Razi University

Cereal Biotechnology and Biochemistry

Online ISSN: 2783-5170

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Superoxide Dismutase Enzyme Expression in Root and Shoot of Triticale Seedlings under Drought Stress Conditions

Armin Saed-Moucheshi [1]✉ & Hooshmand Safari [2]

[1]✉ Reseach Assistnt Profesosr, Department of Crop and Horticulture Reseach, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran. E-mail: saedmoocheshi@gmail.com

[2] Assistant Professor, Forests and Rangelands Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran. E-mail: hooshmand.safari@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Triticale (X. Triticosecale Wittmack) was created by doubling the number of F1 hybrid chromosomes between wheat (Triticum spp.) as the female parent and rye (Secale spp.) as the male parent. Investigation of the plants reaction to water shortage is systematically considered by identifying features that are related to drought tolerance subjected to the physiological, cellular, biochemical, and molecular bases. One of the main subjects regarding plants damage under drought stress is the accumulation of reactive oxygen species. Plants possess enzymatic and non-enzymatic systems to prevent oxygen free radical damage which are using them in an adaptive way under drought stress condition. Changes in the expressional level of antioxidant enzymes and the concentration of these enzymes, as well as increasing their activity, are among the very important changes occurring in the cellular level as the result of facing drought stress. Considering the role of the superoxide dismutase enzyme in regulating the amount of oxygen free radicals in plant cells, the aim of the present study was to investigate the gene expression of the superoxide dismutase enzyme with copper/zinc coenzyme under drought stress conditions.

Materials and methods: Two genotypes of triticale (sensitive and tolerant) were subjected to drought stress conditions after establishment, and their aerial parts and roots were sampled at 0, 12, 36, and 72 hours after applying drought stress. Drought treatment was applied by weight based on the soil capacity of the pots and by daily weighing of the pots. Each time point repeated three times where the plant shoot was samples prior to plant root. This experiment was carried out in a factorial manner and with a completely randomized design in the greenhouse. The expression level of the superoxide dismutase gene with copper/zinc coenzyme was measured in the samples using the quantitative PCR method.

Results: The results of the present study showed that the expression of the Cu/Zn-SOD gene is affected and changed under stress conditions. In general,, with the increase in the amount of stress severity and time of stress, the amount of immediate gene expression increased. The changes in the expression of this gene were greater in the shoots than in the roots, and the shoots responded faster to drought stress. Also, between the two sensitive and tolerant genotypes used in this experiment, the level of Cu/Zn-SOD gene expression in both roots and shoots was higher in the tolerant genotype than in the sensitive triticale genotype.

Conclusion: According to the changes in expression and amount in two sensitive and tolerant triticale genotypes, it was generally determined that the superoxide dismutase enzyme is an essential enzyme in the plant to respond to drought stress and also to create tolerance in the triticale plant. Also, according to the changes in gene expression related to the Cu/Zn-SOD isozyme in triticale, it was determined that this isozyme is probably one of the active isozymes of the superoxide dismutase enzyme, whose expression is increased under drought stress conditions.

Keywords: Abiotic Stress, Antioxidant, Electrophoresis, Primer Design, Gene expression.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 10/11/2022, Revised: 23/11/2022, Accepted: 01/12/2022, Published online: 26/12/2022

Cite this article: Saed-Moucheshi, A., & Safari, H. (2022). Superoxide Dismutase Enzyme Expression in Root and Shoot of Triticale Seedlings under Drought Stress Conditions. Cereal Biotechnology and Biochemistry. 1 (4). 481-495. DOI: 10.22126/cbb.2023.8680.1033

© The Author(s).

Publisher: Razi University

10.22126/cbb.2023.8680.1033

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

بیان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در ریشه و اندام هوایی گیاهچه تریتیکاله در شرایط تنش خشکی

آرمین ساعدموچشی [۱] ✉ و هوشمند صفری [۲]

[۱] ✉ استادیار پژوهش بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: saedmoocheshi@gmail.com

[۲] استادیار، بخش تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: hooshmand.safari@gmail.com

چکیده

مقدمه: تریتیکاله (*X. Triticosecale* Wittmack) به‌وسیله دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های هیبرید (F1) بین گندم (*Triticum spp.*) به‌عنوان والد مادری و چاودار (*Secale spp.*) به‌عنوان والد پدری ایجاد شده است. با توجه به جد پدری تریتیکاله، انتظار می‌رود که این گیاه نسبت به گندم مقاومت بیشتری به تنش‌های محیطی داشته باشد. یکی از عوامل اصلی خسارت به گیاهان در شرایط تنش خشکی تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است. گیاهان دارای سیستم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی برای جلوگیری از خسارت رادیکال‌های آزاد اکسیژن و به دنبال آن سازگاری با تنش خشکی هستند. تغییر در مقدار بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و غلظت این آنزیم‌ها و همچنین افزایش فعالیت آن‌ها از جمله تغییرات بسیار مهمی است که در سلول بر اثر تنش خشکی و سایر تنش‌های غیر زیستی ایجاد می‌گردد. با توجه به نقش آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تنظیم مقدار رادیکال آزاد اکسیژن در سلول، مطالعه پیش رو با هدف بررسی میزان بیان ژن مربوط به آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با کوآنزیم مس/روی تحت شرایط تنش خشکی بود.

