ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱
صفحه ۸۷-۷۹

ارزیابی میزان بیان ژن کاتالاز وصفات مورفولوژیکی تحت تنش شوری در دو رقم مقاوم و حساس گندم نان

گزل کاظمی[۱]، سعید نواب‌پور[۲]، سیده ساناز رمضانپور*[۳]

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیاران گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

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

(تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۱۷- تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۵)

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر تنش شوری روی میزان بیان ژن کاتالاز و صفات مورفولوژیکی در گندم، آزمایشی به صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار در سال ۸۸-۱۳۸۷ در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا گردید. فاکتور اصلی شامل سه مرحله رشد (پنجه‌زنی، ساقه‌دهی و خوشه‌دهی) و فاکتور فرعی ترکیب فاکتوریل چهار سطح شوری (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مولار) و دو رقم گندم کویر (مقاوم) و فلات (حساس) بود. نمونه‌گیری در سه مرحله رشدی صورت گرفت. نتایج بیان ژن نشان داد که در مرحله پنجه‌زنی، در همه سطوح تیمار شوری، در رقم کویر بیان ژن کاتالاز در مقایسه با شاهد (شوری صفر) افزایش داشت درحالی‌که در رقم فلات کاهش بیان ژن نسبت به شاهد مشاهده شد. در مراحل ساقه‌دهی و خوشه‌دهی، در هر دو رقم برای همه سطوح شوری، کاهش نسبی در بیان ژن مشاهده شد. در این تحقیق در سطوح مختلف شوری برای صفات سطح برگ، وزن خشک برگ، وزن خشک ساقه، وزن خشک اندام هوایی، کلروفیل a و b اختلاف معنی‌داری وجود داشت. اثر متقابل رقم × شوری برای صفات وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک برگ و کلروفیل a و b معنی‌دار بود. نتایج این مطالعه مبین ارتباط قوی بین میزان بیان ژن کاتالاز و صفاتی چون وزن خشک، میزان کلروفیل و TBARM (شاخص سطح اکسیداسیون) بود. بر این اساس بررسی صفات مذکور به عنوان یک شاخص کارآ و کم‌هزینه در ارزیابی مقاومت به تنش شوری توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن،
تنش شوری،
کاتالاز،
کلروفیل،
گندم.

مقدمه

محصولات زراعی تحت تأثیر انواع تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده قرار می‌گیرند (Amjad et al. 2008). از میان تنش‌های غیرزنده، شوری یکی از بزرگ‌ترین محدودکننده‌های تولیدات کشاورزی می‌باشد (Sangam et al. 2005). واکنش گیاهان به شوری، مختلف و پیچیده می‌باشد و تعیین یک معیار برای انتخاب ژنوتیپ برتر برای مقاومت به شوری بسیار مشکل می‌باشد (Ashraf and Haris 2004). سطح برگ و وزن خشک اندام‌های گیاه در مراحل مختلف فنولوژی از مواردی است که شوری روی آن‌ها تأثیر می‌گذارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.10.5]

در برخی گونه‌ها، شوری سطح برگ را کاهش می‌دهد اما باعث افزایش وزن مخصوص برگ[1] (SLW) می‌شود (Flowers et al. 1997). نتایج مطالعات نشان داد که وزن خشک گیاهچه گندم، در ارقام مقاوم به شوری کاهش معنی‌داری نداشت در حالی که در ارقام حساس به شوری کاهش چشمگیری یافت (Amjad et al. 2008). محققان کاهش رشد ساقه در اوایل اعمال تنش در گیاه را به علت سیگنال‌های هورمونی تولیدی ریشه مرتبط می‌دانند (Munns and Termaat 1986). به‌طورکلی شوری فرآیند متابولیکی و فعالیت آنزیم‌ها را تغییر می‌دهد. یکی از تغییرات بیوشیمیایی که با قرارگرفتن گیاه در محیط شور رخ می‌دهد، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن[2] (ROS) می‌باشد (Wang et al. 2003). رادیکال‌های آزاد اکسیژن در غلظت‌های بالا موجب تخریب مولکول‌های حیاتی سلول مانند DNA، پروتئین و غشای لیپیدی می‌شوند (Casano et al. 1994) ولی در غلظت‌های پایین‌تر نقش بسیار مهمی در تنظیم فرآیندهای مهم سلولی و به ویژه کنترل بیان ژن‌ها ایفا می‌نمایند. در زمان تنش برای حفظ رطوبت موجود در گیاه روزنه‌ها بسته می‌شوند این موضوع ضمن کاهش تبادل گازی در برگ‌ها منجر به ایجاد H_2O_2 و سایر رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) در بافت‌ها می‌گردد (Luna et al. 2004). برای خنثی نمودن اثرات سمی و مخرب ROS، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی که در سلول‌های گیاه وجود دارد، بالا می‌رود و میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن بوسیله سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی تنظیم می‌شود (Gechev et al. 2002). کاتالاز با تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن، باعث از بین رفتن H_2O_2 اضافی در ارگانیسم‌های موجودات هوازی می‌شود (Yang and Poovaiah 2002). توانایی گیاه برای تنظیم بیان ژن‌ها و عمل پروتئین‌ها بر اساس مقاومت آنها می‌باشد (Zhong et al. 2009). امروزه پذیرفته شده که میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن، بازتابی از شدت تنش در سطح سلولی است. بنابراین از میزان مالون دی آلدئید که ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء است، به عنوان شاخصی برای تعیین میزان خسارت اکسیداتیو استفاده می‌شود (Jain et al. 2001). افزایش مقدار مالون دی آلدئید در ارقام حساس به شوری احتمالاً بدلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه کاهش دفاع آنتی اکسیدانی می‌باشد (Nakano et al. 2002). با توجه به موارد یاد شده این مطالعه برای دستیابی به اهداف زیر تنظیم شده است:

