



دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

دوره هفتم / شماره سوم / پاییز ۱۳۹۶ (۳۶۷-۳۵۷)

ارزیابی مولکولی و بیوشیمیایی دو رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L.) تحت تأثیر تنش اکسیداتیو

سعید نواب پور^{۱*} و ابوالفضل مازندرانی^۲

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۲۳

چکیده

تنش ناشی از عناصر فلزی یکی از مشکلات جدی بازاریان تولید محصول در سراسر جهان است. تنش فلزی باعث تغییرات فنوتیپی، آنزیمی و بیان ژن در گیاهان می‌شود. اساساً، اثرات مضر تنش فلزی با تولید مقدار زیادی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ایجاد می‌شود. اگرچه مقادیر بالای گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مضر است، اما در غلظت‌های پایین و متعادل به‌عنوان یک عامل سیگنالی و انتقال عمل می‌کنند. در این بررسی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل نیترات نقره ($AgNO_3$) به‌عنوان عامل تنش اکسیداتیو در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی‌مولار) و دیکو (DABCO) به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت در سه سطح (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) بودند که روی دو رقم گندم (فلات و تجن) اعمال شدند. صفات مورد ارزیابی شامل کلروفیل a، کلروفیل b، شاخص سطح اکسیداسیونی سلول (TBARM) و بیان ژن‌های متالوتیونین و گلوکناز بود. نتایج نشان داد که تیمار نیترات نقره در سطوح بالا و بدون دیکو کلروفیل a و b را کاهش داد و از طرفی موجب افزایش TBARM شد. بر اساس نتایج این آزمایش، تحت شرایط تنش ابتدا بیان ژن‌های متالوتیونین و گلوکناز افزایش یافت و سپس با افزایش سطح نیترات نقره بیان آن‌ها کاهش یافت. بالاترین و پایین‌ترین سطح بیان ژن‌های متالوتیونین و گلوکناز در هر دو رقم تجن و فلات به‌ترتیب در تیمارهای ۱ میلی‌مولار و ۲ میلی‌مولار نیترات نقره رخ داد. شناسایی نقش ژن‌های مزبور در واکنش به تنش اکسیداتیو، علاوه بر تحلیل سازوکار تأثیر سمیت فلزات سنگین، امکان استفاده از این ژن‌ها را در برنامه‌های اصلاحی اعم از کلاسیک و مولکولی فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: تنش فلزی، کلروفیل، گلوکناز، متالوتیونین

۱- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان،

ایران

* نویسنده مسئول: s.navabpour@yahoo.com

مقدمه

تنش‌های محیطی از عوامل اصلی کاهش دهنده رشد و نمو و عملکرد گیاهان زراعی به شمار آمده و همواره امنیت غذایی در جهان را تهدید می‌کنند. گندم به‌عنوان مهم‌ترین گیاه زراعی با بیشترین سطح زیر کشت و گستردگی مناطق کشت کار، همواره با توجه به کشت وسیع در اکثر مناطق جهان در معرض اغلب تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) که اغلب تحت تأثیر تنش‌های محیطی سطح آن‌ها در سلول افزایش می‌یابد، از طریق انتقال علامت، کنترل بیان ژن‌ها و سنتز پروتئین‌ها نقش مهمی در ثبات وضعیت متابولیکی سلول دارند. ژنوتیپ‌های گندم پاسخ‌های مختلفی به تنش نشان می‌دهند. بنابراین مکانیزم‌های فیزیولوژیکی گوناگونی در تنظیم سطوح مقاومت به تنش نقش دارند که این موضوع حاکی از تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه در گیاه گندم است (Shao *et al.*, 2007). تنش‌های محیطی با افزایش تولید انواع اکسیژن فعال به مولکول‌های حیاتی سلول مانند چربی‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها آسیب وارد کرده و در نهایت متابولیسم سلول را مختل می‌نمایند (Aple and Hirt, 2004). غلظت زیاد فلزات سنگین در اکثر گیاهان ایجاد سمیت می‌کنند. از جمله علایم قابل مشاهده سمیت در گیاهان در معرض فلزات سنگین کلروزه و نکروزه شدن برگ‌ها می‌باشد که معمولاً به توقف رشد ریشه و اندام هوایی می‌انجامد (Pendey and Sharma, 2002). فلزات سنگین می‌توانند با رقابت با سایر عناصر مورد نیاز گیاه در جذب آن‌ها و تغذیه معدنی گیاه اختلال ایجاد نمایند (Orcutt and Nielsen, 2000). از طرف دیگر فلزات جذب شده با اتصال به بخش‌های حساس مولکول‌های زیستی و با مهار آن‌ها متابولیسم طبیعی سلول را مختل می‌نمایند (Pendey and Sharma 2002). فلزات سنگین از جمله نقره با اسیدهای نوکلئیک تشکیل پیوند داده و بدین ترتیب سبب تجمع و تراکم کروماتین و تثبیت ماریچ مضاعف DNA و به دنبال آن جلوگیری از فرایند رونویسی و ترجمه می‌گردند (Beyer *et al.*, 1991). در نتیجه مقدار بیش از حد نیاز یک عنصر ضروری یا غیر ضروری می‌تواند اثر مخربی روی رشد و نمو گیاه داشته باشد. بنابراین، گیاهان باید عناصر ضروری را تا حد پایین‌تر از آستانه سمیت جذب و از جذب عناصر غیر ضروری اجتناب ورزند (Orcutt and Nielsen, 2000). با توجه به شواهد موجود فلزات سنگین به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم قادر به تولید

اشکال مختلف اکسیژن فعال (ROS) می‌باشند (Dipiero *et al.*, 2005). اگر سلول گیاهی نتواند با افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی خود، با افزایش میزان ROS مقابله نماید عدم تعادل بین تولید و متابولیسم ROS، اکسیداسیون کنترل نشده و واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌ها منجر به بروز تنش اکسیداتیو خواهد شد (Mahalingam and Fedoroff, 2003).

