مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره دوم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۱۵۴-۱۴۵

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (Cm APX) و میزان بیان ژن کد کننده آن تحت تنش شوری در توده‌های خربزه (*Cucumis melo L.*) بومی سیستان

The activity of ascorbate peroxidase (Cm APX) enzyme and expression level of it's encoding gene in salt stress condition in three Sistan melon Landraces (*Cucumis malo* L.)

سمیه منتظری‌نژاد[۱*]، محمود سلوکی[۲] و براتعلی فاخری[۲]
Somayeh Montazerinezhad[1*], Mahmood Solouki[2] and Barat Ali Fakheri[2]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه زابل
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه زابل

1- M.Sc graduate student, Agricultural Biotechnology, University of Zabol.
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: montazerinezhad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱)

چکیده

شوری از جمله عوامل نامساعد محیطی است که رشد و عملکرد گیاهان زراعی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تنش‌ها باعث بروز دامنه وسیعی از واکنش‌ها در گیاهان، از تغییر بیان ژن و متابولیسم سلول تا تغییر در سرعت رشد و عملکرد می‌شوند. در این پژوهش به منظور بررسی میزان بیان ژن Cm APX و تغییرات آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز (APX) در سه توده خربزه بومی سیستان، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل شده و تنش شوری (۲۵۰ و ۳۵۰ میلی مولار NaCl) اجرا شد. پس از آن پاسخ آنزیمی و بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز (Cm APX) با استفاده از روش Real Time PCR در سه توده خربزه قندک، سفیدک و سفیدک خط دار انجام گرفت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، در سطح شوری ۲۵۰ mM بیان ژن Cm APX در هر سه توده نسبت به نمونه کنترل افزایش نشان داد اما این افزایش بیان در توده قندک و سفیدک در سطح پنج درصد معنی دار شد. در سطح شوری mM ۳۵۰ بیان ژن Cm APX درهر سه توده مورد بررسی کاهش یافت. در این سطح شوری، بیان ژن Cm APX در توده سفیدک خط دار به صورت معنی داری نسبت به نمونه کنترل در سطح پنج درصد کاهش نشان داد. افزایش بیشتر فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز در کنار بیان پایدارتر و بیشتر ژن (Cm APX) در توده قندک نشان داد که این توده بهتر توانست تنش شوری را تحمل نماید و کاهش بیان این ژن در توده سفیدک خط دار به همراه کاهش فعالیت آنزیمی آن نشان‌دهنده حساسیت این توده به شرایط تنش شوری است. پیشنهاد می‌شود که دیگر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین ارتباط آنها با هم در توده های خربزه بومی سیستان مورد بررسی قرارگیرد.

واژه‌های کلیدی:
بیان ژن
تنش شوری
خربزه
ژن *Cm APX*
Real Time-PCR

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]

مقدمه

خربزه (*Cucumis melon* L.) یکی از محصول‌های مهمی است که اغلب در خاک خشک و نیمه خشک کشت می‌شود و به‌عنوان یک گیاه با تحمل متوسط نسبت به شوری شناخته‌شده‌است (Yasar et al, 2006). گیاهان دامنه وسیعی از شرایط نامساعد محیطی به‌خصوص تنش شوری، کمبود آب مورد نیاز، کاهش و افزایش دما را در طی دوران زندگیشان تحمل می‌کنند و تعدادی از پاسخ‌ها که شامل سازگاری متابولیکی برای مقابله با این شرایط است، ارائه می‌دهند (Bohnert et al, 1995; Bressan et al, 2009; Hasanuzzaman et al, 2012; Kosova et al, 2013). شوری در خاک یا آب یکی از تنش‌های اصلی در مناطق خشک و نیمه خشک است که می‌تواند رشد و محصول گیاه را به شدت محدود کند (Koca et al, 2007; Allakhverdiev et al, 2000; Ghorbanli et al, 2012). شواهد نشان می‌دهد که تنش شوری باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان مختلف و از جمله تولید دو نوع رایکال آزاد [سوپراکسید (O_2^-)، هیدروکسیل (OH)، پرهیدروکسی (HO_2) و رادیکالهای آلوکسی (RO)] و مولکول های غیر رادیکالی شامل [پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، اکسیژن واحد (O_2)] می‌شود (Gill and Tuteja, 2010) که می‌توانند مولکول‌های بزرگی مانند کربوهیدرات، چربی‌ها، اسیدهای نوکلئیک و ساختار غشا را تخریب کنند (Bian and Jiang, 2009; Sharma et al, 2012). برای زنده ماندن در چنین شرایطی گیاهان سازوکارهای دفاعی خاصی را گسترش می‌دهند و فرآیندهایی برای سازگاری جهت افزایش تحمل شان به شرایط نامساعد را ایجاد می‌کنند(Xu et al, 2008; Mirzaee et al, 2013).

دامنه وسیعی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در انواع ترکیبات سلولی مربوط به گیاهان مختلف شناسایی‌شده‌است (Asada, 1992; Jimenez et al, 2001; Gill and Tuteja, 2010). فعالیت هم زمان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR)، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR)، و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) به عنوان قسمتی از سامانه آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سلول را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive species (ROS oxygen)) حفاظت کند (Asada, 1994; Gill and Tuteja, 2010).