۱- بررسی الگوی بیان ژن کاتالاز تحت تأثیر سطوح شوری

۲- ارزیابی تغییرات شاخص TBARM (شاخص اکسیداسیون سلولی)، صفات اگرونومیک و میزان کلروفیل، در شرایط شوری

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار در سال ۸۸-۱۳۸۷ در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا گردید. فاکتور اصلی شامل سه مرحله رشد (پنجه‌زنی، ساقه‌دهی و خوشه‌دهی) و فاکتور فرعی ترکیب فاکتوریل چهار سطح شوری (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار) و دو رقم گندم کویر (مقاوم) و فلات (حساس) بود. کشت در محیط پرلیت : کوکوپیت به نسبت ۲ به ۱ انجام گرفت و مواد غذایی مورد نیاز گیاه توسط محلول هوگلند تأمین گردید. تیمار شوری نیز از همان مراحل اولیه و پس از سبز شدن گیاهان به همراه محلول غذایی در گلدان‌ها اعمال گردید. پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشدی مورد نظر (پنجه‌زنی، ساقه‌دهی و خوشه‌دهی)، برای اندازه‌گیری صفات وزن خشک برگ، وزن خشک ساقه، سطح برگ و وزن مخصوص برگ (SLW)، از هر واحد آزمایشی پنج بوته برداشت گردید. داده‌های صفات مورد اندازه‌گیری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در مراحل مختلف نمو، ۵ گرم برگ تیمارهای مختلف برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن کاتالاز برداشت شد و در نیتروژن مایع منجمد و تا مرحله استخراج RNA به فریزر ۸۰- منتقل گردید. استخراج RNA توسط کیت Rnx-plus از نمونه‌های برگ یخ زده، صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 28S و 18S در روی ژل نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده بود. برای بررسی کمی میزان استخراج، از اسپکتروفتومتر استفاده شد. مقدار جذب

[1] Special Leaf Weight
[2] Reactive Oxygen Species

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.10.5]

نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد و درصد خلوص آن محاسبه گردید. نسبت بدست آمده برای طول موج ۲۶۰/۲۸۰ در این آزمایش در محدوده ۱/۸ تا ۲ (میکروگرم در میکرولیتر) بود که نشان‌دهنده خلوص قابل قبول RNA بود. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن کاتالاز از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) استفاده شد که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد. این دستگاه در هر چرخه از فعالیت قادر است که مقدار محصول واکنش پلیمراز را نشان دهد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *GAPDH* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها می‌باشد استفاده شد. در این دستگاه از آغازگر اختصاصی طراحی شده بر اساس انتهای '۳ آنزیم کاتالاز استفاده شد. ارزیابی میزان بیان ژن توسط نرم‌افزار REST و با استفاده از Randomization test انجام شد و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید. رنگ مورد استفاده جهت ردیابی تکثیر نمونه، سایبر گرین[1] (کیت سایبر بیوپارس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) بود که با اتصال به محصول PCR سبب بررسی میزان فلورسنت می‌شود. برای سنجش میزان فرآیند سطح اکسیداتیو سلول، میزان مالون دی آلدئید (ماده نهایی که در فرآیند اکسیداسیون سلولی دارای ثبات نسبی بالایی است) مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. بدین منظور از روش تغییر یافته هگگ و همکاران (Hagege et al. 1990) استفاده شد. برای استخراج کلروفیل ۰/۵ گرم از بافت تر برگ با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ٦٦٣ و ٦٤٥ نانومتر جذب محلول اندازه‌گیری شد و میزان کلروفیل a و b محاسبه شد.