ژن متالوتیونین و محصول پروتئین آن به‌طور وسیعی در موجودات یوکاریوتی و پروکاریوتی توزیع شده است (Robinson *et al.*, 1993). در جانوران و قارچ‌ها، متالوتیونین نقش مهمی در سم زدایی فلزات سنگین بازی می‌کنند. در گیاهان، بین سطح رونوشت متالوتیونین و تحمل به فلزات در گونه‌های متفاوت آرابیدوپسیس همبستگی مشاهده گردید (Murphy and Taiz, 1995). از طرفی تأثیر فلزات در بیان متالوتیونین‌ها در گونه‌ها و بافت‌های مختلف، متفاوت است مثلاً در سویا (Kawashima *et al.*, 1991) سطوح رونوشت متالوتیونین به‌وسیله عملکرد مس کاهش پیدا می‌کنند، در حالی که در لوبیا (Foley *et al.*, 1997)، جوانه گندم (Lane *et al.*, 1987) بیان متالوتیونین از فلزات تأثیر نمی‌پذیرد.

گلگوناز در گیاهان، مخمرها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، حشرات و ماهی‌ها یافت شده است (Pan *et al.*, 1989). گلگوناز هیدرولاز القایی موسوم به β -1-3-گلگوناز، در واکنش‌های دفاعی علیه قارچ‌ها دخالت دارد که با تجزیه دیواره سلولی قارچ‌ها، مولکول‌های کربوهیدرات فعال در برابر محرک را آزاد می‌نمایند که موجب سنتز فیتوآلکسین‌های سمی علیه قارچ در گیاه میزبان می‌شوند و به‌طور مستقیم از رشد پاتوژن جلوگیری می‌کنند (Kim and Hwang, 1997). این آنزیم در سلول‌های گیاهی سالم نیز به‌طور طبیعی وجود دارد و در برخی از گیاهان هم‌زمان با تولید اتیلن در واکنش به حمله قارچ‌ها اتفاق تولید می‌شود. تنظیم ژن‌های رمزکننده این آنزیم‌ها در زمان رشد و نمو طبیعی و در واکنش به انواع تنش‌ها، از جمله زخم برداشتن، حمله پاتوژن و یا تیمار با کیتوزان یا اتیلن اتفاق می‌افتد.

به‌طور کلی با توجه به مطالب ذکر شده، این آزمایش با اهداف زیر انجام شد:

- ۱- بررسی بیان ژن‌های گلگوناز و متالوتیونین در ایجاد مقاومت به تنش اکسیداتیو، ۲- بررسی همبستگی میزان کلروفیل و اکسیداسیون سلولی با تغییرات میزان بیان ژن‌های گلگوناز و متالوتیونین، ۳- ارزیابی شمای کلی تأثیر

اندازه‌گیری شاخص سطح اکسیداسیونی سلول (TBARM)

در این سنجش، که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است، مقدار مالون‌دی‌آلدئید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ (چربی‌ها) است، تعیین می‌شود. در این خصوص، از روش هگگ و همکاران (Hagege et al., 1990) با تغییراتی استفاده گردید. مقدار ۰/۵ گرم برگ را هموژنیزه نمود و یک میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (۱۵ w/v٪) به آن اضافه شد. محلول حاضر با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به شدت مخلوط (ورتکس) و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفیوژ شد. رسوب حاصل با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو، ورتکس و مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفیوژ شد و آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. پس از آن مقدار ۳ میلی‌لیتر اسید هیپوفسفریک (یک درصد) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباربیوریک (۰/۶ درصد وزن به حجم) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف گردید. مقدار جذب محلول حاصل در طول موج‌های ۵۳۲ و ۵۹۰ به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Uvikon 930 Watford UK) اندازه‌گیری شد.

استخراج RNA

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

متقابل رادیکال‌های آزاد و بیان ژن‌های مورد مطالعه، ۴- معرفی ژن‌های مورد مطالعه جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی جهت القای مقاومت در برابر سمیت فلزات سنگین.

مواد و روش‌ها

بذر ارقام فلات و تجن گندم نان (*Triticum L. aestivum*) با اتانول ۱۰ درصد ضدعفونی و در گلدان‌هایی با گنجایش هفت کیلوگرم خاک در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل نیترات نقره ($AgNO_3$) به‌عنوان عامل ایجاد تنش اکسیداتیو در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی‌مولار) و دیکو (DABCO) به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت در سه سطح (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) بود. تنش اکسیداتیو در مرحله ظهور سنبله با محلول پاشی نیترات نقره در غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌مولار اعمال شد. همچنین به‌منظور بررسی نحوه افزایش میزان مقاومت به تنش اکسیداتیو تعداد دیگری از گلدان‌ها یک ساعت قبل از کاربرد نیترات نقره به‌طور جداگانه با غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار دیکو به‌عنوان عامل پاک‌کننده اختصاصی یون اکسیژن منفرد محلول پاشی شد. ضمناً به‌منظور اطمینان از عدم تاثیر سوء دیکو تکرارهای مستقلی نیز به محلول پاشی محلول دیکو با غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار اختصاص یافت.

