ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴
صفحه ۶۸-۵۹

# تجزیه و تحلیل مولکولی واکنش فوق حساسیت و فرآیند پیری در برگ گندم

## Molecular analysis of hypersensitive reaction and senescence process in wheat leaves

سعید نواب‌پور*[۱]، سیده‌ساناز رمضانپور[۱]، گزل کاظمی[۱]

۱- دانشیاران، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

**Navabpour S*[1], Ramezanpour SS[1], Kazemi G[1]**

1. Associate Professors, Graduated MSc Student, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۳۰- تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

## چکیده

**این مطالعه به منظور بررسی میزان بیان برخی ژن‌های آنتی‌اکسیدان در برگ گندم در مرحله پیری و پاسخ به واکنش فوق حساسیت در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به بیماری سپتوریای برگی (*Septoria tritici.*) صورت گرفت. مطالعه ژنوتیپ‌ها شامل رقم حساس تجن و لاین مقاوم #۱۰ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. به منظور ارزیابی بیان ژن‌ها در مرحله پیری، نمونه‌برداری در ۴ مرحله آغاز زرد شدن برگ‌های پایینی ($S_1$)، مشاهده حدود ۲۰ درصد زردی برگ‌ها ($S_2$)، مشاهده حدود ۴۰ درصد زردی برگ‌ها ($S_3$)، مشاهده حدود ۶۰ درصد زردی برگ‌ها ($S_4$) و برگ سبز صورت گرفت. برای مطالعه الگوی بیان ژن‌ها در واکنش فوق حساسیت (HR) نمونه‌برداری پس از مایه‌کوبی عامل سپتوریای برگی در مرحله ظهور سنبله از برگ‌های آلوده صورت گرفت. ارزیابی بیان ژن‌های کاتالاز، متالوتاینین و گلوتامین سنتتاز با استفاده از Real-timePCR صورت گرفت. نتایج نشان داد که سطح اکسیداسیون سلولی (TBARM) در مرحله پیری S4 و واکنش HR بالاترین میزان را برای هر دو رقم داشت. میزان کلروفیل با افزایش روند پیری و طی واکنش HR کاهش قابل توجهی را از لحاظ آماری نشان داد که کمترین میزان در مرحله پیری S4 و واکنش HR مشاهده شد. میزان بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و متالوتاینین تا مرحله S4 افزایش یافت. در واکنش HR میزان بیان نسبی این دو ژن متفاوت بود طوری‌که بیان ژن کاتالاز در HR (۳/۸۶) تقریبا برابر با مرحله S2 (۳/۶۹) بود در حالی‌که بیان ژن متالوتاینین در رقم مقاوم هم سطح بیان آن در مرحله S4 (۹/۰۷) پیری بود. بیان ژن گلوتامین سنتتاز نیز تا مرحله S3 افزایش معنی‌داری نشان داد و سپس در مرحله S4 کاهش یافت. در واکنش HR نیز از میزان بیان این ژن کاسته شد به طوری که تقریبا هم ردیف S2 قرار گرفت.**

**واژه‌های کلیدی**

آنتی اکسیدان‌ها
بیان ژن
پیری
گندم
واکنش فوق حساسیت

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]