سلول‌های گیاهی برای مقابله با ROS تولیدشده تحت شرایط تنش با دو استراتژی اصلی یعنی کاهش ROS در کل ساختار ساختمان گیاه و همچنین سازگاری فیزیولوژیکی با ROS مقابله می‌کنند (Mittler, 2004). آسکوربات پراکسیدازها یک نقش کلیدی در پاکسازی ROS و حفاظت سلول‌ها در مقابل اثرهای مخرب آن در جلبک و گیاهان عالی دارند (Mishra and Jhe, 2011).

پژوهش‌های بسیاری در ذرت (Molazem and Azimi, 2011) و گندم (Esfandiari et al, 2007) نشان می‌دهد که فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای تحمل به تنش‌های غیرزنده مانند پاسخ به تنش شوری وابسته‌است (Mirzaee et al, 2013).

دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز از مهمترین آنتی-اکسیدان‌ها هستند که باعث شکسته شدن H_2O_2 به آب و مولکول اکسیژن می‌شوند (Yong et al, 2008). در کلروپلاست، آسکوربات پراکسیداز H_2O_2 تولیدشده را از طریق چرخه آسکوربات- گلوتاتیون سم‌زدایی می‌کند (Asada, 1992). واکنش آسکوربات پراکسیداز با H_2O_2 به‌شرح‌زیراست (Dabrowska et al, 2007):

$$APX + H_2O_2 \rightarrow Enzyme\ I^{a} + H_2O$$
$$Enzyme\ I + H_2As \rightarrow Enzyme\ II^{b}\ HAs^{\cdot}$$
$$Enzyme\ II + H_2As \rightarrow APX + Has^{\cdot}\ H_2O$$
$$Has + Has^{\cdot} \rightarrow H_2As + As$$

آنزیم^{a,b} - فرم I (با ۲ الکترون آزاد) و فرم II (با ۱ الکترون آزاد)

در حقیقت APX با قدرت چسبندگی زیادی که با H_2O_2 دارد می‌تواند در رفع مسمومیت به گیاه کمک کند. درحالی‌که دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توانند سرعت این واکنش را بالا ببرد اما قدرت چسبندگی کمی با H_2O_2 دارد و نمی‌تواند به خوبی آن را مهار کند. آنزیم APX مانند یک سیگنال مولکولی می‌توانند پراکسید هیدروژن را تنظیم کند (Panchuk et al, 2005). آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش مهمی در فعالیت روزنه‌ها از طریق

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]

تنظیم غلظت H_2O_2 در سلول گیاهان تحت تنش شوری دارند، چرا که غلظت این ترکیب به‌عنوان یکی ازسیگنال‌های مهم در به حرکت درآوردن سلول‌های محافظ روزنه عمل می‌کند (Chen and Gallie, 2004).

APX در پاسخ به تعدادی از تنش‌های محیطی از قبیل شوری، خشکی، شدت طول موج‌های بلند، سرما، کمبود عناصر میکرو، تنش آهن، نور بیش از اندازه، اشعه UV و هوای آلوده فعال می‌شود (Bonifacio et al, 2011; Tewari et al, 2013; Wang et al, 2013).

با توجه به پیشرفت‌های گذشته، متأسفانه هنوز سازوکارهای مولکولی و بیوشیمیایی دخیل در تحمل به شوری اغلب ناشناخته باقی مانده‌اند. بنابراین نیاز به دستیابی اطلاعات کافی در زمینه اساس مولکولی و ژنتیکی مقاومت به تنش‌ها است (Bauer et al, 1993). این اطلاعات استراژی‌های مناسبی را جهت دستکاری گیاهان و اصلاح آنها با استفاده از روش‌های مولکولی و اصلاح نباتات سنتی ایجاد خواهند کرد (Razavi et al, 2001).

اگرچه افزایش و یا کاهش تعداد رونوشت‌های یک ژن دلیل بر نقش کلیدی آن در واکنش‌های بیوشمیایی و فیزیولوژیک نمی‌باشد، اما جستجو برای این گونه ژن‌ها راهی است که می‌توان در جهت شناسایی و جداسازی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش‌ها بکار برد (Lievens et al, 2001).

هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن Cm APX در سه توده خربزه بومی سیستان با استفاده از روش Real Time-PCR و همچنین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز APX و ارتباط آنها با هم تحت تنش شوری است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارهای تنش: ابتدا بذرها با محلول هیپوکلرید سدیم ۱درصد ضد عفونی و در آب مقطر با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرارداده‌شدند. سپس در گلدان‌های پلاستیکی که حاوی ماسه کاملاً شسته با آب مقطر بود کشت شد و تا ظهور دومین برگ به نحوی که خروج اولین قطرات آب از ته گلدان مشاهده شود، آبیاری شد. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار و سه توده خربزه بومی سیستان (سفیدک، قندک و سفیدک خط دار) و سه سطح شوری (صفر، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی مولار NaCl) در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل اجرا شد. هنگامی‌که دومین برگ ظاهر شد، به گیاهان شاهد فقط محلول هوگلند (Hogland and Arnon, 1950) اضافه شد. برای اعمال تنش در مورد گیاهان تحت تنش، از محلول با سطح شوری مورد نظر برای آبیاری گیاهان استفاده شد؛ این کار به مدت سه روز و به‌تدریج جهت سازگار شدن گیاهان انجام گرفت و سپس دومین برگ برداشت شد و در دمای ۸۰°C- تا زمان استخراج نگهداری شد.