[1] SYBER Green

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که سطوح شوری برای صفات سطح برگ، وزن خشک برگ، ساقه و اندام هوایی و کلروفیل a و b اختلاف معنی‌داری داشت. همچنین ارقام نیز از نظر آماری برای صفات سطح برگ، کلروفیل a و b و وزن ویژه برگ اختلاف معنی‌داری نشان دادند. اثر متقابل مرحله رشد × شوری برای کلیه صفات به جز وزن ویژه برگ معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل شوری × رقم برای صفات وزن خشک برگ و وزن خشک اندام هوایی و کلروفیل a و b معنی‌دار بود. معنی‌دار بودن اثرات متقابل دوجانبه نشان از عکس‌العمل متفاوت روند تغییرات صفت مورد نظر در سطوح فاکتورهای مورد ارزیابی دارد.

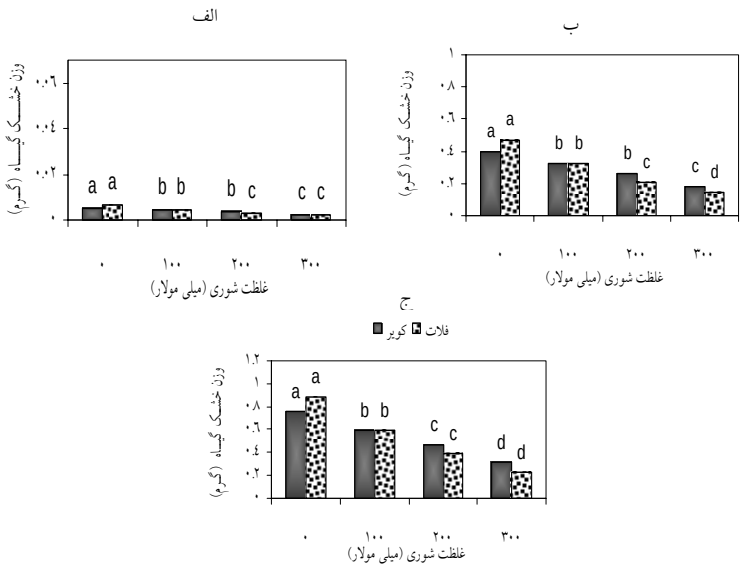
جدول۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه به‌صورت طرح کرت‌های خردشده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی

		میانگین مربعات						
منابع تغییر	درجه آزادی	سطح برگ یک‌بوته (سانتی‌متر مربع)	وزن خشک برگ (گرم)	وزن‌خشک ساقه (گرم)	وزن خشک اندام هوایی(گرم)	کلروفیل a (mg/gFW)	کلروفیل b (mg/gFW)	وزن ویژه برگ (10^{-5}) گرم
بلوک	۳	۲/۱۵ ns	۰/۰۰۶۶ ns	۰/۰۰۲۷ ns	۰/۰۱۷ ns	۰/۱۶ ns	۰/۰۳۶ ns	۰/۷۷ ns
مرحله رشد	۲	۷۴۴۵/۲۵**	۰/۵۱**	۰/۶۴**	۲/۲۴**	۴۷/۷۳ **	۱۵۳/۳۵**	۶/۵**
خطای ۱	۶	۱۰/۱۰	۰/۰۰۱۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۴۷	۰/۵۴	۰/۲۱
شوری	۳	۱۶۸/۴۴ **	۰/۰۴۸**	۰/۱۳۳**	۰/۳۴**	۲۱۳/۷۹**	۲۳۸/۴۶**	۰/۶۴ ns
رقم	۱	۲۵۵/۱۶**	۰/۰۰۰۲ ns	۰/۰۰۲ ns	۰/۰۰۰۹۲ ns	۱/۵۷**	۲/۴۱**	۲**
مرحله × شوری	۶	۲۶۲/۴۲**	۰/۰۱۲۷**	۰/۰۵۰**	۰/۱۱**	۱۰۶/۱۷**	۱۴۱/۸۸**	۰/۲۴ ns
مرحله × رقم	۲	۳۹/۸ ns	۰/۰۰۰۵۳ ns	۰/۰۰۰۷۵ ns	۰/۰۰۰۴۲ ns	۱۷/۹**	۷۵/۴۴**	۰/۴۶ ns
شوری × رقم	۳	۴۱/۶۷ ns	۰/۰۰۴۹**	۰/۰۰۳۲ ns	۰/۰۱۴**	۴۹/۷۶**	۴۳/۲**	۰/۳۱ ns
مرحله × شوری × رقم	۶	۶/۵۸ ns	۰/۰۰۱۲ ns	۰/۰۰۱۲ ns	۰/۰۰۴۴ ns	۱۰۰/۳۷**	۷۷/۲۹**	۰/۰۹۱ ns
خطای ۲	۶۳	۱۹/۹۵	۰/۰۰۱۱	۰/۰۰۲۳	۰/۰۰۳۵	۰/۱۵	۰/۱۰۱	۰/۲۷

ns ، * و ** بترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح آماری ۵ و یک درصد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.10.5]