## مقدمه

امروزه گندم غذای اصلی مردم بسیاری از کشورها می‌باشد. به طور متوسط سالیانه ۱۵-۱۶ درصد زمین‌های زیر کشت جهان به این محصول اختصاص داده می‌شود، و بیش از ۲۰ درصد کالری مورد نیاز جمعیت جهان را تامین می‌کند (Shao et al. 2005). بوته‌های گندم در مراحل مختلف رشد در تمام محیط‌های طبیعی در معرض تنش‌های گوناگون قرار دارند. شرایط آب و هوایی، عناصر غذایی، آفات، عوامل بیماری‌زای گیاهی و علف‌های هرز از جمله عواملی هستند که تولید گندم را تهدید می‌کنند. در بین عوامل بیماری‌زا قارچ‌ها از اهمیت بیشتری برخوردارند. در حال حاضر سپتوریوز برگی گندم[1] *Mycosphaerella graminicola* در بسیاری از مناطق دنیا شایع می‌باشد. گیاهان در پاسخ به عوامل بیماری‌زا دارای مکانیسم دفاعی سریع که شامل مرگ سلول‌های اطراف مکان آلودگی است، می‌باشند. به این نوع سیستم دفاعی، پاسخ فوق حساسیت[2] (HR) گفته می‌شود. از نظر ژنتیکی- فیزیولوژیکی واکنش فوق حساسیت که یکی از مصادیق مرگ برنامه‌ریزی شده سلول[3] به شمار می‌رود، حائز اهمیت زیادی است. بایستی توجه کرد که اگرچه فرآیند PCD در نهایت به مرگ سلول ختم می‌شود ولی از آنچه در نکروز سلول رخ می‌دهد کاملا متفاوت است. در واقع نکروز یک پدیده غیرفعال و به طور معمول مضر تلقی می‌شود در حالی‌که PCD فرآیندی فعال، تحت کنترل ژنتیکی و بی‌گمان هدفمند و در بسیاری از موارد مفید است (Gan and Amasino 1997). بر اساس نظر برخی متخصصین بیولوژی مولکولی پیری نیز از اقسام PCD معرفی شده است. از جمله اختلافات واضح بین پیری و واکنش HR تفاوت دردامنه زمانی بروز آنهاست که در واکنش HR بسیار کوتاه‌تر است، از طرفی دامنه اهداف بیولوژیک و فیزیولوژیک در پیری به مراتب گسترده‌تر می‌باشد (Rao and Davis 2001). همچنین بیان برخی ژن‌های وابسته به پیری از جمله SAG12 (کد کننده پروتئین سیستئین پروتئاز در کلزا و آرابیدوپسیس) و ژن متالوتاینین (با نقش سم‌زدایی یون‌های فلزی) (Delorme et al. 2000) مبین نقش برجسته آن‌ها در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی سلول می‌باشد. با این همه شباهت‌های قابل توجهی بین فرآیند پیری و واکنش HR در سطح سلولی گزارش شده است. بر اساس تحقیقات پیشین نتایج متفاوتی برای تغییرات کلروفیل تحت تنش‌های مختلف بدست آمده است. گروهی از محققان نتیجه گرفتند که تنش شوری میزان کلروفیل a را کاهش می‌دهد لذا کاهش کلروفیل در شرایط تنش می‌تواند به عنوان یک عامل محدودکننده به حساب آید (Ameerkhanetal 2006). گروهی دیگر میزان کلروفیل برگ سویا را در سطوح مختلف اندازه‌گیری کردند و گزارش کردند افزایش تنش میزان کلروفیل برگ را افزایش می‌دهد، این افزایش کلروفیل با تیره شدن برگ‌ها مرتبط است (Wangetal 2001). در مورد کلروفیل نتایج متفاوتی تحت تنش به‌دست آمده است. گزارش شده با افزایش تنش، غلظت منیزیم در برگ کاهش می‌یابد. باتوجه به این که منیزیم یک عنصر ضروری برای ساختن کلروفیل است این موضوع می‌تواند کاهش کلروفیل را توجیه کند. انواع اکسیژن فعال سبب بی‌رنگ شدن یا از بین رفتن رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و سایر ترکیبات رنگیزه‌ای می‌شوند (Mauchamp and Methy 2004). در شرایط تنش، افزایش آنزیم پراکسیداز که در کاهش کلروفیل نقش دارد گزارش شده است، همچنین کاهش کلروفیل با افزایش غلظت $H_2O_2$ مشاهده شده است (Zia tabar ahmadi and Babaeian 2002). با آغاز مرحله پیری و زرد شدن برگ، میزان کلروفیل کاهش محسوسی نشان می‌دهد. اساسا کاهش کلروفیل در روند پیری یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تشخیص پیری در سلول‌های گیاهی می‌باشد (Hukmani and Tripathy 1994). از منظر ژنتیک سلولی پیری فرآیندی اکسیداتیو، ناشی از تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن است. در عین حال تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های زنده و غیرزنده نیز سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن[4] می‌شوند. تغییر روند سطح اکسیداسیون و میزان رادیکال‌های اکسیداتیو از جمله وقایع مهم و مشترک تنش‌های محیطی و فرآیند پیری محسوب می‌شود (Wang et al. 2001). افزایش غلظت این رادیکال‌ها موجب آسیب رساندن به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (Buchanan 1994; Noctor and Foyer 1998). از آنجا

[1] *Septoria tritici blotch* (STB)
[2] Hypersensitive reaction (HR)
[3] Programmed cell death (PCD)
[4] Reaction oxygen species (ROS)



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]

که مراحل رشد و نمو گیاه و در پی آن مرحله فیزیولوژیک پیری نیز تغییرات قابل‌توجهی در تغییر تعادل این رادیکال‌ها ایجاد می‌کند، اندازه‌گیری میزان خسارت حاصله در مراحل مختلف نمو به ویژه در کنار سایر صفات مورد ارزیابی اهمیت زیادی دارد. از طرفی 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 سنجش TBARM[1] که در آن مالون دی‌آلدئید (محصول نهایی و با ثبات نسبی پراکسیداسیون چربی‌ها و اکسیداسیون سلولی)، اندازه‌گیری می‌شود، به عنوان شاخصی از میزان اکسیداتیو در سطح سلولی و مولکولی قابل ارزیابی می‌باشد. همچنین در سطح مولکولی تغییر الگوی بیان برخی ژن‌ها از مهمترین وقایع سلولی در حین فرآیند پیری محسوب می‌شود. ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربیت پراکسیداز و کاتالاز در برگ‌های اسفناج و تنباکو تحت تنش کاهش پیدا می‌کند (Hodges and Forney 2000; Oh et al. 2005)، در صورتی‌که Ye et al. (2000) گزارش کردند که در برگ‌های آرابیدوپسیس بعد از گلدهی فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز تا پنج برابر افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد این اختلاف ناشی از نوع گونه گیاهی، مرحله رشد و نمو بافت گیاهی و شرایط محیطی می‌باشد (Casano et al. 1994). محققان در بررسی نقش پراکسید هیدروژن در مقاومت گندم به *Septoria tritici* در دو رقم حساس و مقاوم بیان کردند که جلوگیری از رشد بیمارگر به زمان و محل تجمع $H_2O_2$ در رقم حساس وابسته می‌باشد و پس از آلودگی گیاه فعالیت پراکسیداز کل و رونوشت ژن مربوط به آن در رقم حساس افزایش می‌یابد (Shettyetal 2003). در واقع الگوی فعالیت پراکسیداز و تجمع رونوشت‌های آن نشان‌دهنده نقش آن در ایجاد مقاومت می‌باشد. بر اساس آنچه اشاره شد این مطالعه به منظور ارزیابی الگوی بیان برخی ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی اکسیدان طی مراحل پیری برگ و واکنش فوق حساسیت در دو رقم گندم انجام گرفت. همچنین میزان کلروفیل و شاخص اکسیداسیون سلولی و ارتباط متقابل آن‌ها با تغییر الگوی بیان ژن‌های مزبور بررسی شده است.