جداسازی آر.ان.اِ و ساخت cDNA : استخراج آر.ان.اِی کل توسط کیت CinnaPure RNA شرکت کیاژن انجام شد. کیفیت آر.ان.اِی استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شد. تشکیل دو باند آر.ان.اِی ریبوزومی 28s و 18s در روی ژل نشان دهنده کیفیت بالای آر.ان.اِی تخلیص شده بود. برای بررسی کمی میزان استخراج، از اسپکتوفتومتر استفاده شد. مقدار جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده‌شد و درصد خلوص آن محاسبه‌شد. نسبت بدست آمده برای طول موج ۲۶۰/۲۸۰ در این آزمایش در محدوده ۱/۸ تا ۲ بود که نشان دهنده خلوص قابل قبول آر.ان.اِ بود. تیوب‌ها برای نگهداری در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد قرارداده‌شدند. برای از بین بردن دی.ان.اِی ژنومی از DNase شرکت سیناژن استفاده شد. دومین مرحله بعد از استخراج آر.ان.اِ، سنتز cDNA از روی آن جهت انجام مراحل بعدی است. این واکنش با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR (شرکت Vivantis، کشور اسپانیا) انجام گرفت. در ساخت cDNA از ۱۰۰۰ نانوگرم آر.ان.اِ در همه نمونه‌ها استفاده شد.

انجام روش QRT-PCR: در این تحقیق از دستگاه Real Time-PCR Set Corbett (3000) و کیت Hot Tag EvaGreen qPCR master mix (ROX) شرکت سیناژن برای ارزیابی کمی بیان ژن APX استفاده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]

جدول۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش های Real Time PCR

Table 1- sequence of the primers used in Real Time PCR reactions

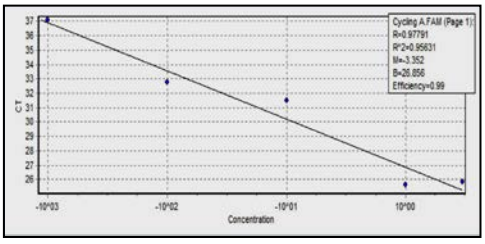
Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Cm APX	TCAGCAAAAAAAGCATCCTC	ACTACCAACCCTCTCATC
18s rRNA	GGACAGGATTGACAGATTGATA	CTCGTTCGTTATCGGAATTAATTA

برای انجام واکنش Real Time-PCR ابتدا توالی mRNA ژن Cm APX را از سایت NCBI ذخیره نموده و سپس با توجه به آن توالی آغازگرهای مورد نظر طراحی شد. آغازگرها توسط نرم افزارهای AlleID7 و CLC Main Workbench 5 و نرم افزارهای آنلاین مانند Primer3 از نظر محل اتصال و ویژگی های مطلوب مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت، همچنین توسط NCBI Blast از یکتا بودن بودن محل جفت شدن آغازگرها اطمینان حاصل شد. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت۱۰ میکرومول، چهار میکرولیتر Master mix، یک میکرولیتر نمونه cDNA و تا حجم ۲۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل استفاده شد. برای هر واکنش سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از آماده نمودن مخلوط واکنش پلیت مورد نظر به دستگاه منتقل شد. این واکنش با شرایط دمایی ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (فعالسازی ابتدایی آنزیم) و ٤۰ تکرار با چرخه-های ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشت شدن)، ٤۵ ثانیه در دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد (دمای Tm آغازگر)، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (بسط ترکیبی) و افزایش دما از ۵۰ درجه تا ۹۹ درجه هر ثانیه یک درجه (منحنی ذوب) انجام شد. در ارزیابی الگوی بیان ژن‌ها از دو روش ارزیابی مطلق و ارزیابی نسبی می‌توان استفاده نمود. از آنجایی که ژن مرجع 18s rRNA نسبت به GAPDH و بتا اکتین ثبات بیشتری را از نظر بیان نشان می‌دهد ژن قابل اطمینان‌تری جهت انتخاب به عنوان کنترل داخلی و انجام نرمال‌سازی محسوب می‌شود (Tsuji et al., 2002). وبه-عنوان استاندارد داخلی برای نرمال کردن در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت (جدول۱). در این پژوهش بیان نسبی ژن‌ها با روش pfaffel محاسبه شد (Pfaffel, 2007). به‌این‌صورت‌که هر تیمار با گیاهان شاهد (کنترل) مربوط به توده مورد نظر مقایسه شد. جهت تجزیه داده‌ها از نرم افزار REST (Pfaffel et al, 2002) استفاده شد.