سطح برگ در هر دو رقم، با افزایش غلظت نمک کاهش یافت. شوری رشد گیاه را کاهش داده و سطح برگ را کم می‌کند(Gharayazi et al. 2002). میزان این کاهش در رقم کویر (رقم مقاوم) کمتر از رقم فلات بود. نتایج مشابه‌ای در تحقیقات گذشته وجود دارد (Trivedi et al. 1991). در شرایط مواجهه با تنش شوری، شکستگی پروتئین‌ها شتاب می‌گیرد و به‌جای رشد، گیاه وزن خود را ازدست می‌دهد (Ghareyazi et al. 1381). همچنین تنش شوری با تأثیر یون‌های جذب شده روی آنزیم‌ها و هورمون‌های فعال داخل بذر (سمیت یون) نیز باعث کاهش در وزن خشک گیاه می‌شود (Rahman et al. 2008). اصولاً پایداری در کاهش وزن خشک گیاه در بسیاری از مطالعات به عنوان شاخص اصلی تحمل به شوری معرفی گردیده و تحمل به شوری بر اساس آن تعیین می‌گردد (Schatchman et al. 1992). روند کاهش در وزن خشک برگ، در هر دو رقم کاهشی بود اما رقم فلات در سطوح بالای شوری کاهش شدیدتری نشان داد (شکل ۱). نتایج این تحقیق نشان داد که اختلاف وزن خشک گیاه دو رقم در مرحله‌ی خوشه‌دهی، به حداقل میزان رسیده است که نشان می‌دهد اختلاف بین دو رقم حساس و مقاوم در سطوح شوری کم و در مراحل ابتدایی رشد نمایان‌تر است و در مراحل انتهایی رشد، تفاوت بین ارقام مقاوم و حساس کمتر شده و تمایز ارقام از روی وزن خشک گیاه برای مقاومت به شوری مشکل می‌باشد. کاهش هورمون‌های رشد و افزایش مواد بازدارنده رشد می‌تواند دلیل این کاهش رشد محسوب گردد (Kafi et al. 2005). افزایش سطوح شوری وزن ویژه برگ را افزایش می‌دهد. شوری موجب کاهش سطح برگ و به دنبال آن افزایش وزن مخصوص برگ می‌شود (Sohan et al. 1999). در مرحله پنجه‌زنی، تغییرات کلروفیل برای رقم فلات در ابتدا تا شوری ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش نشان داد و با افزایش شوری از آن مقدار، تقریباً ثابت بود. برای رقم کویر تا شوری ۳۰۰ میلی‌مولار، افزایش در میزان کلروفیل مشاهده گردید. برخی محققان گزارش کردند افزایش تنش شوری میزان کلروفیل برگ را در سویا افزایش می‌دهد (Wang et al. 2003). برخی دیگر نتیجه گرفتند که تنش شوری میزان کلروفیل را کاهش می‌دهد (Ameer et al. 2006).

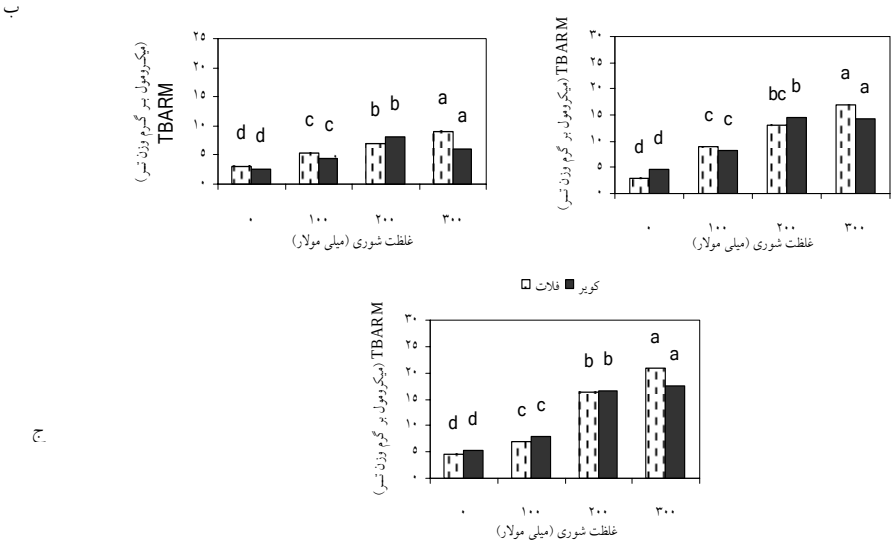


شکل ۱- تغییرات وزن خشک در دو رقم کویر و فلات الف) مرحله پنجه‌زنی ب) مرحله ساقه‌دهی ج) مرحله خوشه‌دهی. مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن برای هر رقم به صورت جداگانه می‌باشد و میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر رقم از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P= ۰/۰۵).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.10.5]