[1] Thiobarbituric acid reactive materia

## مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه‌برداری

این تحقیق در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۰ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. ارقام گندم مورد استفاده در این مطالعه رقم تجن (حساس به بیماری سپتوریای برگی) و لاین #۱۰ (مقاوم به بیماری سپتوریای برگی) بود. کاشت در داخل گلدان‌هایی با گنجایش هفت کیلوگرم خاک صورت گرفت. در هر گلدان حدود ۳۰ بذر بعد از ضد عفونی شدن کشت شد و بعد از رسیدن گیاهان به مرحله جوانه زنی و رشد اولیه به تعداد ۱۵ بوته در هر گلدان تنک شد. به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها در مرحله پیری، نمونه‌برداری در ۴ مرحله (آغاز زرد شدن برگ‌های پایینی ($S_1$)، مشاهده حدود ۲۰ درصد زردی برگ‌ها ($S_2$)، مشاهده حدود ۴۰ درصد زردی برگ‌ها ($S_3$)، مشاهده حدود ۶۰ درصد زردی برگ‌ها ($S_4$)) و برگ سبز صورت گرفت. برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها در واکنش HR نمونه‌برداری پس از مایه‌زنی در مرحله ظهور سنبله از برگ‌های آلوده صورت گرفت. مایه‌زنی مصنوعی در مرحله ظهور سنبله توسط سوسپانسیون اسپور قارچ بیماری سپتوریوز که در آزمایشگاه تهیه شده بود صورت گرفت.

اندازه‌گیری کلروفیل و TBARM

برای اندازه‌گیری کلروفیل از روش Porra et al. (1989) استفاده شد. مقدار ۰/۵گرم نمونه برگ (به صورت منجمد) را کاملا خرد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط می‌کنیم. پس از سانتریفوژ میزان جذب (A) در طول موجهای ۶۴۶/۶ و ۶۶۳/۶ و ۷۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر ثبت شد. میزان کلروفیل a (Chl a) و کلروفیل b (Chl b) و کل کلروفیل بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$\text{Chl a } (mgml^{-1}) = 12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6}$$
$$\text{Chl b } (mgml^{-1}) = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6}$$
$$\text{کل Chl } (mgml^{-1}) = 16.76A_{646.6} - 6.34A_{663.6}$$

برای سنجش میزان اکسیداتیو در سطح سلول، میزان مالون دی آلدئید (ماده نهایی که در فرآیند اکسیداسیون سلولی با ثبات بالا)



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]

اندازه‌گیری شد. بدین منظور از روش تغییر یافته Hagege (1990) استفاده شد.

استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن

نمونه برگ (۰/۵ گرم) در مراحل مختلف پیری و در زمان بروز واکنش HR ناشی از سپتوریوز برگی برداشت و بلافاصله در ازت مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج RNA توسط کیت Biozol از نمونه‌های برگ یخ زده، صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شد. برای بررسی کمی میزان RNA، مقدار جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت و درصد خلوص آن محاسبه شد.

جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌های کاتالاز، متالوتاینین و گلوتامین سنتتاز از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad با توان ارزیابی بیان ژن در زمان واقعی و کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) استفاده شد. این دستگاه در هر چرخه از فعالیت قادر است که مقدار محصول واکنش پلیمراز را نشان دهد. در این دستگاه از آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های کاتالاز، متالوتاینین و گلوتامین سنتتاز استفاده شد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار GAPDH که دارای بیان یکسانی در تمام مراحل نمونه‌برداری می‌باشد استفاده شد (جدول۱). ارزیابی میزان بیان ژن توسط نرم‌افزار REST و با استفاده از Randomization test انجام شد و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم شد. 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 محصولات سبب بررسی میزان تابش اشعه می‌شود.

## نتایج و بحث

در این مطالعه میزان TBARM در هر دو رقم با پیشرفت مرحله نموی افزایش داشت (شکل۱). با این حال، روند این افزایش تا مرحله S2 به طور نسبی کند بود. به نظر می‌رسد ارقام از طریق فعال‌کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش پراکسیداسیون چربی‌های غشا و در طی آن کنترل نسبی سطح اکسیداسیون سلولی و نهایتا میزان TBARM می‌شوند. این موضوع توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Luna et al. 2004). در مرحله S4 که پیری بیشتری رخ داده است میزان شاخص اکسیداتیو سلولی (TBARM) که مبین میزان پیشرفت فرآیند پیری وتغییر در بافت سلولی می‌باشد، نیز افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. در واکنش فوق حساسیت نیز میزان TBARM همانند مرحله‌ی نهایی پیری (S4)، افزایش نشان داد که به نظر می‌رسد گیاه برای ایجاد تعادل و کاهش صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در اثر تنش وارده بر اثر اسپورپاشی و واکنش فوق حساسیت، میزان این ماده را افزایش داده است. محققان گزارش کردند که در زمان پیری فعالیت آنزیم‌های اکسنده در برگ‌های اسفناج کاهش می‌یابد (Hodges and Forney 2000; Hsu and Kao 2003). رقم حساس تجن همواره میزان TBARM بیشتری نسبت به لاین مقاوم #۱۰ داشت (شکل۱) که این اختلاف از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. اختلاف این دو رقم در مرحله S4 و HR بیشتر از مراحل اولیه بود. به نظر می‌رسد زمانی‌که سلول‌های گیاهی در غلظت‌های بالای ROS با افزایش توانایی سیستم دفاعی تلاش می‌کنند تا با بروز تنش اکسیداتیو مقابله کنند، لاین#۱۰ در این زمینه نسبت به رقم تجن برتری نشان داده و با پایین نگه داشتن سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن از افزایش TBARM جلوگیری کرده است.