استخراج عصاره آنزیمی و فعالیت سنجی آسکوربات پراکسیداز: ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ وزن شد و سپس چهار سی سی بافر Ice - cold extraction به آن اضافه و در هاون سرد کاملاً ساییده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱٦۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس فاز بالایی محلول سانتریفوژ شده به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد (Azevedo Neto et al, 2006). در نهایت میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) به کمک روش (Nakano and Asada, 1981) سنجیده شد.

نتایج

منحنی استاندارد ژن مرجع با استفاده از رقت‌های ترتیبی ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ نانوگرم در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به منحنی استاندارد ژن مرجع 18s rRNA و منحنی استاندارد ژن مورد پژوهش، بازده واکنش برای ژن 18s rRNA و Cm APX محاسبه شد که برای ژن 18s rRNA برابر با ۰/۹۹ و میزان R_2 برابر ۰/۹۵، و برای ژن Cm APX برابر با ۰/۹٤ و میزان R_2 برابر ۰/۹۸ به دست آمد.



شکل ۱- منحنی استاندارد ژن Cm APX، محور افقی: لگاریتم غلظت cDNA- محور عمودی: سیکل آستانه (Ct)

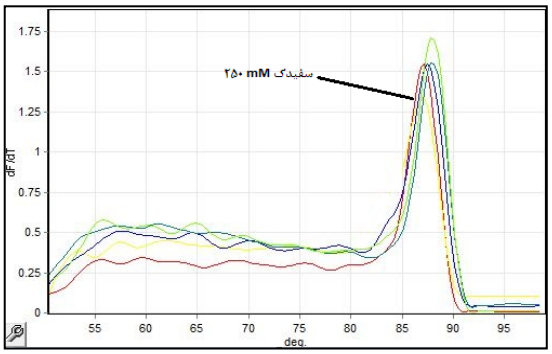
Figure 1- Standard curve Cm APX gene, horizontal axis: logarithm cDNA concentration- vertical axis: Cycle Threshold (Ct).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]

الکتروفورز فرآورده واکنش پی.سی.آر در ژل آگارز نشان دهنده تکثیر باند اختصاصی در واکنش بود. سپس واکنش Real Time PCR، طبق چرخه دمایی بیان شده در قسمت مواد و روش‌ها انجام شد.

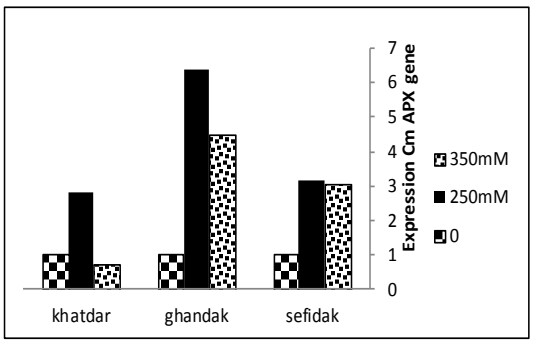
بیان نسبی ژن Cm APX: برای هر دو ژن Cm APX و 18s rRNAعمل تکثیر صورت گرفت و سپس منحنی تغییرهای فلورسانت بر حسب دما نیز با استفاده از نرم افزار دستگاه Real Time PCR SetCorbett (3000) رسم شد، کاهش ناگهانی شدت نور فلورسانت برای ژن Cm APX و 18s rRNA به‌ترتیب در دمایی حدود ۸۷°C و ۸۶°C درجه دیده می شود. این مسئله بیانگر این است که Tm محصول ژن Cm APX، ۸۷°C و برای ژن 18s rRNA، ۸۶°C است. پس از مشتق‌گیری از منحنی تغییرهای فلورسانس منحنی درجه دومی به‌دست می‌آید. در این منحنی هر peak نمایانگر یک محصول است که وجود یک پیک مشترک برای تمامی محصول‌ها، نشان دهنده اختصاصی بودن محصول واکنش Real time PCR است. شکل دو منحنی ذوب برای ژن Cm APX را نشان می‌دهد.



شکل۲- منحنی ذوب ژن Cm APX، پیک موجود در آن نشان دهنده دمای ۸۷ درجه سانتیگراد، Tm محصول ژن *Cm APX* میباشد. به‌عنوان‌مثال رنگ قرمز، منحنی ذوب ژن Cm APX مربوط به توده سفیدک در سطح شوری ۲۵۰ mM است.

Figure 2- Melt Curves of Cm APX gene, The peak indicates a melting temperature (Tm) of 87 °C in Cm APX gene product. For example, the red color is the melting curve of Cm APX gene in Sefidak landrace at 250 mM.