اندازه‌گیری کلروفیل

برای اندازه‌گیری کلروفیل از روش پورا و همکاران (Porra et al., 1989) استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ (۸۰- درجه سلسیوس) کاملاً خرد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ مخلوط شد. پس از سانتیفیوژ با دور ۵۰۰۰ (g) به مدت ۱۵ دقیقه، میزان جذب مایع رویی در طول موج‌های ۶۴۶/۶ و ۶۶۳/۶ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت شد. سپس میزان کلروفیل a (Chla) و کلروفیل b (Chlb) به ترتیب بر اساس روابط (۱) و (۲) محاسبه شدند:

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

$$Chlb (mg.g^{-1}) = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6} \quad (2)$$

۵ دقیقه قرار داده شدند و ۱ میکرولیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (Revert Aid M.Mulv) شرکت فرمنتاز اضافه شد و مخلوط واکنش در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت قرار گرفت و جهت توقف واکنش، برای ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و در نهایت به میزان ۳۸۰ میکرولیتر به آن آب مقطر اتوکلاو شده اضافه شد. از این رشته cDNA، در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (Real-Time PCR) استفاده شد. این روش با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I (ساخت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران) و در دستگاه iQ5 (شرکت بیورد، آمریکا) انجام شد. برای نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار GAPDH که بیان یکسانی در تمام تیمارها دارد، استفاده شد. مشخصات آغازگرهای مورد بررسی که با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی شد در جدول ۱ آمده است. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Rest مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ و دوباره فاز بالایی حذف و پلیت RNA در دمای اتاق خشک و در نهایت ۵۰ میکرولیتر آب مقطر، به پلیت ایجاد شده اضافه شد. کمی و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز روی ژل اگارز ۱/۵ درصد تعیین شد.

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

میزان ۵ میکرولیتر از هر نمونه RNA بعد از تیمار DNaseI داخل تیوب ریخته شد و به هر تیوب ۱ میکرولیتر آغازگر oligodT اضافه گردید. سپس ۵ میکرولیتر آب DEPC افزوده شد تا به حجم ۱۱ برسد و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. ۴ میکرولیتر بافر ۵x ساخت cDNA، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP با غلظت ۱۰ میکرومولار و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Ribolock Rnase inhibitor اضافه و با آب DEPC به حجم ۱۹ میکرولیتر رسید. سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش

Table 1. Characteristics of primers used in this experiment

آغازگر Primer	GC (%)	توالی آغازگر Primer sequence	اندازه محصول PCR product	دمای ذوب (°C) TM (°C)
Metallothion For	60	5'-ACTGCAAGTGCAACCCCTGC-3'	155 bp	60
Metallothion Rev	65	5'-GCATAGGCGGAGAGCGAGCA-3'		58
13glu- For	60.09	5'-GAGCTTCGGGCTCTTCAAC-3'	161 bp	56
13glu- Rev	60.99	5'-CGTACGTGCCCGTTACTACTT-3'		55
GAPDH For	-	5'-TCACCACCGACTACATGACC-3'	121 bp	60
GAPDH Rev	-	5'-ACAGCAACCTCCTTCTCACC-3'		60

کلروفیل b بیشتری دارد، بنابراین کاهش کلروفیل b در شرایط تنش بیشتر است (Rout and Das, 2003). اعمال پیش‌تیمار دبوکو قبل از محلول‌پاشی نیترات نقره موجب افزایش میزان کلروفیل a و b شد (شکل‌های ۱ و ۲-b)، میزان این افزایش به‌ویژه در غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات نقره به‌طور نسبی بیشتر و اختلاف آن با غلظت ۲ میلی‌مولار نیترات نقره معنی‌دار بود. این موضوع در شرایطی بود که در تیمار نیترات نقره با غلظت یک میلی‌مولار، پیش‌تیمار دبوکو ۱۰ میزان کلروفیل a و b را بیشتر افزایش داد و در تیمار نیترات نقره با غلظت ۲ میلی‌مولار، پیش‌تیمار دبوکو ۲۰ موجب افزایش میزان کلروفیل a و b شد که مقدار افزایش آن برای کلروفیل a در رقم فلات معنی‌دار بود.

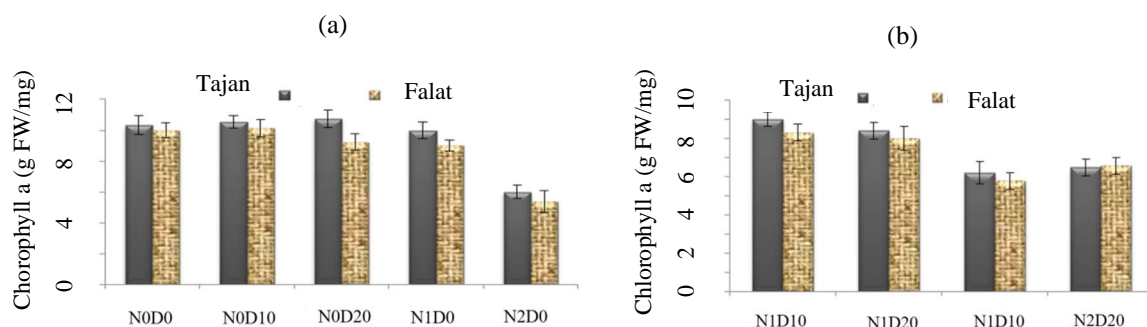
آنالیز داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