با افزایش غلظت نمک، ثبات کلروفیل در گیاه کاهش می‌یابد اما در گیاهان متحمل، ثبات بیشتری در میزان کلروفیل وجود دارد (Modhan et al. 2000). در این تحقیق نیز رقم مقاوم کویر نسبت به رقم حساس، ثبات بیشتری در میزان کلروفیل در مرحله پنجه‌زنی نشان داد. شاخص پایداری بالا به معنی عدم تأثیر یا تأثیر کم تنش بر گیاه می‌باشد که در نهایت موجب استفاده‌ی بهینه گیاه از کلروفیل می‌شود (Modhan et al. 2000). افزایش سطوح شوری وزن ویژه برگ را افزایش می‌دهد. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که سطح ویژه برگ به عنوان شاخصی از ضخامت برگ، تحت تأثیر تیمار شوری قرار می‌گیرد. این مسئله نشان می‌دهد که با افزایش شوری سطح برگ کاهش می‌یابد، اما بر ضخامت آن افزوده می‌شود. افزایش ضخامت برگ باعث افزایش کلروفیل در واحد سطح می‌شود. همچنین با افزایش تنش نسبت کلروفیل a/b افزایش می‌یابد. قابل ذکر است که برخی محققان افزایش نسبت کلروفیل a/b را موجب تیره شدن برگ‌ها و افزایش عدد کلروفیل‌متر می‌دانند. به همین علت میزان کلروفیل در رقم مقاوم از میزان آن در رقم حساس بیشتر بود. در مرحله ساقه‌دهی در رقم فلات افزایش مداوم در کلروفیل دیده شد (شکل ۲). لذا به نظر می‌رسد رقم فلات به‌دلیل حساسیت بیشتر به تنش شوری و در نتیجه استفاده از مکانیزم‌های اجتناب از تنش، با کاهش بیشتر سطح برگ از میزان کلروفیل بیشتری در واحد سطح برگ برخوردار شده و در نتیجه کلروفیل برگ بالاتری را از خود نشان می‌دهد. در واقع گیاه با کمتر کردن سطح برگ در شرایط تنش سطح تعرق‌کننده را جهت جلوگیری از اتلاف آب کم کرده و در نتیجه با وجود کاهش میزان کل کلروفیل در برگ، میزان کلروفیل در واحد سطح برگ افزایش می‌یابد. بر اساس نتایج این مطالعه در مرحله خوشه‌دهی، تا شوری ۱۰۰ میلی‌مولار در هر دو رقم در میزان کلروفیل افزایش مشاهده گردید و پس از آن در هر دو رقم کاهش کلروفیل را شاهد بودیم (شکل ۲). تحقیقات نشان داد میزان کاهش کلروفیل برگ در دوران پیری برگ در تیمار شوری سریع‌تر از تیمار شاهد بود (Salehi et al. 2003). میزان این کاهش در ارقام حساس سریع‌تر رخ داد. در مرحله خوشه‌دهی و در شوری‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی‌مولار کاهش در میزان کلروفیل مشاهده گردید که تغییرات کلروفیل برگ ممکن است به علت کاهش بیوسنتز یا افزایش تخریب کلروفیل در شرایط شوری بالا و مراحل پایانی رشد گیاه باشد که این موضوع می‌تواند به علت تأثیر مداوم شوری تا این مرحله و عدم پاسخگویی بیان ژن به شوری در این مرحله به علت تخریب آنزیم در شرایط شور می‌باشد (Shim et al. 2003). در این مرحله میزان کلروفیل کمتر از مرحله ساقه‌دهی بود. همچنین در سطوح بالای شوری کاهش بیشتری نسبت به سطوح کمتر شوری مشاهده شد که این نتایج می‌تواند به علت زردشدن برگ‌ها در این مرحله و به‌خصوص در شوری بالا باشد. تغییرات روند سطح اکسیداسیون و میزان رادیکال‌های اکسیداتیو از جمله وقایع مهم و مشترک تنش‌های محیطی محسوب می‌گردد (Wang et al. 2003). با توجه به سرعت تبدیل رادیکال‌های مزبور و پیچیدگی فعل و انفعالات بیوشیمیایی در این زمینه اندازه‌گیری میزان تغییرات اکسیداتیو بسیار مشکل و پرهزینه می‌باشد. در عین حال سنجشTBARM که در آن مالون دی‌آلدئید اندازه‌گیری می‌شود، به عنوان شاخصی از میزان اکسیداتیو در سطح سلولی و مولکولی قابل ارزیابی می‌باشد. مالون دی‌آلدئید به‌عنوان محصولی از پراکسیداسیون لیپید و شاخصی از تولید رادیکال‌های آزاد و تخریب بافتی می‌باشد. در مرحله‌ی پنجه‌زنی، میزان TBARM در رقم فلات (حساس به شوری) نسبت به رقم مقاوم کویر بیشتر بود، اگرچه تفاوت معنی‌داری بین دو رقم دیده نشد که نشان‌دهنده تخریب حاصله از رادیکال‌های آزاد می‌باشد (شکل ۳). این نتایج با یافته‌های مطالعات روی برنج، مطابقت دارد (Demiral Turkan 2005). به نظر می‌رسد رقم مقاوم از طریق فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش پراکسیداسیون چربی‌های غشاء و نهایتاً میزان TBARM طی شرایط تنش شده است. همچنین در تمامی مراحل با افزایش تنش شوری، میزان مالون دی‌آلدئید افزایش یافته است و در مراحل انتهایی که گیاه مقاوم نیز به تنش واکنش نمی‌دهد اختلاف چندانی بین دو رقم وجود نداشت و تخریب رادیکال‌های آزاد در هر دو رقم قابل مشاهده بود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.10.5]