پس از به‌دست‌آوردن Ct هر دو ژن 18srRNA و Cm APX برای تمام نمونه‌ها، تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار REST 2009 انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، در سطح شوری mM ۲۵۰ بیان ژن Cm APX در هر سه توده خربزه (قندک، سفیدک، سفیدک خط دار) نسبت به نمونه کنترل افزایش نشان داد اما این افزایش بیان فقط در توده قندک و سفیدک در سطح ۵ درصد معنی دار شد. در سطح شوری mM ۲۵۰ افزایش بیان ژن Cm APX در توده سفیدک به بالاترین حد رسید و با افزایش شوری تا سطح mM ۳۵۰، بیان آن کاهش یافت. بیان ژن Cm APX در توده قندک در سطح شوری Mm ۲۵۰ نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری در سطح پنج درصد نشان‌داد؛ اما در سطح شوری Mm ۳۵۰ میلی مولار کاهش یافت. در توده سفیدک خط دار، افزایش بیان ژن Cm APX در سطح شوری mM ۲۵۰ در سطح پنج درصد معنی‌دار نبود. اما در سطح شوری mM ۳۵۰، بیان ژن Cm APX به صورت معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل در سطح ۵ درصد کاهش یافت (شکل ۳، جدول ۲).



شکل۳- بیان ژن Cm APX در سه توده خربزه بومی سیستان (سفیدک، قندک و سفیدک خط دار) تحت تیمار با تنش شوری

Figure 3- Cm APX gene expression in three Sistan melon Landrace (Sefidak, Ghandak and Sefidak Khatdar) treated with salt stress.

در بسیاری موارد تجمع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پی تجمع رونوشت ژن رخ می‌دهد. به‌همین‌منظور به بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز که در بخش قبل میزان بیان آن بررسی شد پرداخته شد. نتایج تجزیه آماری داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]

جدول ۲- آنالیز بیان ژن Cm APX در توده های خربزه بومی سیستان تحت تیمار با تنش شوری با استفاده از نرم افزار REST 2009

Table 2- gene expression Analysis Cm APX in Sistan melon Landrace (Sefidak, Ghandak and Sefidak Khatdar) treated with salt stress.

توده/سطح شوری	Cm APX ارزیابی نسبی بیان ژن**	P(H0)
سفیدک/۳۵۰ میلی مولار	3.05	0.073 ns
سفیدک/۲۵۰ میلی مولار	3.15	0.023 *
قندک/۳۵۰ میلی مولار	4.478	0.046 *
قندک/۲۵۰ میلی مولار	6.390	0.033 *
خط دار/ ۳۵۰ میلی مولار	0.723	0.049 *
خط دار/ ۲۵۰ میلی مولار	2.810	0.08 ns

*، ns به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح آماری ۵٪ و عدم معنی داری است.

** در ارزیابی نسبی، میزان افزایش یا کاهش بیان ژن در هر تیمار به صورت نسبت بیان می شود که در این حالت امکان اندازه گیری میزان بیان ژن در تیمار کنترل وجود ندارد و به عبارت دیگر عدد یک در نظر گرفته می شود.

ns, * means non-significant and significant at 1% probability levels, respectively

** In comparative assessment, increase or decrease in gene expression in each treatment is expressed as ratio where in this case, it is not possible to measure gene expression in the control treatment and in other words, it is considered 1.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمار شوری بر عملکرد آنزیم آسکوربات پراکسیداز

Table 3- Analysis of variance of antioxidant activity.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	آسکوربات پراکسیداز APX
		$\mu mol\ H_2O_2 . min^{-1}.mg^{-1}$ protein
توده Landrace	2	0.044**
شوری Salinity	2	0.027**
توده × شوری Landrace × salinity	4	0.046**
خطا Error	16	0/000007

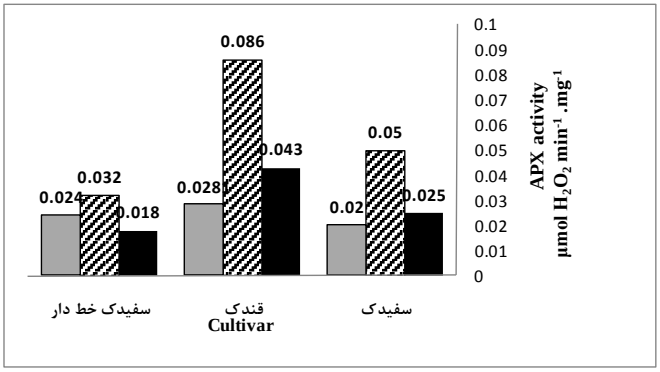
** تفاوت معنی دار در سطح آماری ۱٪ را نشان می دهد.

** means significant at 1% probability

جدول ٤- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

Table 4- Mean comparison for activity of ascorbate. peroxidase (APX)

	تیمار Treat ment	آسکوربات پراکسیداز $\mu mol\ H_2O_2\ min^{-1}.mg^{-1}$ protein
رقم (توده) Cultivar	Ghandak قندک	0/902 a
	Sefidak سفیدک	0/551 b
	سفیدک خط دار Khatdar Sefidak	0/202 c
شوری (میلی مولار) Salinity (mM)	0	0/323 a
	350	0/446 b
	250	0/626 c



شکل ٤- اثر متقابل سطوح شوری و رقم (توده) روی فعالیت آنزیم APX. سطوح شوری عبارتند از صفر (■)، ۲۵۰ (▨ mM) و ۳۵۰ (■ mM) نمک (NaCl

Figure 4- Interaction between salinity and cultivar on APX activity. The salinity levels were 0 (■), 250 (▨) and 350 (■) mM NaCl.