کلروفیل a و b

میزان کلروفیل a و b در پاسخ به تیمار نیترات نقره کاهش یافت (شکل‌های ۱ و ۲-a). نتایج نشان داد که در سطوح مختلف تیماری، کاهش کلروفیل b در مقایسه با کلروفیل a بیشتر بود. در مورد بخش نوری، فتوسیستم II نسبت به فتوسیستم I آسیب پذیرتر می‌باشد و چون میزان



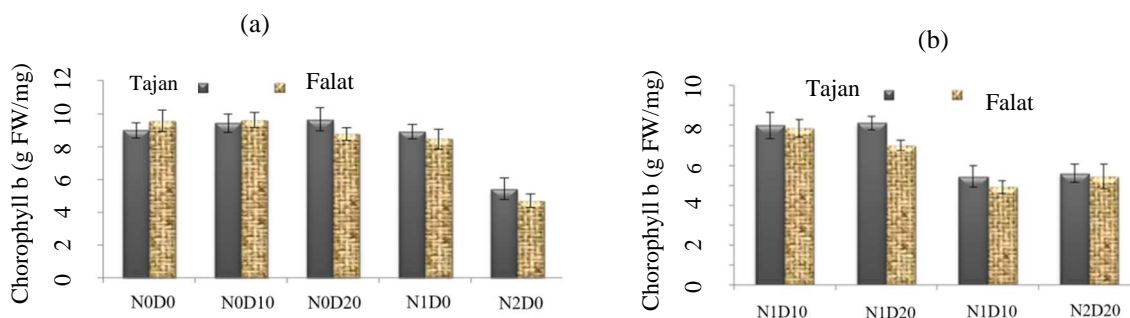
شکل ۱- تغییرات میزان کلروفیل a ناشی از اعمال جداگانه تیمارهای AgNO_3 (a) و DABCO (b). N0، N1 و N2 به ترتیب نیترات نقره در سطح ۰، ۱ و ۲ میلی مولار و D0، D10 و D20 به ترتیب دبکو در سطح ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی مولار.

Figure 1. Changes in chlorophyll-a under separate treatment of AgNO_3 (a) and DABCO (b). N0, N1 and N2 are AgNO_3 in 0, 1, 2 mmol and D0, D10 and D20 are DABCO in 0, 10, 20 mmol, respectively.

فضایی مناسب کمپلکس کلروفیل - پروتئین ایجاد نمی شود. تغییرات کلروفیل برگ ممکن است به علت کاهش بیوسنتز (تهیه مواد شیمیایی به وسیله موجودات زنده) یا افزایش تخریب کلروفیل در شرایط تنش باشد (Amjad *et al.*, 2008).

دبکو با کاهش سمیت نقره موجب افزایش میزان کلروفیل و حفظ سبزیگی و رشد گیاه خواهد شد. در واقع این آنتی اکسیدان به عنوان پاک کننده گونه های فعال اکسیژن عمل می کند بنابراین، افزایش میزان کلروفیل در اثر کاربرد دبکو مربوط به کاهش گونه های فعال اکسیژن به خصوص اکسیژن منفرد در اندام های گیاه تحت تنش فلزات سنگین می باشد (Saeidi-Sar *et al.*, 2006).

موستاکاس و همکاران (Moustakas *et al.*, 1997) دریافته اند که کاهش چشمگیر میزان کلروفیل در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین نمایانگر وسعت آسیب های اکسیداتیو می باشد. غلظت های بالای فلزات سنگین به دلیل تخریب و به هم ریختگی ساختار کارتنوئیدها، مقدار آنها را در گیاه کاهش می دهد. کاهش کارتنوئیدها تحت تأثیر فلزات سنگین از علل دیگر افت کلروفیل ناشی از تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط عناصر سنگین محسوب می گردد، زیرا، کارتنوئیدها نقش حفاظت کلروفیل را بر عهده دارند (Ghorbanli *et al.*, 2005). روت و داس (Rout and Das, 2003) بیان نمودند که جایگزینی فلزات سنگین از جمله نیترات نقره به جای منیزیم اجازه باند شدن کلروفیل را به لیگاندهای مهم نمی دهد و در نتیجه ساختار



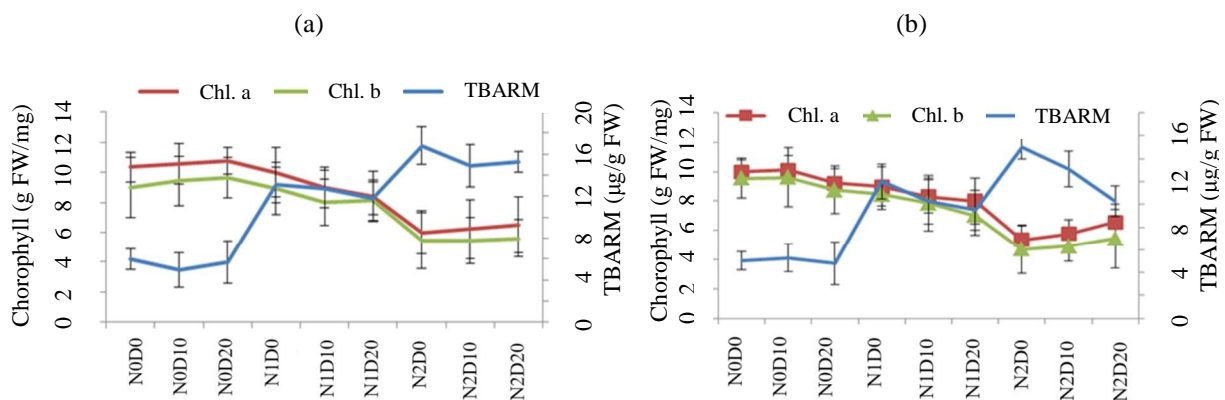
شکل ۲- تغییرات میزان کلروفیل b ناشی از اعمال جداگانه تیمارهای AgNO_3 (a) و DABCO (b). N0، N1 و N2 به ترتیب نیترات نقره در سطح ۰، ۱ و ۲ میلی مولار و D0، D10 و D20 به ترتیب دبکو در سطح ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی مولار.