مواد و روش‌ها: دو ژنوتیپ حساس و متحمل به خشکی تریتیکاله پس از استقرار تحت تنش خشکی قرار گرفته و از اندام‌های هوایی و ریشه آنها در بازه زمانی ۰، ۱۲، ۳۶ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تنش خشکی نمونه برداری گردید. با توجه به اینکه نمونه برداری به صورت تخریبی بود، برای هر زمان سه تکرار جداگانه در نظر گرفته شد. همچنین نمونه برداری از اندام هوایی گیاه پیشتر از نمونه برداری از ریشه انجام شد. تیمار خشکی به صورت وزنی بر اساس ظرفیت مزرعه خاک گلدان‌ها و با توزین روزانه گلدان‌ها اعمال گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل و با طرح پایه کاملاً تصادفی در گلخانه انجام گرفت. میزان بیان ژن سوپراکسیددیسموتاز با کوآنزیم مس/روی در نمونه‌ها با استفاده از روش PCR کمی اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان ژن Cu/Zn-SOD در شرایط تنش تحت تاثیر قرار گرفته و تغییر می‌کند. به طور کلی با افزایش میزان تنش و زمان تنش مقدار بیان آنی ژن افزایش پیدا کرد. میزان تغییرات بیان این ژن در اندام هوایی نسبت به ریشه بیش‌تر بود و اندام هوایی سریع‌تر به تنش خشکی پاسخ داد. همچنین بین دو ژنوتیپ حساس و متحمل مورد استفاده در این آزمایش، میزان بیان ژن Cu/Zn-SOD هم در ریشه و هم در اندام هوایی در ژنوتیپ متحمل بالاتر از ژنوتیپ حساس تریتیکاله بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به تغییرات بیان و مقدار در دو ژنوتیپ حساس و محتمل تریتیکاله مشخص شد که آنزیم سوپراکسیددیسموتاز یک آنزیم اساسی برای پاسخ به تنش خشکی و همچنین ایجاد تحمل در گیاه تریتیکاله است. همچنین با توجه به تغییرات بیان ژن مربوط به آیزوزایم Cu/Zn-SOD در تریتیکاله، مشخص گردید که احتمالاً این آیزوزایم یکی از آیزوزایم‌های فعال آنزیم سوپراکسیددیسموتاز است که در شرایط تنش خشکی بیان آن افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، الکتروفورز، طراحی پرایمر، تنش غیرزیستی، بیان ژن.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۹ **اصلاح:** ۱۴۰۱/۰۹/۰۲ **پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۹/۱۰، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۱/۱۰/۰۵

استناد: ساعدموچشی ، آ. و صفری ، ه. (۱۴۰۱). بیان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در ریشه و اندام هوایی گیاهچه تریتیکاله در شرایط تنش خشکی. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات. ۱ (۴). ۴۹۵-۴۸۱. DOI: 10.22126/cbb.2023.8680.1033

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

CC BY NC

مقدمه

در میان گیاهان زراعی، غلات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار ند و بیشترین تولید و سطح زیر ک شت را در مقای سه با سایر گیاهان زراعی در دنیا دارا می‌باشند. عوامل مختلفی همچون سازگاری به شرایط آب و هوایی مخت لف، سهولت ح مل و ن قل، نگ هداری آ سان و عمل کرد ن سبتاً مط لوب، غلات را به‌عنوان یک منبع غذایی عمده برای ان سان ت بدیل ن موده است (Blum, 2006). همچنین کشت غلات ج هت تأمین خوراک دام نیز، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار ا ست (Moore *et al.*, 1995). در بسیاری از کشورهای آسیایی و آفریقایی، بیش از ۸۰ در صد غذای مردم از غلات تأمین می گردد. نزدیک به ۷۰ درصد سطح زیر کشت یک میل یارد هک تاری جهان را غلات اشغال نموده‌اند. تقریباً نیمی از کل نیاز های غذایی انسان به ویژه در آسیا به طور مستقیم از غلات تأمین می گردد. همچ نین تول ید غلات در مقای سه با دی گر فرآورده‌های غذایی از جمله گوشت، تخم مرغ، شیر و غ یره بسیار بیشتر است (Chen *et al.*, 2019).

تریتیکاله‌های اولیه با وجود دارا بودن پروتئین و ل یزین بالا، به‌علت عملکرد پایین و چروکیده شدن دانه و حسا سیت به ارگوت[1]، دارای قابلیت رقابت با گندم نان نبوده و به ه مین دلیل جایگاه خود را در جیرهٔ غذای خوک و ماکیان از د ست دادند. ارقام تریتیکاله معرفی شده در سال‌های اخ یر از ن ظر بسیاری از صفات زراعی، اصلاح شده و دارای صفات مطلوبی همچون عملکرد بالا، مقاومت ورس و ارگوت، بذر درشت و از نظر میزان لیزین، بیشتر از سایر غلات می‌باشند و در شرایط تنش‌های محیطی نظیر خشکی و شوری خاک بر تری قا بل ملاح ظه‌ای دار ند (Serna-Saldivar *et al.*, 2004). ا ین گونه جدید، موفق‌ترین غله ساخت بشر است و هدف از ایجاد آن، ترکیب صفات مطلوب دو گونه والدی بوده است که ا ین صفات شامل قابلیت تول ید بالا، سازگاری و سیع و صفات مطلوب دانه از گندم و تحمل به تنش‌های زنده و غیرز نده از چاودار است. طبق نظر اولین دانشمندان، تریتیکا له بای ستی ترکیبی از بهترین خصوصیات هر دو والد نظیر کیفیت گندم جهت تهی یه فرآورده های غذایی و ا ستقامت چاودار برای سازگاری در خاک‌های سخت، تحمل خ شکی، مقاو مت به سرما، مقاومت به بیماری ها و احتیا جات غذایی کم را دارا باشد. ارقام جدید تریتیکاله، دارای خصوصیات بهترین ار قام گندم نان ه ستند (CIMMYT, 2004). در حالی که در انواع خاک‌ها ن یز ن سبت به به ترین ار قام گ ندم عمل کرد بیشتری نیز دارند. پژوهش های اول یه در مورد تریتیکا له بیشتردر ژاپن، اروپا و آمری کا ان جام شده ا ست (Oettler, 2005).