طبق نتایج به‌دست آمده در این آزمایش، میزان کلروفیل برای هر دو رقم در مرحله برگ سبز (G.L) دارای بیشترین مقدار بود. با پیشرفت مراحل نمو، میزان کلروفیل ارقام کاهش نشان داد که با زرد شدن گیاه در اواخر مراحل رشدی گیاه مرتبط بود (شکل ۲). کاهش کلروفیل در اثر پیری یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تشخیص پیری در گیاهان می‌باشد ( Hukmani and Tripathy 1994). به طور کلی در گیاهان مونوکارپیک، رشد و نمو دانه، پیری گیاه و به ویژه پیری برگ را کنترل می‌کند به نحوی که حذف دانه درحال رشد، پیرشدن گیاه را به تاخیر می‌اندازد (Srivall and Khanna-Chopra 2004) زیرا به محض تشکیل

[1] SYBER green

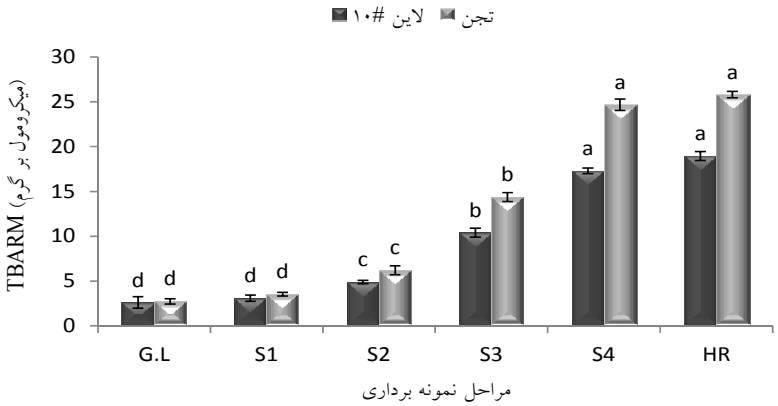


[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

| نام ژن | توالی آغازگر (′3 -′5) | دمای ذوب (°C) | شماره دسترسی |
|---|---|---|---|
| کاتالاز | F: CCATCTGGCTCTCCTACTGG | ۶۰ | E16461 |
| | R: AGAACTTGGACGGCCCTGA | ۶۱ | |
| گلوتامین سنتتاز | F: AATTCTGGAAGGAAGGGTTG | ۶۰ | ثبت نشده |
| | R: TTTGTATCCCTCGCGTATAGCTT | ۶۰ | |
| متالوتاینین | F: ACACCAAGGGCAGAGCATAG | ۶۰ | L11879.1 |
| | R: GCATAGGCGGAGAGCGAGCA | ۶۰ | |
| گلیسر آلدئیدفسفات دهیدروژناز | F: TCACCACCGACTACATGACC | ۶۰ | EF592180 |
| | R: ACAGCAACCTCCTTCTCACC | | |



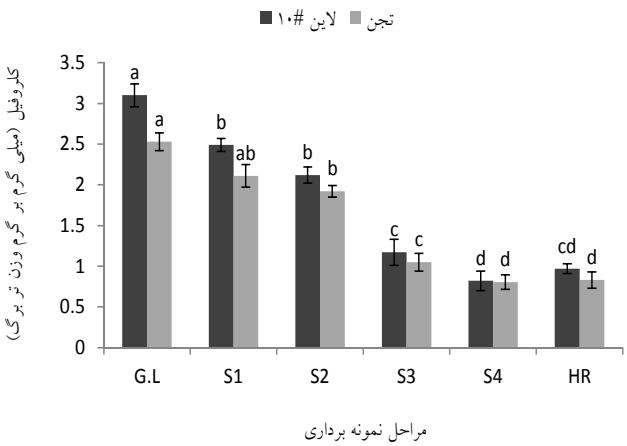

شکل۱- میزان سطح اکسیداسیون سلولی (TBARM) در مراحل مختلف نموی در برگ گندم G.L) برگ سبز؛ S1) آغاز زرد شدن برگ‌های پایینی؛ S2) مشاهده حدود۲۰ درصد زردی برگ‌ها؛ S3) مشاهده حدود ۴۰درصد زردی برگ‌ها؛ S4) مشاهده حدود ۶۰ درصد زردی برگ‌ها؛ HR) واکنش فوق حساسیت

دانه انتقال مواد غذایی به ویژه نیتروژن از برگ به دانه شروع گردیده و در نتیجه پروتئین محلول کل برگ، کاهش می‌یابد. نتایج تحقیقات Matile et al. (1996) نشان داد که کلروفیل در مراحل ابتدایی رشد گیاهان کم بوده و هرچه به سن بلوغ فیزیولوژیکی بذر نزدیک‌تر می‌شود، میزان آن افزایش می‌یابد که احتمالا این امر به دلیل نیازهای شدید گیاه از لحاظ تأمین ذخایر بذری بوده است. در نهایت با آغاز مرحله پیری و زردشدن برگ، میزان کلروفیل‌ها کاهش محسوسی نشان داد. تحقیقات Salehi et al. (2003) نشان می‌دهد کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش در مراحل پایانی رشد سرعت می‌یابد. این امر به دلیل کاهش بیوسنتز کلروفیل و افزایش فرآیندهای اکسیداسیونی مرحله پیری قابل انتظار است (Salehi et al. 2003). در این مطالعه ارقام از نظر میزان کلروفیل در مراحل پایانی رشد، اختلاف کمتری داشتند. به نظر می‌رسد پیر شدن برگ‌های جوان و همین‌طور تغذیه ازت باعث شده است تا در مراحل پایانی، اختلاف بین ارقام به حداقل برسد. در نمونه‌برداری واکنش فوق حساسیت نیز همانند مراحل پایانی نموی، میزان کلروفیل در هر دو رقم کاهش نشان داد. انواع اکسیژن فعال سبب بی‌رنگ شدن یا از بین رفتن رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و سایر ترکیبات رنگیزه‌ای می‌شوند کاهش محتوای کلروفیل تحت تنش ممکن است به دلیل آهسته‌تر شدن سنتز و یا شکستن و تخریب سریع رنگیزه‌های کلروفیلی توسط آنزیم کلروفیلاز باشد (Mauchamp and Methy 2004).