Figure 2. Changes in chlorophyll b under separate treatments of AgNO_3 (a) and DABCO (b). N0, N1 and N2 are AgNO_3 in 0, 1, 2 mmol and D0, D10 and D20 are DABCO in 0, 10, 20 mmol, respectively.

بین میزان کلروفیل a و b با میزان TBARM (به ترتیب $r = -0.63$ و $r = -0.74$) در سطوح مختلف تیمارها موید این مسئله می‌باشد (جدول ۲). اکسیداسیون سلولی باعث تخریب رنگدانه‌ها از جمله کلروفیل می‌شود. از آنجایی که تنش‌ها از جمله تنش‌های زیستی و غیر زیستی، بر افزایش میزان اکسیداسیون سلولی تأثیر گذار است در نتیجه باعث تخریب کلروفیل و کاهش فتوسنتز می‌شود (Navabpour *et al.*, 2003). بیشترین افزایش TBARM در حداکثر مقدار تیمار اسپری نیترات نقره ۲ میلی‌مولار بدون پیش تیمار دبوکو مشاهده شد (شکل ۴). تأثیر تیمار نیترات نقره بر افزایش مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن به ویژه از طریق واکنش یون‌های فلزی و افزایش تنش اکسیداسیونی گزارش شده است (Clijsters *et al.*, 1999).

شاخص سطح اکسیداسیونی سلول (TBARM)

به طور کلی میزان TBARM به عنوان شاخص میزان نهایی اکسیداسیون سلول با افزایش سطوح تیمار نیترات نقره افزایش و در مقابل میزان کلروفیل نسبت به افزایش سطوح تیمار نیترات نقره کاهش یافت (شکل ۳- a و b). با اعمال پیش تیمار دبوکو مقدار اکسیداسیون سلولی تحت تأثیر اعمال تیمار نیترات نقره نسبت به شرایط عدم استفاده از پیش تیمار دبوکو کاهش یافت. بیشترین مقدار کاهش مقدار اکسیداسیون سلولی در رقم تجن در شرایط کاربرد نیترات نقره با غلظت ۲ میلی‌مولار با پیش تیمار دبوکو ۲۰ بود که اختلاف آن با رقم فلات در همین تیمار و سایر تیمارها معنی دار شد. وجود همبستگی منفی و معنی‌دار



شکل ۳- میزان TBARM (میکرومول بر گرم وزن تر) و کلروفیل برای تیمارهای AgNO₃ (a) و DABCO (b) در رقم فلات. N0, N1 و N2 به ترتیب نیترات نقره در سطح ۰، ۱ و ۲ میلی‌مولار و D0, D10 و D20 به ترتیب دبوکو در سطح ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار. Figure 3. TBARM (μmol/g FW) and chlorophyll for AgNO₃ (a) and DABCO (b) treatments in Falat cultivar. N0, N1 and N2 are AgNO₃ in 0, 1, 2 mmol and D0, D10 and D20 are DABCO in 0, 10, 20 mmol, respectively.

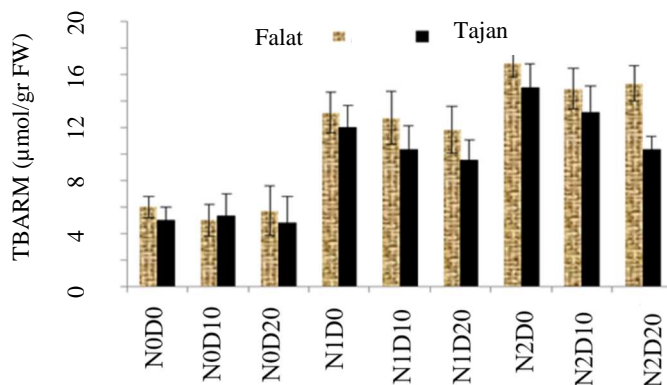
شدت عمل غلظت بالاتر AgNO₃ در بروز تنش اکسیداتیو و در پی آن بروز مرگ سلولی دور از ذهن نیست. متالوتیونین از ژن‌های بیان شونده طی تنش‌های گوناگون از جمله تنش فلزات است. نواحی تنظیمی متالوتیونین دارای عناصر مسئول واکنش به فلزات هستند که باعث افزایش تجمع متالوتیونین به علت تماس گیاه با فلزات سنگین می‌شود (Cobbet and Goldsbrough, 2002). براساس نتایج برخی آزمایشات ژن متالوتیونین از ژن‌هایی است که تحت تأثیر رادیکال‌های فعال اکسیژن، افزایش نسبی بیان نشان می‌دهد (Mackerness *et al.*,

