qu S, Zhang Z, Dai W (2010) Differential expression of ferritin genes in response to abiotic stresses and hormones in pear (*Pyrus pyrifolia*). Molecular Biology Reports 1-9.
Zancani M, Peresson C, Biroccio A, Federici G, Urbani A, Murgia I, Soave C, Micali F, Vianello A, Macri F (2004) Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. European Journal of Biochemistry 271: 3657-3664

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.12.4]