ارزیابی الگوی تظاهر ژن کاتالاز، متالوتیونئین و گلوتامین سنتتاز کاتالاز به همراه پراکسیداز مرحله مهمی از سم‌زدایی ROS را به

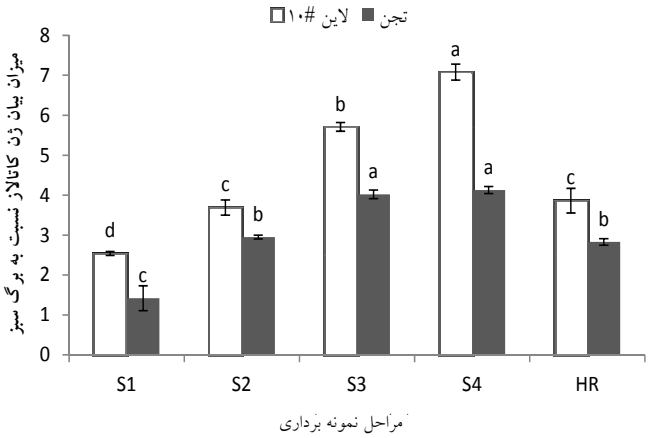


[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]




شکل ۲- میزان کلروفیل در مراحل مختلف نموی در برگ گندم G.L) برگ سبز؛ S1) آغاز زرد شدن برگ‌های پایینی؛ S2) مشاهده حدود ۲۰درصد زردی برگ‌ها؛ S3) مشاهده حدود ۴۰درصد زردی برگ‌ها، S4) مشاهده حدود ۶۰ درصد زردی برگ‌ها؛ HR) واکنش فوق حساسیت

عهده دارند. کاتالاز دارای گروه هم (Heme) می‌باشد و سبب تجزیه اکسیژن اتمی به پراکسید هیدروژن در گیاه می‌شود. حذف مقادیر اضافی و دخالت در تنظیم ظرفیت مقادیر مناسب از $H_2O_2$ سلولی به عهده دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز می‌باشد. آنزیم کاتالاز در این راستا نقش مهمتری را ایفا می‌کند. در این مطالعه بیان ژن کاتالاز در مراحل مختلف پیری برای هر دو رقم روند افزایشی نشان داد و در مرحله S4 به بیشترین میزان خود رسید (شکل۳). بالاتر بودن فعالیت کاتالاز در ارقام مورد مطالعه در مرحله‌ی S4 موجب کاهش صدمات رادیکال‌های آزاد اکسیژن در این ارقام شد. رقم تجن در تمامی مراحل بیان ژن کمتری نسبت به لاین #۱۰ داشت که نشان‌دهنده ظرفیت کمتر این رقم در کاهش صدمات ROS بود. نتایج گزارش شده درباره نحوه فعالیت آنزیم کاتالاز طی مرحله پیری متفاوت می‌باشد. در بررسی‌هایی که روی گیاه توتون در مرحله رشد رویشی انجام شد، فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش سن برگ کاهش پیدا کرد (Oh et al. 2005). محققان 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 با توجه به نتایجی که ذکر شد، به نظر می‌رسد که نحوه فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله پیری بستگی به گونه گیاهی، نوع اندام گیاهی و شرایط آزمایش دارد. در گندم بیان شده است که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در طول مراحل رشد افزایش یافته و افزایش آن در ارقام متحمل به طور چشمگیری بیشتر از ارقام حساس است (Huseynova 2012).




شکل ۳- میزان بیان ژن کاتالاز در مراحل مختلف نموی در برگ گندم G.L) برگ سبز؛ S1) آغاز زرد شدن برگ‌های پایینی؛ S2) مشاهده حدود ۲۰ درصد زردی برگ‌ها؛ S3) مشاهده حدود ۴۰ درصد زردی برگ‌ها؛ S4) مشاهده حدود ۶۰ درصد زردی برگ‌ها؛ HR) واکنش فوق حساسیت