ارزیابی الگوی تظاهر ژن متالوتیونین

بر اساس نتایج بیشترین میزان تولید رونوشت‌های ژن متالوتیونین در ارقام مورد مطالعه در سطح ۱ میلی‌مولار نیترات نقره بود که اختلاف آن با سایر تیمارها معنی دار شد (شکل ۵). مقایسه تیمارهای نیترات نقره در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار نشان داد، در غلظت پائین‌تر، ژن متالوتیونین بیان نسبی بیشتری داشت و همچنین میزان بیان این ژن در رقم تجن بسیار بیشتر از رقم فلات بود که می‌تواند بیانگر حساسیت بالاتر رقم فلات نسبت به تنش‌های محیطی باشد (شکل ۵). این موضوع با توجه به

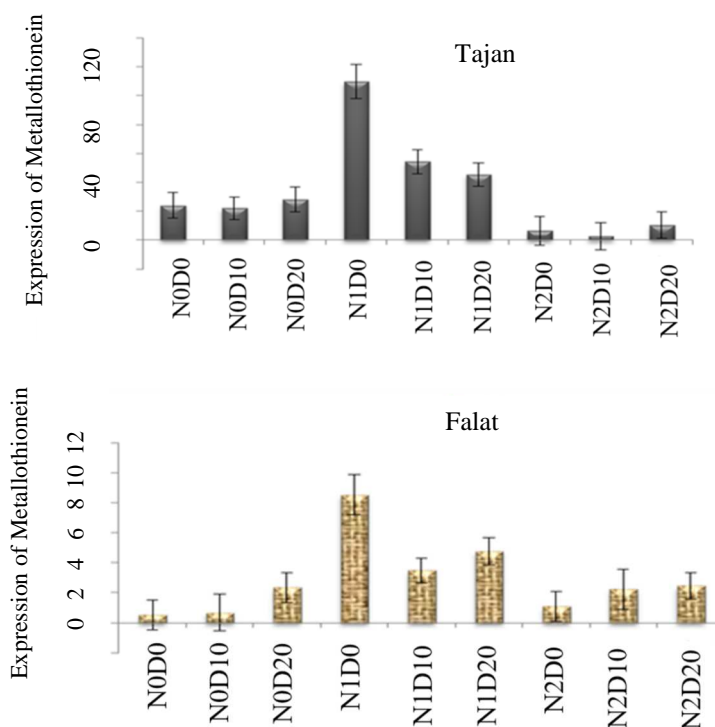
آنتی‌اکسیدان دیکو می‌تواند با انواع مختلف اکسیژن‌های فعال ترکیب شده و از بسیاری از آسیب‌های ناشی از افزایش ROS بکاهد (Sparrow *et al.*, 2002).

و نقش مهمی در دفاع در مقابل تنش اکسیداتیو دارد. اگر مقدار ROS تولید شده بیش از حد آستانه باشد مکانیزهای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول آغاز خواهد شد (Navabpour *et al.*, 2007).



شکل ۴- میزان TBARM (میکرومول بر گرم وزن تر) برای تیمارهای DABCO و $AgNO_3$ ، N0، N1 و N2 به ترتیب نیترات نقره در سطح ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار، D0، D10 و D20 به ترتیب دیکو در سطح ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار.

Figure 4. TBARM ($\mu\text{mol/gr FW}$) for $AgNO_3$ and DABCO treatments. N0, N1 and N2 are $AgNO_3$ in 0, 1, 2 mmol and D0, D10 and D20 are DABCO in 0, 10, 20 mmol, respectively.



شکل ۵- تغییرات میزان بیان ژن متالوتیونین ناشی از اعمال تیمار $AgNO_3$ و DABCO در ارقام تاجن و فلات، N0، N1 و N2 به ترتیب نیترات نقره در سطح ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار، D0، D10 و D20 به ترتیب دیکو در سطح ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار.

Figure 5. Metallothionein gene expression changes under $AgNO_3$ and DABCO treatments in Tajan and Falat cultivars. N0, N1 and N2 are $AgNO_3$ in 0, 1, 2 mmol and D0, D10 and D20 are DABCO in 0, 10, 20 mmol, respectively.

ارزیابی الگوی تظاهر ژن گلوکناز

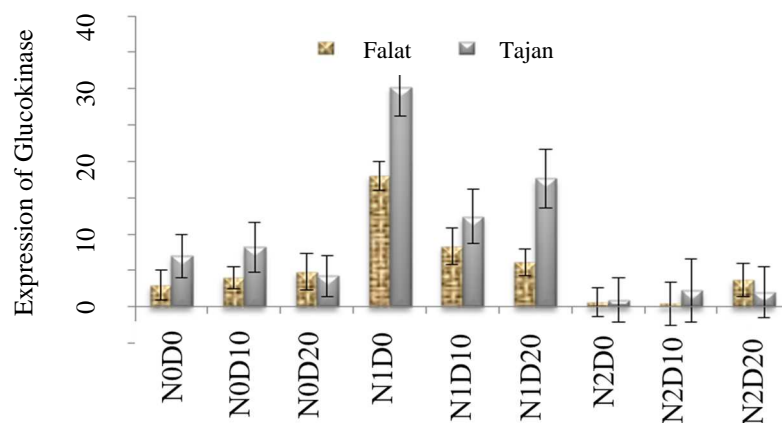
بیشترین میزان افزایش بیان ژن گلوکناز در تیمار نیترات نقره ۱ میلی مولار مشاهده شد که رقم تجن با ۳۲ رونوشت بالاترین میزان بیان این ژن را دارا بود و اختلاف آن با رقم فلات در همین تیمار معنی دار شد. در حالی که اسپری غلظت ۲ میلی مولار نیترات نقره سبب کاهش شدید بیان ژن گلوکناز شد و اختلاف آن با تیمار نیترات نقره ۱ میلی مولار و شاهد (بدون کاربرد نیترات نقره) معنی دار بود (شکل ۶). کاربرد پیش تیمار دبوکو ۲۰ در تیمار نیترات نقره ۲ میلی مولار تا حدودی میزان بیان این ژن را افزایش داد، ولی اختلاف آن با شرایط بدون کاربرد دبوکو معنی دار نبود. گلوکناز یک ژن های دفاعی و تولیدکننده سیگنال می باشد که در اثر تنش و تولید رادیکال ها بیان می شود (Cruz-Ortega *et al.*, 1997).