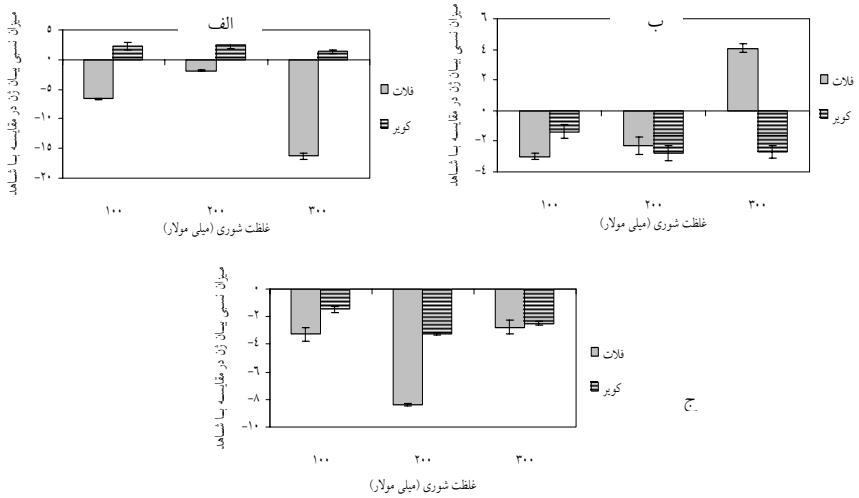
شکل ۳- تغییرات TBARM در دو رقم کویر و فلات الف) مرحله پنجه‌زنی ب) مرحله ساقه‌دهی ج) مرحله خوشه‌دهی. مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن برای هر رقم به صورت جداگانه می‌باشد و میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر رقم از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P= ۰/۰۵).

این مسئله به روشنی در افزایش بیان ژن کاتالاز در رقم مقاوم قابل ردیابی است (شکل ٤). این نتایج مؤید نقش تنظیمی و ارسال پیام‌های ثانویه برای رادیکال‌های آزاد نظیر H_2O_2 می‌باشد. این موضوع توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Luna et al. 2004).

نتایج حاصل از ارزیابی الگوی تظاهر ژن کاتالاز

جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن کاتالاز از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) استفاده شد که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد. در مرحله پنجه‌زنی، در همه سطوح شوری اعمال شده، در رقم کویر بیان ژن کاتالاز در مقایسه با شاهد (شوری صفر) افزایش داشت درحالی‌که در رقم فلات کاهش بیان ژن نسبت به شاهد مشاهده شد. در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار افزایش بیان ژن کاتالاز در رقم کویر به بالاترین حد رسید و با افزایش شوری از این مقدار، افزایش کمتری در میزان بیان آن مشاهده شد که با نتایج محققان مطابقت داشت (Esfandiari et al. 2007) (شکل ٤). به نظر می‌رسد این موضوع به دلیل تخریب آنزیم کاتالاز در شرایط خیلی شور می‌باشد و منجر به بروز تنش اکسیداتیو در گندم می‌گردد (Shim et al. 2003). بیان ژن‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت (کاتالاز) برای دفاع در برابر آسیب‌های اکسیداتیو صورت می‌گیرد. در مرحله ساقه‌دهی برای رقم کویر، کاهش بیان ژن کاتالاز نسبت به شاهد در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در بیشترین مقدار خود بود در حالی‌که در رقم فلات، بیشترین کاهش بیان ژن در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده گردید. در سطح ۳۰۰ میلی‌مولار در این مرحله در رقم فلات افزایش در بیان ژن کاتالاز مشاهده شد. با وجود اینکه همبستگی بالایی بین بیان ژن کاتالاز و تنش شوری وجود دارد، ولی ممکن است در مواردی افزایش کاتالاز در برگ‌ها تنها به‌دلیل افزایش ترجمه در تنش نباشد و ترجمه mRNA آنزیم کاتالاز وابسته به مقدار گروه‌های دهنده متیل باشد که از گلایسین و سرین (محصولات چرخه تنفس نوری) حاصل می‌شود (Luna et al. 2004). اگرچه افزایش یا کاهش تعداد رونوشت‌های یک ژن دلیل بر نقش کلیدی آن در واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نمی‌باشد، اما جستجو برای این‌گونه ژن‌ها تنها راهی است که می‌توان در جهت شناسایی و جداسازی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش‌ها بکار برد (Lievens et al. 2001).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.10.5]