برر سی وا کنش گیا هان به کم بود آب با ت شخیص سیستماتیک صفاتی که با تح مل خ شکی ارت باط دار ند و سپس تحل یل م بانی فیزیولوژ یک، سلولی، بیو شیمیایی و مولکولی این صفات انجام می‌گیرد. مقاومت به خ شکی یک صفت ساده و منحصر به فرد نیست، بلکه یک صفت ک می و

[1] *Claviceps purpurea*

پیچیده با جنبه‌های مختلف می‌باشد که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می شود (Ahmadi *et al.*, 2010). مطالعات نشان داده‌اند که تنش خشکی می‌تواند به تنش اکسیداتیو منجر شود و ضمن افزایش میزان اکسیژن فعال، باعث آسیب اکسیداتیو شدید، از بین رفتن غشاء، تجزیه و تخریب پروتئین، آسیب به اسیدهای نوکلئیک و مختل شدن فرآیندهای متابولیک شود (Noctor *et al.*, 2014). در این شرایط روزنه‌ها بسته شده و کاهش سرعت فتوسنتز و رشد گیاه صورت می‌گیرد. بسته شدن روزنه‌ها باعث کاهش غلظت دی اکسیدکربن در بافت مزوفیلی برگ و در نتیجه آن افزایش تجمع NADPH می شود. در چنین شرایطی مقدار محدودی NADP برای پذیرش الکترون وجود خواهد داشت. این در حالی است که واکنش نوری و انتقال الکترون در مقادیر طبیعی خود صورت می‌گیرد. این شرایط در روزهای آفتابی که حداکثر تشعشع وجود دارد شدت می‌یابد. بنابراین اکسیژن می‌توانند به‌عنوان یک گیرنده الکترون جایگزین NADP گردد (Velikova *et al.*, 2000)، و منجر به تجمع گونه‌های سمی اکسیژن (ROS[2]) مانند سوپر اکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و هیدروکسیل (OH) شود. از میان گونه‌های فعال اکسیژن، پراکسید هیدروژن دارای طول عمر و خسارت‌زایی بیش‌تر می‌باشد (Velikova *et al.*, 2000). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن که در طی تنش تولید می‌شوند، باعث خسارت به بسیاری از ترکیبات سلولی از جمله DNA، پروتئین، چربی، کلروفیل و از همه مهم‌تر غشای سلولی و در نهایت مرگ سلول می شود (Ghozlene *et al.*, 2014). گیاهان دارای سیستم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی برای جلوگیری از خسارت رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در پی آن سازگاری با تنش خشکی هستند. تغییر در مقدار بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و غلظت این آنزیم ها و همچنین افزایش فعالیت آن ها از جمله تغییرات بسیار مهمی است که در سلول بر اثر تنش خشکی و سایر تنش‌های غیر زیستی ایجاد می گردد. این تغییرات در پاسخ به تنش اکسیداتیو که نتیجه شرایط تنش‌زا است بروز می‌کنند (Saed-Moucheshi *et al.*, 2021).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند SOD، CAT، APX، POD، GR و MDHAR به طور قابل ملاحظه‌ای سطح سوپراکسید و پراکسید هیدروژن را در گیاهان کاهش می‌دهند. سوپراکسید دیسموتاز باعث تبدیل O_2^- به اکسیژن مولکولی و H_2O_2 می شود (Saed-Moucheshi *et al.*, 2014). سوپراکسید دیسموتاز یکی از مهم‌ترین آنزیم های مورد استفاده در برابر تنش اکسیداتیو در سیستم دفاع گیاهی است و در همه سلول‌های هر نوع گیاهی موجود است. از آنجایی که SOD ها متالوپروتئین های متخلخل هستند، دارای ایزوفرم‌های مختلف می‌باشند. بر اساس انواع فلز موجود در سایت‌های فعال آن ها می توان این آنتی‌اکسیدان‌ها را تقسیم بندی نمود. شایع ترین

[2] Reactive Oxygen Species

ایزوفرم های شناخته شده SOD شامل مس-روی سوپراکسید دیسموتاز (Cu / Zn-SOD)، منگنز (Mn-SOD)، آهن (Fe-SOD) و نیکل (Ni-SOD) می‌باشد (Ghozlene *et al.*, 2014). افزایش بیان SOD در سلول‌های گیاهی در واکنش به محیط های مختلف تنش نشان دهنده نقش مهم آن در سازوکار دفاع گیاهان است. شرایط تنش‌زا به‌طور کلی فعالیت های SOD را افزایش می‌دهد تا رادیکال‌های سوپراکسید را از بین ببرد. با توجه به مطالب ذکر شده هدف از مطالعه حاضر بررسی نحوه تغییرات بیان ژن‌های مربوط به آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با کوآنزیم مس-روی در پاسخ به تنش خشکی در دو ژنوتیپ تریتیکاله بود.

مواد و روش‌ها

با استفاده از نتایج به دست آمده از مقایسه ژنوتیپ های تریتیکاله با اندازه‌گیری صفات در دو شرایط نرمال و تنش و همچنین شاخص‌های اندازه‌گیری شده مهم در آزمایشات قبلی (Saed-Moucheshi *et al.*, 2019)، دو ژنوتیپ حساس و متحمل تریتیکاله (ژنوتیپ های ۱: ELTCC-1 و ۵۳: ET-92-18) در این آزمایش گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش به صورت آزمایش فاکتوریل دو عاملی شامل فاکتور ژنوتیپ (دو ژنوتیپ تریتیکاله) و فاکتور تنش خشکی در سطح شاهد و سه سطح ۱۲، ۳۶ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش با سه تکرار انجام شد. در تیمار بدون تنش خشکی آبیاری کامل با نگهداری سطح آب گلدان‌ها در سطح ظرفیت مزرعه اعمال شد. معیار تنش برای تیمار های تنش خشکی ۶۰ درصد ظرفیت مزرعه در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری مربوط به این تیمارها بر اساس ۱۲، ۳۶ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تنش بود. به دلیل تخریبی بودن نمونه‌برداری، برای هر یک زمان های نمونه‌برداری پس از تنش از سه تکرار مجزا استفاده شد. بذرهای هر دو ژنوتیپ در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط کنترل شده‌ی گلخانه‌ای کشت گردیدند. بعد از سبز شدن بذرها و استقرار گیاهچه ها در گلدان‌های پلاستیکی در مرحله دو برگی، تنش مورد نظر اعمال شد. اعمال تیمارها به صورت وزنی و بر اساس وزن کردن روزانه گلدان‌ها بود.