عامل شیمیایی دبوکو پاک کننده اختصاصی اکسیژن منفرد است (Mackerness *et al.*, 2001) به نظر می رسد که ترکیب غلظت های پایین تر نیترات نقره به همراه دبوکو شرایط بهینه ای از وضعیت متعادل سطح رادیکال های اکسیژن را در جهت حداکثر تحریک و القای ژن های دفاعی فراهم می آورد (Navabpour *et al.*, 2003 and Navabpour *et al.*, 2007). وجود همبستگی قوی و مستقیم ژن های متالوتیونین و گلوکناز $r=0.90$ (جدول ۲)

نشان دهنده این است که افزایش بیان ژن های مورد نظر همسو و در یک مسیر ژنتیکی طی تنش نیترات نقره رخ داده است.

نتیجه گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار نیترات نقره در سطوح بالا و بدون دبوکو مقادیر کلروفیل a و b را کاهش داد و از طرفی موجب افزایش TBARM شد. بر اساس نتایج این آزمایش، تحت شرایط تنش ابتدا بیان ژن های متالوتیونین و گلوکناز افزایش یافت و سپس با افزایش سطح نیترات نقره بیان آن ها کاهش یافت. بالاترین و پایین ترین سطح بیان ژن های متالوتیونین و گلوکناز در هر دو رقم تجن و فلات به ترتیب در تیمارهای ۱ میلی مولار و ۲ میلی مولار نیترات نقره رخ داد. با توجه به نتایج حاصله در روند واکنش ژن های مورد بررسی به نظر می رسد که ژن های مزبور کاندیدای مناسبی جهت استفاده در برنامه های اصلاحی باشند. بدیهی است که بیان فزاینده این ژن ها در ارقام گندم امکان افزایش مقاومت نسبی ارقام به مسمومیت تنش فلزات سنگین را فراهم می آورد. هم چنین استفاده از رقم تجن در پروژه های دورگیری برای استفاده از ظرفیت رقم مزبور در القای مقاومت به سمیت فلزات سنگین توجیه پذیر به نظر می رسد.



شکل ۶- تغییرات میزان بیان ژن گلوکناز ناشی از اعمال تیمار $AgNO_3$ و DABCO در ارقام تجن و فلات. N0، N1 و N2 به ترتیب نیترات نقره در سطح ۰، ۱ و ۲ میلی مولار و D0، D10 و D20 به ترتیب دبوکو در سطح ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی مولار.

Figure 6. Glucokinase gene expression changes under $AgNO_3$ and DABCO treatments in Tajan and Falat cultivars. N0, N1 and N2 are $AgNO_3$ in 0, 1, 2 mmol and D0, D10 and D20 are DABCO in 0, 10 and 20 mmol, respectively.

جدول ۲- ضرایب همبستگی بین ژن‌های متالوتیونین و گلوکاناز و صفات مورد ارزیابی

Table 2. Correlation coefficients between Metallothionein and Glucokinase genes and the studied traits

صفت Trait	متالوتیونین Metallothionein	گلوکاناز Glucanase	کلروفیل a Chl. a	کلروفیل b Chl. b
متالوتیونین Metallothionein				
گلوکاناز Glucanase	0.9**			
کلروفیل a Chl. a	0.60*	0.62*		
کلروفیل b Chl. b	0.41 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.98*	
TBARM	-0.51 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	-0.63*	-0.74**

* و ** : به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪.