تیمار شوری تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم APX در سطح یک درصد داشت. در واقع میزان فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد با افزایش سطح شوری (غلظت کلرید سدیم) تا سطح ۲۵۰ mM افزایش یافت اما پس از آن کاهش نشان داد (شکل ٤). میزان افزایش فعالیت آنزیم APX در سطح شوری ۲۵۰ mM و ۳۵۰mM نسبت به شاهد به ترتیب برابر ٤٨/٤٠ و ۲۷/۵۷ درصد بود (جدول ٤).

در این آزمایش مشخص شد که توده قندک با ۰/۹ میکرومول H_2O_2 در دقیقه بر میلی گرم پروتئین ($\mu mol\ H_2O_2$ min-1 mg-1 protein) در سطح شوری ۲۵۰ mM و توده سفیدک خط دار با

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]

۰/۲ در سطح شوری ۳۵۰ mM به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان APX بودند (جدول ٤ و شکل ٤).

بحث

تحت شرایط نامساعد محیطی، تعداد زیادی رادیکال آزاد اکسیژن در سلول‌های گیاهی تجمع می‌یابند و باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و در نهایت منجر به کاهش رشد و حتی در موارد شدیدتر مرگ گیاه می‌شود. گیاهان در مقابل این شرایط به وسیله دو سامانه آنزیمی و غیرآنزیمی می‌توانند ROS را تخریب کنند. سامانه‌های غیرآنزیمی شامل آنتی اکسیدان‌هایی از قبیل گلوتاتیون (GSH)، آسکوربیک اسید (Ascorbic acid) ASA))، فلاونوئید و سامانه آنزیمی شامل آنزیم‌های آنتی اکسیدانت از قبیل آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) است. پراکسید هیدروژن به صورت طبیعی اغلب از زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی و بعضی از واکنش‌های آنزیمی در کلروپلاست گیاهان ایجاد می‌شود (Liu et al., 2013). عدم تعادل بین تولید و تخریب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) باعث تجمع آن در سلول‌ها می‌شود و نقاط کلیدی سوخت وساز و سازوکارهای دفاعی سلول را مورد حمله قرار می‌دهد؛ در نتیجه این امر تنش اکسیداتیو در سلول شدت بیشتری می‌یابد (Esfandiari et al, 2007). APX یک آنزیم کلیدی در سامانه مهار آنزیمی ROS است که می‌تواند H_2O_2 تولید شده در کلروپلاست‌ها را از بین ببرد (Shen et al, 1997). تنش شوری موجب ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی و تجمع پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در پاسخ به تنش می‌شود (Blokina et al, 2001).

فعالیت APX در بسیاری از گیاهان مانند گندم (Sairam et al, 2004)، پنبه (Gooset et al., 1994)، برنج (Morita et al, 1999) برگ‌های آرابیدوپسیس و کلزا (Chai et al, 2001) در معرض تنش شوری افزایش می‌یابد. گمان می‌رود که یک واکنش دفاعی برای تحمل به شوری به گیاه کمک می‌کند. بنابراین افزایش فعالیت ژن APX می‌تواند باعث تحمل و زنده ماندن گیاه تحت تنش شوری شود. در این پژوهش بیان ژن Cm APX در سه توده خربزه بومی سیستان تحت تنش شوری نشان داد که این گیاه در چنین شرایطی برای تخریب H_2O_2 ایجاد شده در سلول‌های گیاهی سامانه آنزیمی خود را فعال نموده و در نتیجه بیان ژن Cm APX افزایش می‌یابد. طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق در سطح شوری ۲۵۰mM افزایش بیان ژن Cm APX در هر سه توده مورد بررسی به بالاترین حد رسید و با افزایش شوری از این مقدار، افزایش کمتری در میزان بیان آن مشاهده شد که با نتایج محققان دیگرمطابقت داشت (Esfandiari et al, 2007; Kazemi et al, 2011). در توده سفیدک خط دار این کاهش میزان بیان ژن Cm APX به پایین‌تر از میزان بیان این ژن در نمونه کنترل رسید که این می‌تواند دلیل بر حساس بودن این توده به شوری بیشتر از ۲۵۰mM باشد.