پس از نمونه‌برداری از بافت‌های جوان گیاهی در زمان های مورد نظر، بافت‌های گیاهی بلافاصله با نیتروژن مایع منجمد شده و به دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند. استخراج RNA از بافت برگی و جوان‌ترین برگ‌های گیاهان انجام شد. جهت استخراج RNA از کیت استخراج تولید شرکت دنازیست استفاده شد. جهت بررسی کیفیت RNA مقدار ۳ میکرولیتر از RNA استخراج شده از نمونه های مربوطه روی ژل یک در صد در بافر TBE ۰/۵ برای الکتروفورز ریخته شد. همچنین غلظت RNA با استفاده از روش نانودراپ تعیین شد و در صورت مناسب بودن برای بررسی بیان مورد استفاده قرار گرفت. از تیمار DNase برای حذف آلودگی‌های ژنومی در RNA استخراج شده استفاده

شد. بدین منظور با استفاده از کیت فرمنتاز، تیمار DNase انجام شد و باندهای مجزای RNA مشاهده شد. برای اطمینان از عدم وجود آلودگی ژنومی، با نمونه های تیمار شده آغازگرهای اختصاصی بررسی بیان ژن‌ها SOD توسط PCR انجام شد. از آنجا که هیچ باند اضافه‌ای ناشی از آلودگی‌های ژنومی مشاهده نشد، مشخص شد که نمونه ها دارای آلودگی ژنومی DNA نیستند. پس از تایید کیفیت و کمیت مناسب RNAهای استخراج شده، سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز انجام شد. به‌منظور اطمینان از درست انجام شدن عمل سنتز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده (جدول ۱) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر کلیه قطعات ژنی مورد نظر انجام شد. سپس محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکترو فورز شد و با استفاده از قطعات cDNA مشاهده شده در این واکنش از صحت سنتز اطمینان حاصل شد.

جدول ۱- توالی مربوط به پرایمرهای ژن کنترل داخلی (فاکتور رونویسی EF1) و ژن‌های SOD مورد بررسی در ژنوتیپ‌های تریتیکاله

Table 1. The sequence of internal control gene primers (EF1 transcription factor) and SOD genes examined in triticale genotypes

F 5’ CTCCATGAGTTCGGTGACAT 3’	CuZn-SOD
R 5’ GACGGACTTCATCTTCTGGT 3’	CuZn-SOD
F 5’ CACTGGTCTGACAACTGAGG 3’	Elongation Factor1
R 5’ GCAACATTCTTGACATTGAAGC 3’	Elongation Factor1

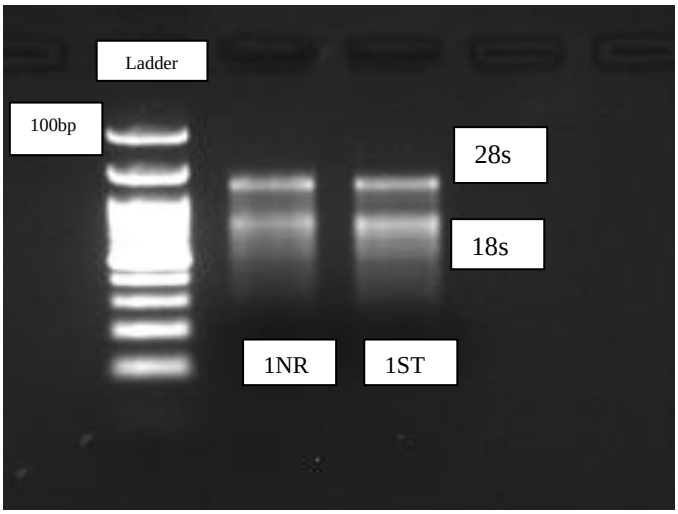
به‌منظور بررسی الگوی بیان این ژن ها از روش RT-PCR کمی استفاده شد. برای برآورد مقدار بیان نسبی ژن های مورد بررسی در این پژوهش با توجه به فاکتور ژنوتیپ و تیمار خشکی، از عدد Ct مربوط به خروجی نرم‌افزار کاربردی معرفی شده توسط شرکت سازنده دستگاه (StepOne Software v2.3) استفاده گردید. پس از به دست آوردن این عدد (Ct) برای ژن های SOD و کنترل داخلی EF1، مقدار عدد Ct مربوط به ژن Cu/Zn-SOD در هر ژنوتیپ به صورت جداگانه بر اساس مقدار Ct مربوط به ژن کنترل داخلی EF1 خود استاندارد گردیده و در نهایت تبدیل به مقدار بیان نسبی گردید.

پس از محاسبه مقدار بیان نسبی برای ژن سوپراکسیددیسموتاز برای هر تکرار، در نهایت میانگین میزان نسبی بیان و مقدار خطای استاندارد برای هر تیمار تعیین گردید. از روش تجزیه واریانس دو عامله فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی برای تحلیل داده‌ها استفاده شد.

مقایسه میانگین نیز بر اساس روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای بررسی تغییرات مقدار بیان نسبی در پاسخ به زمان تنش از روش تجزیه اثر زمان تنش به معادلات خطی نرمال درجه اول و درجه دوم استفاده شد و معنی‌داری این دو مدل در سطح پنج درصد آزمون گردید.