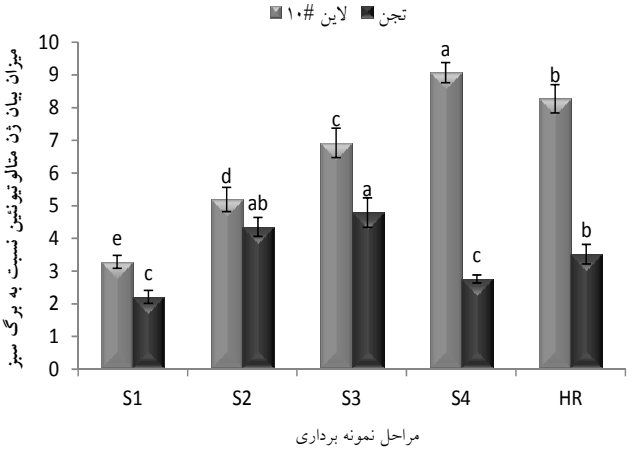
میزان بیان ژن کاتالاز طی واکنش فوق حساسیت (HR)، کمتر از مرحله‌ی S4 پیری بود. به نظر می‌رسد زمانی که گیاه در شرایط تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد، سلول‌های گیاهی با افزایش توانایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی تلاش می‌کنند تا با این وضعیت مقابله کنند. اما زمانی که پاسخ سلول به تنش اکسیداتیو کافی نباشد، سلول و در نتیجه گیاه به سمت مرگ هدایت می‌شود. Swidzinski et al. (2004) نیز در مطالعات خود نتایج مشابهی را گزارش کردند. آلودگی گیاه با عوامل بیماری‌زا نیز منجر به تحریک پیری می‌شود و در اغلب موارد زردی برگ‌ها (شاخصه فنوتیپی پیری) ملاحظه می‌شود. بروز پیری در سلول‌های آلوده به عنوان مانعی فیزیولوژیک در جهت ممانعت از پراکندگی عامل بیماری‌زا تلقی می‌شود. به نظر می‌رسد گیاه با القای سریع واکنش فوق حساسیت در محل آلودگی از رشد و پراکنش عامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کند (Morel and Dangl. 1997). چون این واکنش نسبت به فرآیند پیری سریع اتفاق می‌افتد، گیاه فرصت کافی برای



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]

افزایش بیشتر بیان ژن پیدا نکرده و مرگ سلولی رخ داده است. در این مطالعه میزان بیان ژن کاتالاز در لاین #۱۰ نسبت به رقم تجن بیشتر بود. این کاهش در میزان بیان ژن کاتالاز در رقم حساس، می‌تواند به دلیل ممانعت در سنتز آنزیم یا تغییر در تجمع زیر واحدهای این آنزیم به واسطه تجمع مولکول های سمی پراکسید هیدروژن باشد (Van and Clijsters 1990). از آنجا که کاتالاز آنزیمی است که در مراحل ابتدایی نمو بیان می‌شود و واکنش فوق حساسیت باعث پیری زودرس در گیاه می‌شود، این مسئله دور از انتظار نیست.

از مهمترین رخدادها طی فرآیند پیری انتقال مولکول‌های بزرگ پس از تجزیه از برگ‌های مسن‌تر به اندام‌های ذخیره‌ای و دانه می‌باشد. شواهد انکار ناپذیری دال بر نقش متالوتاینین در کمک به دوام و بقای سلول‌های برگ به منظور انتقال مواد پروتئینی و ذخیره‌ای به دانه وجود دارد (Butt et al. 1998; Navabpour et al. 2003). پروموتور ژن متالوتاینین در مرحله پیری گیاه فعال می‌شود و بیان قابل توجهی از این ژن حاصل می‌شود (Gan and Amasino 1997). به طور مشابهی عوامل بیماری‌زا نیز بسیاری از ژن‌های وابسته به پیری را تحت تاثیر قرار می‌دهند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن متالوتاینین تا مرحله S4 افزایش یافت و در این مرحله به بیشترین مقدار خود رسید. با توجه به اینکه ژن مزبور از ژن‌های وابسته به مرحله پیری است (Buchanan 1994)، این موضوع چندان دور از انتظار نبود (شکل ۴). در طی واکنش فوق حساسیت نیز میزان بیان نسبی این ژن در حد مرحله S4 بود. چون با بروز این واکنش، پیری زودرس در گیاه ایجاد می‌شود، گیاه با افزایش بیان نسبی ژن متالوتاینین، سعی در کاهش صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارد. براساس نتایج تحقیق حاضر چنین به نظر می‌رسد بیان این ژن در القای مقاومت نسبی به شرایط اکسیداتیو دارای نقش قابل قبولی است. روند بیان نسبی این ژن در لاین #۱۰ در مقایسه با رقم تجن موید این مسئله است. میزان بیان این ژن در رقم تجن در تمامی مراحل پیری و واکنش فوق حساسیت نسبت به لاین #۱۰ کمتر بود. در مراحل انتهایی این تفاوت در میزان بیان ژن در دو رقم بیشتر نمایان شد. در واکنش فوق حساسیت همانند مرحله آخر پیری ($S_4$)، تفاوت در میزان بیان این ژن در دو ژنوتیپ آشکارتر بود (شکل ۴). نتایج مشابهی در افزایش نسبی بیان این ژن تحت‌تاثیر تیمارهای تنش‌زا گزارش شده است (Butt et al. 1998; Navabpour et al. 2011).



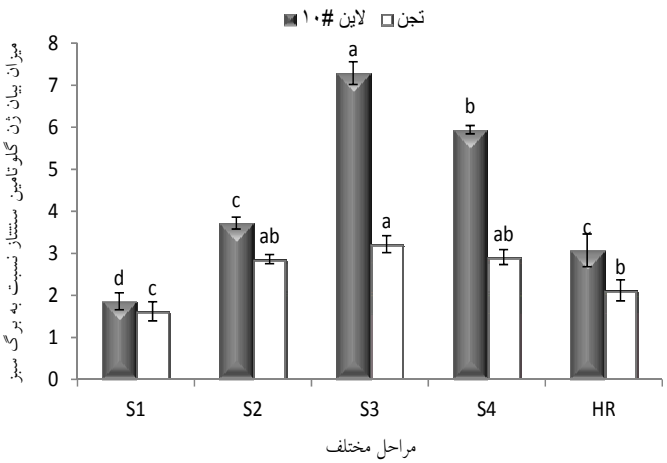

شکل۴- میزان بیان ژن متالوتاینین در مراحل مختلف نموی در برگ گندم G.L) برگ سبز؛ S1) آغاز زرد شدن برگ‌های پایینی؛ S2) مشاهده حدود ۲۰ درصد زردی برگ‌ها؛ S3) مشاهده حدود ۴۰ درصد زردی برگ‌ها؛ S4) مشاهده حدود ۶۰ درصد زردی برگ‌ها؛ HR) واکنش فوق حساسیت