شکل ٤- بیان ژن کاتالاز در دو رقم کویر و فلات الف) مرحله پنجه‌زنی ب) مرحله ساقه‌دهی ج) مرحله خوشه‌دهی

در مرحله خوشه‌دهی، در هر دو رقم با افزایش تنش شوری کاهش در بیان ژن کاتالاز نسبت به شاهد مشاهده گردید. نتایج گزارش شده درباره نحوه فعالیت آنزیم کاتالاز در دوران پیری متفاوت می‌باشد. در بررسی‌هایی که روی گیاه تنباکو در مرحله رشد رویشی انجام شد، فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش سن برگ کاهش پیدا کرد (Oh et al. 2005). محققان دیگری نیز در بررسی نحوه بیان ژن کاتالاز در زمان پیری گیاه کلزا گزارش کردند که میزان بیان ژن کاتالاز و فعالیت آن در زمان پیری افزایش پیدا می‌کند (Haddad et al. 2004). بنابراین به نظر می‌رسد که نحوه فعالیت آنزیم کاتالاز در دوران پیری بستگی به گونه گیاهی، نوع اندام گیاهی و شرایط آزمایش دارد. از این رو به نظر می‌رسد زمانی که گیاه در معرض تنش‌های اکسیداتیو قرار می‌گیرد، سلول‌های گیاهی با افزایش توانایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی تلاش می‌کنند تا با تنش اکسیداتیو مقابله کنند. اما زمانی که پاسخ سلول به تنش کافی نباشد، سلول و در نتیجه گیاه به سمت مرگ هدایت می‌شود. چنین نتیجه‌ای قبلاً نیز گزارش شده است (Swidzinski et al. 2004). در ارتباط با تنش شوری، اصلاح کنندگان گیاه به شناخت عواملی برای آزمون تحمل به تنش نیاز دارند. یکی از این عوامل مرحله رشدی گیاه است (Hekmat 1993). مقاومت به شوری یک ویژگی ثابت در گیاهان نیست و می‌تواند با مرحله نموی گیاه رابطه داشته باشد (Almansouri and Lutts 2001). گندم گیاهی است که مقاومت متوسطی به شوری دارد. به طور کلی میزان واکنش به شوری در ارقام گندم با افزایش سن گیاه کاهش می‌یابد. این بدان معنی است که مراحل جوانه‌زنی و اوایل رشد رویشی در تحمل به شوری تعیین کننده می‌باشد (Dewey 1962).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، در مرحله پنجه‌زنی، در رقم کویر بیان ژن کاتالاز نسبت به شاهد (شوری صفر) افزایش نشان داد. در رقم فلات، کاهش در بیان ژن نسبت به شاهد در تمام سطوح شوری مشاهده گردید. این افزایش در بیان ژن کاتالاز نسبت به شاهد در رقم مقاوم، کاهش کمتر در سطح برگ و وزن خشک این رقم نسبت به فلات را به دنبال داشت و پس از آن افزایش در وزن ویژه برگ نسبت به رقم حساس فلات مشاهده شد. افزایش وزن ویژه برگ باعث افزایش کلروفیل a و b می‌گردد. تنش شوری از طریق فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش مقدار مالون دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون چربی‌های غشاء در رقم مقاوم گردید و با افزایش فعالیت کاتالاز باعث کاهش تولید مالون دی آلدئید گردید. در مطالعه حاضر در مراحل ساقه‌دهی و خوشه‌دهی، میزان بیان ژن کاتالاز در تمامی سطوح شوری صرف‌نظر از رقم مورد مطالعه کاهش نشان داد. به نظر می‌رسد که ارقام مقاوم تنها در مراحل اولیه رشد خود نسبت به تنش شوری عکس‌العمل نشان می‌دهند. به طور کلی حساسیت به شوری در ارقام گندم با افزایش سن گیاه کاهش می‌یابد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.10.5]

منابع

Almansouri MK, Lutts S (2001) Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat. Plant Soil, 231:243-254.

Ameer khan SA, Habib-ur-Rehman A Ashraf M (2006) Interactive effect of foliarly applied ascorbic asid and salt stress on wheat at the seedling stage. Pakestan Journal Botany. 38(5): 1407-1414.

Amjad H, Shazia N, Tahira I, Hina S Ahsanul M (2008) Effects of NACL salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. Pakestan.Journal. Botany, 40(3): 1043-1051.

Ashraf M Haris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science. 166: 3-16.