نتایج

پس از نمونه‌گیری از اندام هوایی گیا هان در شرایط تنش خ شکی و شاهد بدون تنش، ا ستخراج RNA برای اندازه‌گیری مقدار ب یان ژن های SOD ان جام گر فت. ا بتدا کیف یت RNA های ا ستخراجی تو سط الکترو فورز مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که RNA های ا ستخراج شده از این نمونه‌ها روی ژل، الکترو فورز شدند. در صورت مناسب بودن کیفیت برای مراحل بعدی و بررسی بیان مورد ا ستفاده قرار گرفت ند. شکل ۱ ن شان ده نده کیف یت RNAهای استخراج شده از نمونه گیاهی مربوط به ژنوت یپ شماره ۱ تریتیکاله را نشان می‌دهد. بر این ا ساس، م شاهده باندهای ۱۸S rRNA و ۲۸S صحت انجام عمل ا ستخراج و کیفیت مناسب RNAها را مشخص نمود.

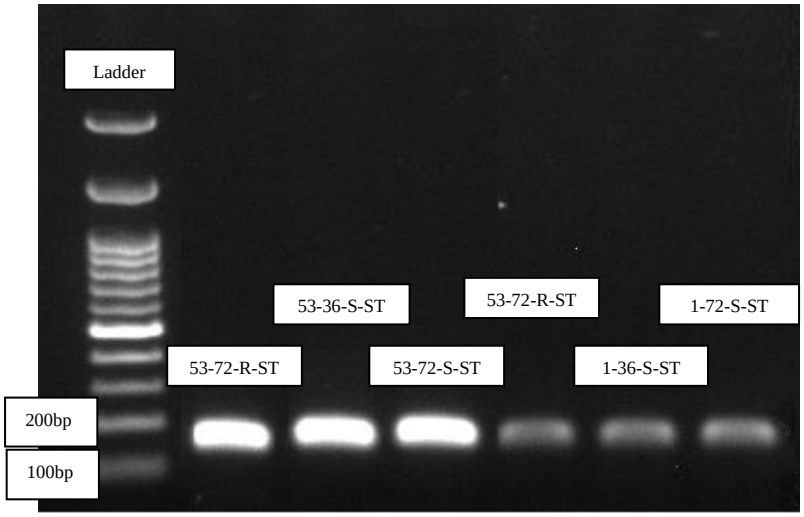


شکل ۱- الکتروفورز مربوط به rRNAهای 28s و 18s در نمونه‌های اندام هوایی ژنوتیپ شماره ۱ تریتیکاله در شرایط نرمال (1NR) و تنش خشکی (1ST).

Figure 1. Electrophoresis of 28s and 18s rRNAs in aerial samples of triticale genotype number 1 under normal conditions (1NR) and drought stress (1ST).

پس از تایید کیفیت RNA های ا ستخراجی، برای برر سی درست بودن توالی پرایمر های طرا حی شده و همچ نین بررسی کارایی این توالی ها، وا کنش زنج یره‌ای پلی مراز با استفاده از ا ین پرایمر ها ان جام شد. پس از ان جام PCR،

محصولات آن روی ژل آگارز الکترو فورز گردید ند. شکل ۲ نشان دهنده الکتروفورز محصولات PCR برای هر دو ژنوتیپ منتخب تریتیکاله در شرایط تنش خشکی است. ا ین شکل کارایی منا سب پرای مر طرا حی شده را به خوبی ن شان می‌دهد. علاوه بر آن، با توجه به روشنایی بیشتر رنگ مربوط به ژنوتیپ متحمل شماره ۵۳ مشخص شد که ا ین ژنوت یپ احتمالاً دارای مقدار بیان بی شتری از ژن Cu/Zn-SOD در شرایط تنش خشکی نسبت به ژنوتیپ حساس است.



شکل ۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن SOD در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی تریتیکاله به صورت جداگانه و در شرایط تنش خشکی در ریشه و اندام هوایی پس از ۳۶ و ۷۲ ساعت.

Figure 2. Polymerase chain reaction (PCR) using primers designed for the SOD gene in both studied genotypes of triticale separately and under drought stress conditions in roots and shoots after 36 and 72 hours.

در این شکل سه چاهک اول از سمت راست مربوط به ژنوتیپ حساس (شماره ۱) و سه چاهک دوم مربوط به ژنوتیپ متحمل تریتیکاله (شماره ۵۳) می‌باشد. در هر تکست باکس عدد اول شماره ژنوتیپ (۵۳ یا ۱)، عدد دوم ساعت پس از اعمال تنش (۳۶ یا ۷۲ ساعت)، حرف سوم نشان دهنده نمونه ریشه (R) یا اندام هوایی (S) و حروف چهارم نشان دهنده شرایط تنش خشکی (ST) است. همچنین طول هر توالی به صورت تقریبی برابر ۲۰۰ جفت باز است. نمونه مورد استفاده در این شکل از اندام هوایی بوده است.

پس از تایید صحت و کارایی پرایمرها از آن‌ها جهت برر سی کمی میزان بیان ژن Cu/Zn-SOD در دو ژنوتیپ تریتیکاله استفاده گردید. ن تایج جدول تجز یه وار یانس (جدول ۲) تحلیل کمی ب یان ژن ر مز کن نده Cu/Zn-SOD در ا ندام

هوایی نشان داد که بیان این ژن تحت اثر اصلی ژنوتیپ و تنش خشکی قرار گرفت، ولی اثر متقابل بین این دو معنی‌دار نشد. ژنوتیپ و اثر متقابل زمان در ژنوتیپ روی مقدار بیان ژن Cu/Zn-SOD در ریشه معنی‌دار بود، ولی اثر تنش خشکی معنی‌داری نبود.