الگوی بیان ژن گلوتامین سنتتاز در برگ به گونه‌ای بود که با افزایش سن نموی، عموماً افزایش نسخه‌برداری به طور قابل توجهی حاصل شد. چنین به نظر می‌رسد که این ژن در روند فرآیند پیری برگ نقش دارد. در تحقیقی که Ochs et al. 1999 انجام دادند، مشخص شد که ایزوفرم‌های مختلف این ژن، به ویژه ایزوفرمی که در سیتوپلاسم بیان می‌شود، بعد از شروع مرحله پیری در بافت‌های برگی گیاه کلزا، افزایش محسوسی نشان می‌دهند که حاکی از نقش ژن گلوتامین سنتتاز در فرآیند پیری برگ گیاه کلزا است. از مشخصه‌های بارز پیری برگ روند انتقال مواد آلی از برگ‌های مسن به اندام‌های جوان و ذخیره‌ای بویژه دانه است (Navabpour et al. 2003). بدین منظور شکسته‌شدن مولکول‌های حیاتی بزرگ نظیر پروتئین‌ها اهمیت زیادی دارد (Hortensteiner and Feller 2002). در این راستا ژن گلوتامین سنتتاز واجد اهمیت زیادی است و در تجزیه‌ی پروتئین‌ها و تعدیل میزان اسیدهای آمینه نقش دارد (Navabpour et al. 2003). میزان بیان ژن گلوتامین سینتتاز با پیشرفت مرحله پیری تا S3 افزایش و پس از آن روند کاهشی نشان داد (شکل ۵). چنین



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]

الگوی بیانی در مورد بسیاری از ژن‌ها و فعالیت متابولیکی آنزیم‌ها نیز دیده می‌شود. به نظر می‌رسد عوامل کنترلی بیان ژن‌ها با بیشترین ظرفیت ممکن تا یک نقطه حداکثری (آستانه) نسبت به یک عامل محرک (ROS) واکنش مثبت نشان داده و پس از آن به دلیل عدم وجود پتانسیل کافی برای واکنش روند کاهشی فعالیت قابل انتظار خواهد بود. این موضوع در مطالعات Navabpour et al. 2003 نیز گزارش شده است. در مرحله S3 بیشترین مقدار فعالیت ژن گلوتامین سنتتاز برای هر دو ژنوتیپ حاصل شد و در مرحله انتهایی فصل رشد، بیان گلوتامین سنتتاز کاهش یافت (شکل ۵). نیتروژن برای گیاه یک ماده غذایی مهم می‌باشد که به شکل محلول از خاک بدست می‌آید. مطالعات نشان داده که کمبود نیتروژن در گیاه باعث زرد شدن برگ‌ها و پیری گیاه می‌شود. گلوتامین سنتتاز اولین آنزیمی است که با تجمع آمونیاک در گیاه فعال می‌شود. گلوتامین سنتتاز، گلوتامات را با بکارگیری آمونیاک به گلوتامین تبدیل می‌کند. آمونیاک برای سلول‌های گیاه خاصیت توکسینی دارد و گیاه با بیان ژن گلوتامین سنتتاز، برای تغییر دادن آمونیاک تلاش می‌کند (Matsui et al. 2004). در مراحل اولیه رشد به علت جذب نیتروژن بیشتر توسط گیاه، فعالیت گلوتامین سنتتاز افزایش‌یافته و در مراحل پایانی فصل به علت پیری گیاه و کاهش جذب نیتروژن توسط گیاه از فعالیت گلوتامین سنتتاز کاسته شده است. در هر دو ژنوتیپ روند بیان ژن گلوتامین سنتتاز مشابه بود. در مرحله S3 اختلاف بین دو ژنوتیپ به لحاظ میزان بیان این ژن کاملاً محسوس بود. افزایش غلظت رادیکال‌های آزاد موجب آسیب رساندن به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (Buchanan 1994; Noctor and Foyer 1998). شکسته‌شدن مولکول‌های حیاتی بزرگ نظیر پروتئین‌ها اهمیت زیادی دارد (Hortensteiner and Feller 2002). از آنجا که ژن گلوتامین سنتتاز در تجزیه پروتئین‌ها و تعدیل میزان اسیدهای آمینه نقش بسزایی دارد (Navabpour et al. 2003) رقم مقاوم با بیان بیشتر ژن گلوتامین سنتتاز، سعی در کاهش اثرات تنش داشته و آسیب وارده از رادیکال‌های آزاد را به کمترین میزان برساند. در واکنش فوق حساسیت نیز که پیری زودرس اتفاق افتاده است، به علت پیری گیاه و کاهش جذب نیتروژن توسط گیاه از فعالیت گلوتامین سنتتاز کاسته شده است. در این نمونه‌برداری (واکنش فوق حساسیت) اختلاف بین دو ژنوتیپ همانند مرحله $S_2$ نموی، کمتر بود.