بدیهی است، تحقیقات بیشتری برای نشان دادن چگونگی سازوکار افزایش بیان ژن APX تحت تنش شوری مورد نیاز است. پژوهش‌های گذشته نیز نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم APX به‌شدت به بیان ژن APX وابسته است و می‌تواند بعد از تیمار با عوامل تنش زا افزایش یابد؛ از قبیل حمله پاتوژن، فشار مکانیکی، جراحت، تشعشع UVB (Rao et al, 1996)، خشکی (Mittler and Zilinskas, 1994). استرس شوری (Lopez et al, 1996; Mittova et al, 2004 a,b; Gomez et al, 2004)، افزایش تحریک انرژی (Karpinski et al, 1997; Yoshimura et al, 2000)، همچنین کاهش یا افزایش دما، افزایش اکسیژن بعد از یک دوره کاهش آن (Blokhina et al, 2001). برای مثال فعالیت APX در برگ ارقام نخود فرنگی تحت تنش شوری افزایش یافت (Hernandez et al, 2001). همچنین بیان ژن APX در *Betula platyphylla* به صورت قابل ملاحظه‌ای بعد از تیمار با شوری (NaCl) افزایش یافت (Wang et al, 2009). بیان ژن APX در سیب زمینی شیرین پس از جراحت برای مدت زمان طولانی افزایش یافت (Park et al, 2004). خشکی همراه با افزایش دما بیان ژن APX را در *Anthurium. andraeanum* به اوج خود رساند (Koussevitzky et al, 2008) و همچنین شوری همراه با کاهش دما بیان ژن APX را در *A. andraeanum* افزایش داد (Liu et al, 2013). در این تحقیق روند بیان ژن Cm APX در توده‌های

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]

مورد بررسی با روند فعالیت این آنزیم مشابه بود، به‌طوری‌که بیشترین فعالیت آنزیم APX با بیشترین میزان بیان آن همخوانی داشت. در سه توده مورد بررسی مطابق آنچه در جدول چهار ارائه شده با افزایش بیان ژن Cm APX تا سطح شوری ۲۵۰mM فعالیت آنزیم APX نیز افزایش یافته است (شکل ٤) و سپس در پی افزایش بیان این ژن در شوری ۳۵۰mM فعالیت آنزیم APX نیز کاهش می‌یابد.

نتیجه گیری

طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش، افزایش بیان ژن Cm APX در توده قندک به همراه افزایش فعالیت آنزیمی در سطح شوری ۲۵۰mM، نشان داد که این توده بهتر توانست شرایط تنش شوری را تحمل نماید و کاهش بیان این ژن در توده سفیدک خط دار به همراه کاهش فعالیت آنزیمی آن نشان دهنده حساسیت این توده به شرایط تنش شوری است. بیان ژن Cm APX و همچنین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)، در سطح شوری ۳۵۰ mM در همه توده ها کاهش یافت. در این سطح شوری، بیان ژن Cm APX در توده سفیدک خط دار به صورت معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل کاهش نشان داد. در ادامه این پژوهش می‌توان دیگر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین ارتباط آنها با هم در توده‌های خربزه بومی سیستان مورد بررسی قرار گیرد، همچنین می‌توان تغییرهای این ژن در دیگر توده‌های حساس و مقاوم و در سایر سطوح شوری را نیز بررسی نمود.

منابع

Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N. 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl induced inactivation of photosystems I and II in Synechococcus sp. Plant Physiology, 123(3): 1047-1056.

Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. Physiologica Plantarum, 85: 235–241.

Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer CH, Mullineaux PM (eds) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 77–104.

Azevedo Neto AD, Prico JT, Eneas-Filho J, Braga de Abreu CE, Gomes-Filho E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany, 56: 235–241.

Baure, D, Muller, H, Reich, J, Reich, H, Ahrenkiew, V, Warthoe, P and Strauss, M. 1993. Identification of differentially expressed Mrna specious by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucl Acide Res*, 21: 4272-4280.

Bian S, Jiang Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. Science Horticulturae., 120: 264-270.

Blokhina OB, Chirkova TV, Fagerstedt KV. 2001. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. Journal of Experimental Botany, 52: 1179–1190.

Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptation to environmental stresses. Plant Cell, 7(7): 1099-1111.

Bonifacio A, Martins MO, Ribeiro CW, Fontenele AV, Carvalho FE, Margis–Pinheiro M, Silveira JA .2011. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. Plant Cell Environ, 34:1705–1722.

Bressan R, Bohnert H, Zhu JK. 2009. Abiotic stress tolerance: from gene discovery in model organisms to crop improvement. Molecular Plant, 2:1–2.

Chai L, Wang JM, Fan Zy, Liu Zb, Li Xf, Yang Y. 2001. Ascorbate peroxidase gene from Brassica napus enhances salt and drought tolerances in *Arabidopsis thaliana*. African Journal of Biotechnology,10 (79): 18085-18091.

Chen Z, Gallie DR. 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomata movement. The Plant Cell, 16: 1143-1162.

Dabrowska, G, Kata, A and Goc, A. 2007. Chracteristics of the plant Ascorbate peroxidase family. Journal of Acta biologica cracoviensia Series Botanica, 49(1): 7–17.

Esfandiari E, Shakiba MR , Mahboob SA, Alyari, H, Firozabad M. 2007. Effect of water stress on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation of wheat seedlings. Agriculture Science, 19(2): 130-138.

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

Ghorbanli1 M, Ahmadi F, Monfared A, Bakhshi

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]

Khaniki GH. 2012. Effect of salt stress and its interaction with ascorbate on catalase, ascorbate peroxidase activity, proline and malondialdehyde in *Cuminum cyminum* L.four weeks after germination. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28 (1): 14-27.

Gomez JM, Jimenez A, Olmos E, Sevilla F. 2004. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. Journal of Experimental Botany, 55: 119–130.