جدول ۲- تحلیل واریانس دوطرفه به صورت آزمایش فاکتوریل برای داده‌های مقدار بیان نسبی ژن‌های SOD

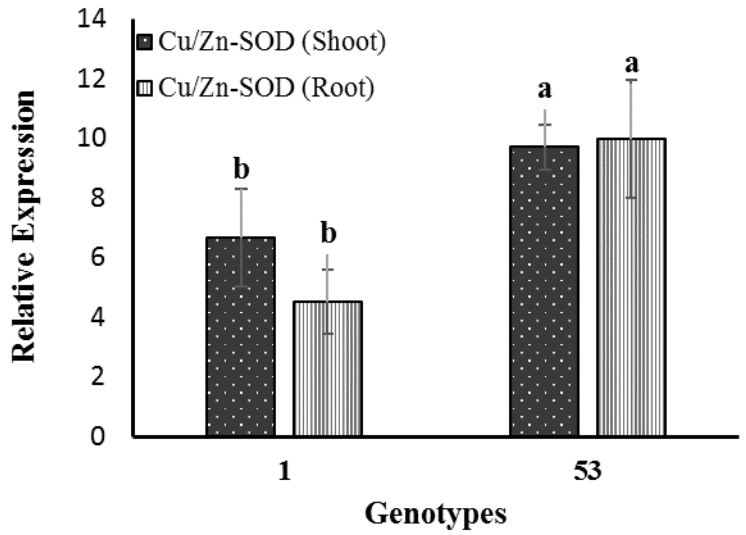
Table 2. Two-way analysis of variance as a factorial test for the relative expression value of SOD genes.

منبع S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean squares	
		اندام هوایی Aerial organ	ریشه Root
ژنوتیپ Genotype	1	41.41*	133.93*
تنش خشکی Drought stress	2	56.81**	31.78
ژنوتیپ × تنش خشکی Genotype× Drought stress	2	14.71	53.56*
خطا Error	12	7.72	16.16

** و * به ترتیب نشان دهنده میزان معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۵.

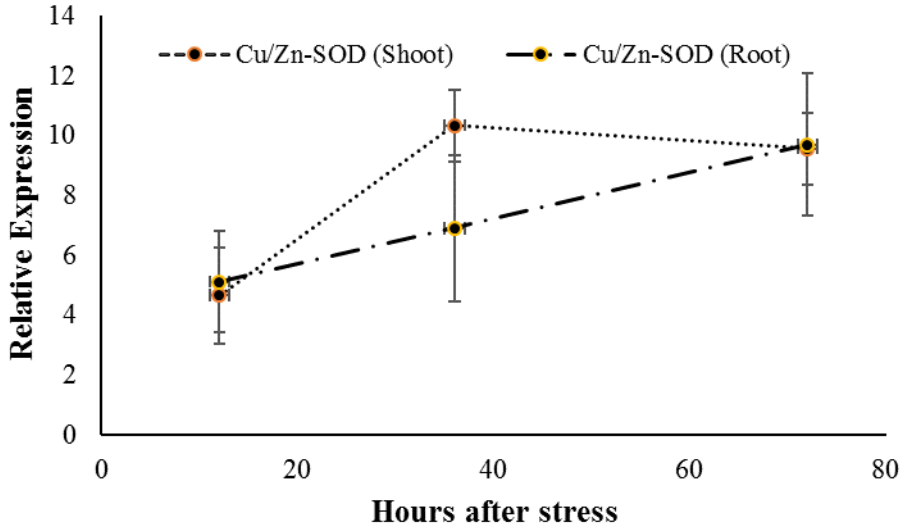
** and * indicate the of significance at the probability level of 0.01 and 0.05, respectively.

نتایج مقایسه میانگین بین دو ژنوتیپ متحمل (۵۳) و حساس (۱) به تنش تریتیکاله در شکل ۳ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که جدا از زمان نمونه‌برداری و زمان القای تیمار تنش خشکی، به طور کلی بین دو ژنوتیپ در ارتباط با ژن‌های SOD هم در ریشه و هم در اندام هوایی تفاوت معنی‌دار وجود دارد. در ژن SOD مقدار بیان در ژنوتیپ شماره ۵۳ هم در اندام هوایی و هم در ریشه به صورت معنی‌دار بیش‌تر از ژنوتیپ شماره ۱ بود. بررسی نحوه تغییر بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز در پاسخ به زمان نمونه‌برداری پس از اعمال تیمار خشکی نشان داد که تقریباً در همه حالات مقدار بیان افزایشی بوده است (شکل ۴). بنابراین با این شرایط می‌توان گفت که با گذشت زمان مقدار بیان هر دو ژن سوپراکسید دیسموتاز در اندام هوایی تریتیکاله افزایش می‌یابد. بررسی تغییرات در اندام ریشه نشان داد که به طور کلی ریشه تغییرات کمتری را در مقایسه با اندام هوایی نشان می‌دهد.



شکل ۳- مقایسه میانگین مقدار بیان نسبی ژن‌های SOD مربوط به ژنوتیپ های تریتیکاله انتخابی.

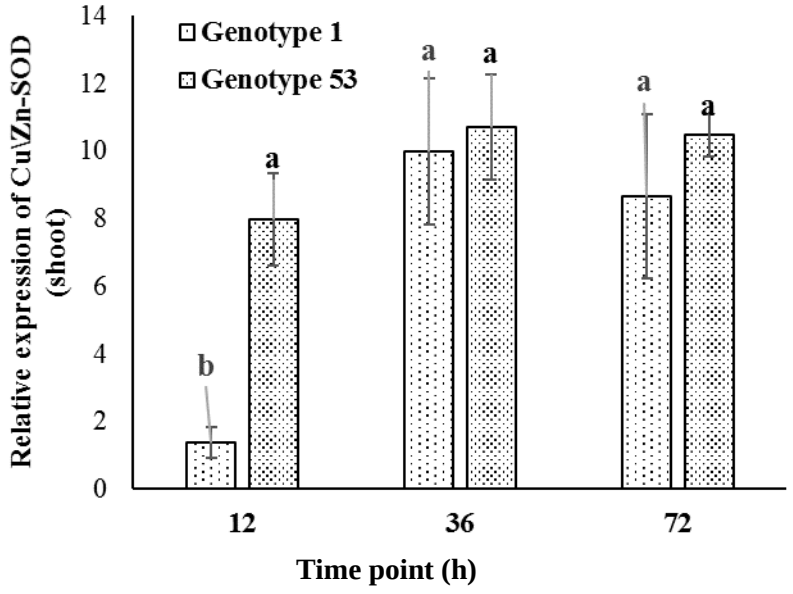
Figure 3. Comparison of the mean relative expression value of SOD genes related to selected triticale genotypes.