^{ns}, * and **: Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

References

- Amjad, H., Shazia, N., Tahira, I., Hina, S. and Ahsanul, M. 2008. Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Pakistan Journal of Botany* 40 (3): 1043-1051.
- Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Beyer, W., Irmay, J. and Fridovich, I. 1991. Superoxide dismutases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 140: 221-253.
- Clijsters, H., Cuyper, A. and Vangronsveld, J. 1999. Physiological responses to heavy metals in higher plant; defence against oxidative stress. *Zeitschrift für Naturforschung* 54c: 730-734.
- Cobbet, C. S. and P. B. Goldsbrough. 2002. Phytochelation and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182.
- Cruz-Ortega, R., Cushman, J. C. and Ownby, J. D. 1997. cDNA clones encoding 1,3-b-glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. *Plant Physiology* 114: 1453-1460.
- Dipierro, N., Mondelli, D., Paciolla, E., Brunetti, G. and Dipierro, S. 2005. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin roots to aluminium stress. *Journal of Plant Physiology* 162 (5): 529-536.
- Foley, R. C., Liang, Z. M. and Singh, K. B. 1997. Analysis of type 1 metallothionein cDNA in *Vicia faba*. *Plant Molecular Biology* 33: 583-591.
- Ghorbanli, M., Meighani, F. and Asadollahy, B. 2005. Effect of copper chloride stress on chlorophyll, carbohydrate accumulation, and some growth parameters in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Pajouhesh & Sazandegi* 76: 134-141. (In Persian with English Abstract).
- Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J. and Gaspar, T. 1990. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis* 1: 86-89.
- Kawashima, I., Inokuchi, Y., Chino, M., Kimura, M. and Shimizu, N. 1991. Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soybean. *Plant Cell Physiology* 32: 913-916.
- Kim, Y. J. and Hwang, B. K. 1997. Isolation of a basic 34 kiloDalton b-1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 103-115.
- Lane, B., Kajoika, R. and Kennedy, T. 1987. The wheat-germ E_c protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochemistry and Cell Biology* 65: 1001-1005.
- Mackerness, S. A. H., John, C. F., Jordan, B. and Thomas, B. 2001. Early signaling components in ultraviolet-B responses. distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters* 489: 237-242.
- Mahalingam, R. and Fedoroff, N. 2003. Stress response cell death and signaling: The many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum* 119 (1): 56-68.

- Moustakas, M., Eleftheriou, E. P. and Ouzounidou, G. 1997.** Short- term effects of aluminum at alkaline pH on the structure and function of the photosynthetic apparatus. **Photosynthetica** 34: 169-177.
- Murphy, A. and Taiz, L. 1995.** Comparison of metallothionein gene expression and non-protein thiols in 10 *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. **Plant Physiology** 109: 1-10.
- Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., Mackerness, S. and Buchanan-Wollaston, V. 2003.** Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. **Journal of Experimental Botany** 54: 2285-2292.
- Navabpour, S., Bagherieh-Naggar, M. B. and Soltanloo, H. 2007.** Identification of novel genes expressed in *Brassica napus* during leaf senescence and in response to oxidative stress. **International Journal of Plant Production** 1: 35-44.
- Orcutt, D. M. and Nilsen, E. T. 2000.** The physiology of plants under stress, soil and biotic factors. John Wiley and Sons, New York.
- Pan, S. Q., Ye, X. S. and Kuc, J. 1989.** Direct detection of β -1, 3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. **Analytical Biochemistry** 182: 136-140.
- Pandey, N. and Sharma, C. P. 2002.** Effect of heavy metals Co^{+2} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. **Plant Science** 163: 753-758.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedmann, P. E. 1989.** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta** 975: 384-394.
- Rabinson, N. J., Tommey, A. M., Kusel, C. and Jackson, P. 1993.** Plant metallothioneins. **Biochemical Journal** 295: 1-10.
- Rout, G. R. and Das, P. 2003.** Effect of metaltoxicity on plant growth and metabolism. **Agronomy Journal** 23: 3-11.
- Saeidi-Sar, S., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., Ghorbanli, M. and Majd, A. 2006.** Ascorbic acid protects soybean plants against Ni-induced oxidative stress. **Pajouhesh & Sazandegi** 70: 80-87. (In Persian with English Abstract).
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Wu, G., Zhang, J. H. and Hu, Y.C. 2007.** Changes of some anti-oxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 45: 7-13.
- Sparrow, J. R., Zhou, J., Ben-Shabat, B., Vollmer, H., Itagaki, Y. and Nakanishi, K. 2002.** Involvement of oxidative mechanisms in blue light induced damage to A2E-Laden RPE. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 43: 1222-1227.



University of Guilan
Faculty of Agricultural
Sciences

Cereal Research
Vol. 7, No. 3, Autumn 2017 (357-367)

Molecular and biochemical evaluation of two bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) under oxidative stress

Saeed Navabpour^{1*} and Abolfazl Mazandarani²

Received: July 9, 2016

Accepted: April 12, 2017

Abstract

Metal stress is one of the serious problems that restrict crop production around the world. Metal stress causes phenotypic, enzymatic and gene expression changes in plants. Mainly, the harmful effect of metal stress is created by producing a large amount of Reactive Oxygen Species (ROS). Although, high concentrations of ROS is deterioration but they can act as a signaling factor in fairly low concentrations. In this study, a factorial experiment was performed in the form of randomized complete block design (RCBD) with three replications. Experimental factors include silver nitrate (AgNO_3) in three levels (0, 1, 2 mM) as factor for oxidative stress and DABCO as antioxidant in three levels (0, 10, 20 Mm) was applied on "Falat" and "Tajan" cultivars of wheat. The evaluated traits include chlorophyll a and b, index of cellular oxidative levels (TBARM) and gene expressions amount of metallothionein and glucanase. Our results illustrate that high levels (2 mM) of silver nitrate treatment alone, decreased the chlorophyll a, b content, as well as the TBARM increases. Also, based on the results, under stress conditions the expression of metallothionein and glucanase genes firstly increased and then with increasing of silver nitrate level reduced their expression in both cultivars. The highest and lowest expression of Metallothionein and Glucanase genes was happen in 1 mM and 2 mM silver nitrate treatments respectively. By knowing the role of the studied genes in response to oxidative burst, mechanism of heavy metal effect was analyzed. In addition, using of these genes in molecular or classic breeding program well approved.

Keywords: Chlorophyll, Glucanase, Metal stress, Metallothionein

1. Assoc. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Crop Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Ph. D. Student, Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Crop Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

* Corresponding author: s.navabpour@yahoo.com