Gosset DR, Millhollon EP, Lucas MC. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt–tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. Crop Science. 34, 106–714.

Hajiboland R. 2012. Effect of micronutrient deficiencies on plants stress responses. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds) Abiotic stress responses in plants. Springer: 283–329.

Hasanuzzaman H, Nahar K, Alam MM, Fujita M. 2012. Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat *(Triticum aestivum)* seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase system. Australian Journal of Crop Science. 6 (8): 1314-1323.

Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, Río LA, 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants.Plant Science., 105 (2):151-167.

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

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

Karpinski S, Escobar C, Karpinski AB, Creissen G, Mulineaux PM. 1997. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress. The Plant Cell, 9: 627–640.

Koca H, Bor M, Ozdemir F, Turkan I. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Environmental and Experimental Botany, 60(3): 344-351.

Kosova K, Vítamvas P, Urban MO, Prasil IT. 2013. Plant proteome responses to salinity stress comparison of glycophytes and halophytes. Functional Plant Biology, 40:775–786.

Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev VA, Mittler R. 2008. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. Biological Chemistry, 283:34197-342.

Lievens, S, Goormaching, S and 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.

Liu HC, Tian DQ, Liu JX, Ma GY, Zou QC, Zhu ZJ. 2013. Cloning and functional analysis of a novel ascorbate peroxidase (APX) gene from *Anthurium andraeanum*. Zhejiang University Science, 14 (12): 1110-1120.

Lopez F, Vansuy tG, Casse-Delbart TF, Fourcrot P. 1996. Ascorbate peroxidase activity, not the mRNA level, is enhanced in salt-stressed *Raphanus sativus* plants. Plant Physiology, 97: 13–20.

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

Mishra A, Jha B. 2011. Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. Botanica Marina, 54:195–199.

Mittler R, Zilinskas BA. 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. The Plant Journal, 5: 397–405.

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

Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M. 2004a. 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.

Mittova V, Theodoulou FL, Kiddle G, Volokita M, Tal M, Foyer CH, Guy M. 2004b. Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, L. pennellii – role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. Plant, Cell and Environment, 27: 237–250.

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

Morita S, Kaminaka H, Masumura T, Tanaka K. 1999. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative signaling, Plant and Cell Physiology, 40: 417–22.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]

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

Panchuk II, Zentgraf U, Volkov RA. 2005. Expression of the APX gene family during leaf senescence of Arabidopsis thaliana. Planta, 222: 926–932.

Park SY, Ryu SH, Jang IC, Kwon SY, Kim JG, Kwak SS. 2004. Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweetpotato and its expression in response to stress. Molecular Genetics and Genomics, 271: 339–346.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. Nucleic Acids Research, 30:36-46.

Pfaffl MW. 2007. Relative quantification in: Real-time PCR, Dorak MT (ed). Taylor and Francis Group, UK.

Rao MV, Paliyath G, Ormerod DP. 1996. Ultraviolet-B-andozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of Arabidopsis thaliana. Plant Physiology, 110:125–136.

Razavi, K, Mohsen-zadeh, S and Malbiibi, M. A. 2001. molecular aspects of osmotic stresses. International Symposium on prospect of saline agriculture in the GCC countries, *18-20th of March, Dobai*.Sairam RK, Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science, 86 (3). pp. 407-421.

Sharma D, Rawat I, Goel HG. 2012. Antioxidant and prebiotial of some cucurbits. Research Journal of Medicinal Plant. 6 (7): 500-510.

Shen WB, Huang LQ, Xu LL. 1997. Ascorbate peroxidase in plants. Chemistry of Life, 17(5):24-26.

Singh N, Mishra A, Jha B. 2013. Over-expression of the peroximal ascorbate peroxidase (SbpAPX) gene cloned frome halophyte Salicorina brachiate confers salt and drough stress tolerance in transgenetic Tabacco. Marine Biotechnology. 6 (7): 500-510.

Tewari RK, Hadacek F, Sassmann S, Lang I. 2013. Iron deprivation-induced reactive oxygen species generation leads to non-autolytic PCD in *Brassica napus* leaves. Environmental and Experimental Botany, 91:74–83.

Tsuji N, Kamagata C, Furuya M, Kobayashi D, Yagihashi A, Morita T. 2002. Selection of an internal control gene for quantitation of mRNA in colonic tissues. Anticancer Research, 22: 4173-8.

Wang C, Yang CP, Wang YC. 2009. Cloning and expression analysis of an APX gene from *Betula platyphylla*. Journal of North-East Forestry University, 37(3):79-81.

Wang J, Zeng Q, Zhu J, Liu G, Tang H. 2013. Dissimilarity of ascorbate–glutathione (AsA–GSH) cycle mechanism in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under experimental free-air ozone exposure. Agricalture Ecosystems and Environment, 165:39–49.

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

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

Yong Z, Hao-Ru T, Ya L. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawbreey cultivars with short-term low temperature stress. Journal of Agricultural Sciences, 4: 456-462.

Yoshimura K, Yabuta Y, Ishkawa T, Shigeoka S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase. Plant Physiology, 123: 223–233.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.7.3]