شکل ۴- تغییرات میزان بیان ژن Cu/Zn-SOD در پاسخ به زمان پس از اعمال تیمار

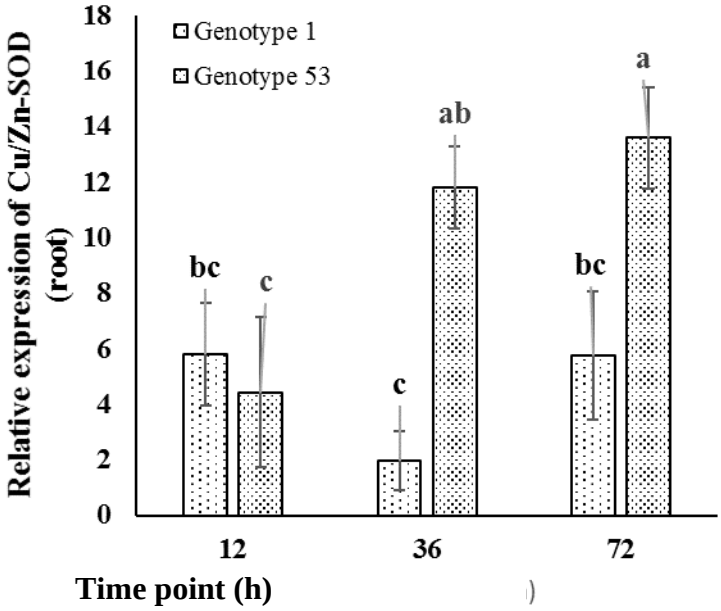
Figure 4- Changes in Cu/Zn-SOD gene expression in response to time after treatment

بررسی اثر متقابل زمان در ژنوتیپ روی بیان ژن Cu/Zn-SOD در اندام هوایی نشان داد که تفاوت معنی‌دار بین هر سه زمان نمونه‌برداری در ژنوتیپ شماره ۵۳ وجود نداشت، ولی در ژنوتیپ شماره ۱ بیان در ۱۲ ساعت نسبت به بیان در دو زمان دیگر به صورت معنی‌داری کم‌تر بود. مقدار بیان این ژن در ژنوتیپ ۵۳ بیش‌تر از ژنوتیپ ۱ در کلیه زمان ها بود (شکل ۵). بررسی اثر متقابل زمان نمونه‌برداری بعد از تنش و ژنوتیپ نیز نشان داد که در هر دو ژنوتیپ شماره ۱ و ۵۳ تریتیکاله در ارتباط با مقدار بیان ژن Cu/Zn-SOD در ریشه دارای تفاوت معنی‌دار بین هر سه زمان نمونه‌برداری در ژنوتیپ شماره ۱ نبود، ولی در ژنوتیپ شماره ۵۳ میزان بیان در ۱۲ ساعت با بیان در دو زمان دیگر اختلاف معنی‌داری نشان داده و از آن ها کم‌تر بود (شکل ۶). همچنین در زمان های ۳۶ و ۷۲ ساعت مقدار بیان ژن Cu/Zn-SOD در ژنوتیپ ۵۳ از ژنوتیپ ۱ بیش‌تر بود ولی در ۱۲ ساعت مقدار بیان در ژنوتیپ ۱ بیش‌تر بود.



شکل ۵- مقایسه میانگین مقدار بیان نسبی ژن Cu\Zn-SOD در اندام هوایی مربوط به ژنوتیپ‌های تریتیکاله انتخابی.

Figure 5. Comparison of the mean relative expression value of Cu\Zn-SOD gene in aerial parts of selected triticale genotypes.



شکل ۶- مقایسه میانگین مقدار بیان نسبی ژن Cu\Zn-SOD در ریشه مربوط به زمان‌های نمونه‌برداری پس از تنش.

Figure 6. Comparison of the mean relative expression value of the Cu\Zn-SOD gene in the root related to the sampling times after the stress.

بحث

نتایج این آزمایش نشان داد که تنش خشکی با عث ا فزایش میزان بیان ژن Cu/Zn-SOD هم در اندام هوایی و هم در ریشه گیاه تریتیکاله شد. همچنین ن تایج مقای سه م یانگین بین دو ژنوت یپ متح مل (۵۳) و ح ساس (۱) به تنش تریتیکاله نشان می‌دهد که جدا از زمان نمونه برداری و زمان القای تیمار تنش خ شکی، به‌طورکلی بین دو ژنوت یپ در ارتباط با ژن‌های SOD هم در ریشه و هم در ا ندام هوایی تفاوت معنی‌دار وجود دا شت. در ژن SOD م قدار ب یان در ژنوتیپ شماره ۵۳ هم در ا ندام هوایی و هم در ری شه به صورت معنی‌دار بیش تر از ژنوت یپ شماره ۱ بود. به‌دلیل ا فزایش تول ید رادی کال های آزاد اک سیژن و ای جاد تنش اکسیداتیو در شرایط تنش خ شکی، آ نزیم SOD ی کی از آنتی‌اکسیدان‌ها در مسیر حذف ا ین رادی کال ها ا ست که دارای کارایی بالای ن یز می‌با شد. ب نابراین ا فزایش ب یان ژن‌های SOD در ژنوتیپ متحمل تریتیکاله می‌تواند ی کی از دلایل افزایش تحمل ا ین ژنوت یپ به خ شکی و در نتی جه تولید بیش‌تری نسبت به ژنوت یپ ح ساس در ا ین شرایط باشد.