Casano LM, Lascano HR Trippi VS (1994) Hydroxyl radicals and a thylakoidbond endopeptidase are involved in light and oxygen induced proteolysis in at chloroplasts. Plant cell Physiol, 35, 145 – 152.

Demiral T and Türkan I (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and praline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Department of Biology, Science Faculty, Ege University, 35100 Bornova-Izmir, Turkey Env Expt Bot 53: 247–257.

Dewey DR (1962) Breeding crested wheat grass for salt tolerance. Crop Science. 2: 403-407.

Esfandiari E, Shekari F, Shekari F and Esfandiari M (2007) The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 35(1): 48-56.

Flowers TJ, Torke PF Yeo AR (1997) The mechanism of salt tolerance in halophytes. Ann Rev. Plant Physiol. 28:89 – 121.

Gechev T, Gadjev I, VanBreusegem F, Inze D, Dukiandjiev S, Toneva V Minkov I (2002) Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. Cell Molecular Life Science. 59(4): 708-714.

Gharayazi B and Mirmohamad Meibody SAM (2002) Physiological aspect and crop breeding to drought stress. Isfahan University of Technology Press, 274p. (In Farsi).

Haddad R, Morris K, and Buchanan – Wollaston V (2004) Expression analysis of genes related to oxidative protection during senescence in Brassica napus. Ir. J. Biotechnol. 2: 269-278.

Hagege D, Nouvelot A, Boucard J and Gaspar T (1990) Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. Phytochem Anal 1: 86-89.

Hekmat Shoar H (1993) Plant physiology in hard conditions. Tabriz University Press, 320p. (In Farsi).

Jain M, Mathur G, Koul S, Sarin NB (2001) Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (Arachis hypogea L.). Plant Cell Rep. 20: 463–468.

Kafi M, Zand A, Kamkar B, Sharafi HR, Golodani M (2005) Plant Physiology. Mashad Jahad Daneshgahi Press. (In Farsi).

Lievens S, Goormachtig S, Holsters M (2001) A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. Nucleic Acids Research. 29: 3459-3468.

Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, Groten K, Bernard S, Foyer CH (2004) Drought controls on H2O2 accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gen expression in wheat. Jornal of Expermental Botany. 56, 417- 423.

Modhan MM, Narayanan SL and Ibrahim SM (2000) Chlorophyll stability indexes (CSI): its impacts on salt tolerance in rice. International Rice Research Institute. 25(2): 38-40.

Munns R and Termaat A (1986) Whole plant responses to salinity. Plant Physiology. 13: 143-160.

Nakano R, Inoue S, Kubo Y and Inaba A (2002) Water stress-induced ethylene in the calyx triggers autocatalytic ethylene production and fruit softening in 'Tonewase' persimmon grown in a heated plastic-house. Journal of Biology and Technology 25: 293-300.

Oh M, Rapolu M, Mieda T, Miyagawa Y, Yabuta Y, Yoshimura K and Shigeoka S (2005) Decline in leaf photooxiadtive-stress tolerance with age in tobacco. Plant Science 168: 1487-1493.

Rahman M, Soomro UA, Zahoor-ur-Haq M and Gul SH (2008) Effect of NaCl salinity on wheat cultivars. Agriculture Sciences 4(3): 398-403.

Salehi M, Nassiri Mahalati M, Koocheki A (2003) Leaf nitrogen and chlorophyll as indicators drought stress in wheat. Iranian Journal of Field Crops Research 1(2), 199-205. (In Farsi).

Sangam S, Jayasree D and Janardhan K (2005) Salt tolerance in plants-transgenic approaches. Plant Biotechnology 7: 1-15.

Schatchman DP, Lagudah ES and Munns R (1992) The expression of salt tolerance from triticum tauschii in hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetic 84: 714-719.

Shim IS, Momose Y, Yamamoto A, Kim DW and Usui K (2003) Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to Salicylic acid accumulation in plants. Plant Growth Regulation 8: 285-292.

Sohan D, Jasoni R and Zajicek J (1999) Plant-water relation of NaCl and calcium treated.

Swidzinski JA, Leaver CJ and Sweetlove LJ (2004) A proteomic analysis of plant programmed cell death. Photochemistry 65: 1829-1838.

Trivedi S, Galiba G, Sankhla N and Erdei L (1991) Responses to osmotic and sodium chloride stress of wheat varieties differing in drought and salt tolerance in callus cultures. Plant Science 73(2):227-232.

Wang WX, Vinocur B, Altman A (2003) A plant responses to drought, salinity and extreme temperatures:

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.10.5]

calcium/calmodulin. Proceedings of National academy of Science of US (PNAS) 99: 4097-4102.
Zhong L, Xu Y, Wang J (2009) DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum.* African Journal of Biotechnology 8(22): 6201-6207.
towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1–14.
Yang T, Poovaiah BW (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.10.5]