شکل ۵- میزان بیان ژن گلوتامین سنتتاز در مراحل مختلف نموی در برگ گندم G.L) برگ سبز؛ S1) آغاز زرد شدن برگ‌های پایینی؛ S2) مشاهده حدود ۲۰ درصد زردی برگ‌ها؛ S3) مشاهده حدود ۴۰ درصد زردی برگ‌ها؛ S4) مشاهده حدود ۶۰ درصد زردی برگ‌ها؛ HR) واکنش فوق حساسیت

طبق نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، رقم تجن در تمامی مراحل بیان ژنکمتری نسبت به لاین #۱۰ داشت که نشان‌دهنده ظرفیت کمتر این رقم در کاهش صدمات رادیکال‌های آزاد اکسیژن بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که گیاه با افزایش بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق سعی در کاهش صدمات رادیکال‌های آزاد داشته است و رقم مقاوم با افزایش بیشتر در بیان ژن‌های مذکور موفق‌تر عمل کرده است.

## منابع

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

Buchanan-Wollaston V (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. Plant Physiology 105: 839-846.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]

Butt A, Mousley K, Morris K, Beynon J, Can C, Holub E, Greenberg JT, Buchanan-Wollaston V (1998) Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein in Arabidopsis in response to isolates of Peronospora parasitica and *Psendomonas syringae*. Plant Journal 16:209-221.

Casano LM, Martin M, Sabater B (1994) Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activitiesto oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. Plant Physiology 106: 1033-1039.

Delorme VGR, McCabe PF, Kim DJ, Leaver CJ (2000) A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. Plant Physiology 123: 917-927.

Gan S, Amasino RM (1997) Making sense of senescence. Plant Physiology 113: 313-319.

Haddad R, Morris K, Buchanan–Wollaston V (2004) Expression analysis of genes related to oxidativeprotection during senescence in *Brassica napus*. Iranian Journal of Biotechnology 2: 269-278.

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

Hodges DM, Forney CF (2000) The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide onantioxidant profiles of senescing spinach leaves. Journal Experimental of Botany. 344: 645-655

Hörtensteiner S, Feller U (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. Journal Experimental of Botany 53: 927-937.

Hsu SY, Kao CH (2003) Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol and antioxidant enzymes in rice leaves. Plant Growth Regulation 39: 83-90.

Hukmani P, Tripathy BC (1994) Chlorophyll biosynthetic reactions during senescence of excised barley (*Hordeum vulgare* L. cv IB 65) leaves. Plant Physiology 105: 1295-1300.

Huseynova IM (2012) Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. Biochemical et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 8: 1516-1523

Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, Groten K, Bernard S, Foyer CH (2004) Drought controls on $H_2O_2$ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. Journal Experimental of Botany 56: 417- 423.

Matile P, Hortensteiner S, Thomas H, Krautler (1996) Chlorophyll breakdown in senescent leaves. Plant Physiology 112: 1403-1409.

Matsui T, Bhowmik PK, Yokozeki K (2004) Glutamine synthetase in harvested Broccli head: changes in activity and gene expression during storage. Asian Journal of Plant Sciences 3: 76-81.

Mauchamp A, Methy M (2004) Submergence–induced damage of photosythetic apparatus in *phragmitesaustralis*. Envirnmental and Experimental of Botany 51: 227-235.

Morel JB, Dangl JL (1997) The hypersensitive response and induction of cell death in plants. Cell Death Differentiation 4: 671-683.

Navabpour S, Bagherieh MB, Haddad R (2011) Comparison of Induced Gene Response to stressful Treatment in *Spinacia oleracea* and *Brassica napus*. Agricalture Biology 10: 1-10.

Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, Mackerness S, Buchanan- Wollaston V (2003) Expression of senescence–enhanced genes in response to oxidative stress . Journal of Experimental Botany 54: 2285 -2292.

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology 49: 249-279.

Ochs G, Schock G, Trischer M, Kosemund K, Wild A (1999) Complexity and expression of the glutamine synthetase mutigene family in the amphidipliod crop Brassica napus. Plant Molecular Biology 39: 395-405.

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

Porra RJ, Thompson WA, Kriedmann PE (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. Biochemistry and Biophysica Acta 975: 384-394.

Rao MV, Davis KR (2001) The physiology of ozone induced cell death. Planta 213:682-690.

Salehi M, Nassiri Mahallati M, Koocheki A (2003) Leaf nitrogen and chlorophyll as indicators for salt stress. Iranian Journal Field Crops Research 1: 199-205 (In Farsi)

Shao HB, Liang MA, Shao MA, Wang BC (2005) Changes of some physiological and biochemical indices for soil water deficits among 10 wheat (Triticum aestivum L.) genotypes at seedling stage. Colloids Surf, B: Biointerfaces 42: 107-113.

Shetty NP, Kristensen BK, Newman MA, Møller K, Gregersen PL, Jørgensen HJL (2003) Association of hydrogen peroxide with restriction of*Septoria tritici* in resistant wheat. Physiology and Molecular Plant Pathology 6: 333-346.

Srivall B, Khanna-Chopra R (2004) The developing reproductive sink induces oxidative stress to mediatenitrogen mobilization during monocarpic senescence in wheat. Biochemical.and Biophysical. Research. Community 325: 198-202.

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

Van F, Clijsters H (1990) Biotechnologyfor the production of secondarymetabolites. Plant Cell Environment 13: 195-206.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]

peroxidation in leaf tissue in Arabidopsis thaliana. Plant Science 158: 115-127.
Ziatabar ahmadi MKH, Babaeian NA (2002) Saline wastelands environment and plant growth. Mazandaran university press. 407P (In Farsi).
Wang D, Shannon MC, Grieve CM (2001) Salinity reduces radiation absorption and use efficiency in soybean. Field Crops Research 69: 267-277.
Ye Z, Rodriguez R, Tran A (2000) The development transition of flowering represses ascorbate peroxidaseactivity and induces enzymatic lipid

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.6.2 ]