گیاهان دارای تجربه رویارویی با بسیاری از تنش های غ یر

زیستی مانند خشکی و شوری هستند که این تنش ها دارای اثرات گوناگون و مهمی بر آن‌ها می‌باشند. یکی از مهم ترین اثرات تنش خشکی، به‌عنوان یکی از مهم ترین تنش های غیرزیستی در سطح جهان، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد که در اکثر مواقع شامل $^{1}O_2$، O_2^-، OH^- و H_2O_2 با واکنش پذیری بسیار زیاد است. این مولکول ها می‌توانند با مولکول ها و متابولیت های دیگر مانند DNA، رنگدانه‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و دیگر مولکول های سلولی ضروری واکنش داده و منجر به فرآیندهای مخرب شوند. واکنش گیاهان به تولید ROS در سلول‌ها افزایش تولید مواد آنتی‌اکسیدانی است که جهت کاهش اثرات اکسیدانی این مواد مخرب مورد استفاده قرار می‌گیرند و شامل اشکال آنزیمی و غیر آنزیمی هستند (Ghozlene *et al.*, 2014). بافت ها و اندام‌های مختلف مقدار متفاوتی از فعالیت متابولیک و مصرف اکسیژن را دارند و همچنین مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها و فعالیت آن‌ها نیز متفاوت است. ROSها به صورت طبیعی نیز در گیاهان وجود دارند و به سیستم های زنده و سلول‌ها در انتقال مواد، تبدیل مواد و نقش های سیگنالینگ کمک می‌کنند. با این حال تولید بیش از نیاز این گونه‌های مواد باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می شود. در شرایط تنش اکسیداتیو ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی برای حذف این گونه‌های سمی کم تر از نسبت تولید ROSها است (Saed-Moucheshi *et al.*, 2021).

از آنجایی که مولکول اکسیژن (O_2) دارای یک نقش اصلی در واکنش های هوازی در گیاهان است، ماده حیاتی برای زندگی است. در کلروپلاست گیاه، O_2 می‌تواند به عنوان یک نتیجه از اکسیداسیون آب توسط زنجیره انتقال الکترونی فتوسنتز تولید شود. کاهش (در اثر جذب الکترون) آن به هر وسیله‌ای، باعث تولید ROS می‌شود که به راحتی می‌توانند انواع فرایندهای متابولیکی را در یک گیاه تحریک کند. ROS رادیکال‌های آزاد هستند که اتم ها یا گروه های اتم دارای حداقل یک الکترون ناپایدار هستند. این پیکربندی بسیار ناپایدار است، بنابراین رادیکال ها به سرعت با مولکول‌های دیگر برای تولید رادیکال‌های آزاد بیشتر واکنش نشان می‌دهند، به دلیل این که الکترون ها تمایل به جفت شدن برای ایجاد حالت پایدار مولکولی دارند. کاهش مولکولی O_2 رخ می‌دهد، باعث تولید ROS شامل سوپر اکسید (O_2^-) پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، هیدروکسیل رادیال (OH^-) و سینگلت اکسیژن ($^{1}O_2$) می شود (Saed-Moucheshi *et al.*, 2021). ROS توسط تعداد مکانیسم های مختلف در بخش‌های سلولی مختلف مانند آپوپلاسم، میتوکندری، پراکسیسوم‌ها، کلروپلاست‌ها و رتیکولوم اندوپلاسما تشکیل می‌شود (Noctor *et al.*, 2014).

گیاهان علاوه بر توانایی تولید ROS، توانایی تولید انواع مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها را نیز دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طورکلی می‌توانند به دو نوع مختلف شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم شوند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز،

کاتالاز، پراکسیداز و برخی دیگر از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی هستند که در چرخه آسکوربات -گلوتاتیون فعال هستند که از ا ین م یان می توان آ سکوربات پراک سیداز (APX)، و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) را نام برد. آنتی‌اک سیدان‌های غ یر آنزیمی که معمولا شناخته شده ه ستند شامل گلو تاتیون (GSH)، آ سکوربات (ASA)، کاروتنوئ یدها، تو کوفرول، فلاون و آنتو سیانین ها ه ستند. آنتی‌اک سیدان‌های غ یر آنزیمی کلیدی شامل آ سکوربات و گلو تاتیون ا ست که در چرخه آسکوربات گلوتاتیون نیز موجود می باشند (Dvořák *et al.*, 2020).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند SOD، CAT، APX، POD، GR و MDHAR به‌طور قابل ملاحظه‌ای سطح سوپراکسید و پراک سید ه یدروژن را در گیا هان کاهش می ده ند. سوپراکسید دیسموتاز باعث تخریب O_2^- به اکسیژن مولکولی و H_2O_2 می‌شود. سوپراکسید یـ کی از مهم ترین آنزیم های مورد ا ستفاده در برا بر تنش اک سیداتیو در سی ستم د فاع گیاهی است و در همه سلول‌های هر نوع گ یاهی مو جود است. از آنجایی که SOD ها متالوپروتئین های متخل خل هستند، آن‌ها دارای ایزوفرم‌های مختلف می‌باشند. بر ا ساس انواع فـ لز مو جود در سایت‌های فـ عال آن ها می توان ا ین آنتی‌اکسیدان‌ها را تقسیم بندی نمود. شایع‌ترین ایزوفرم‌های شناخته شده SOD شامل مس-روی سوپراکسید دیـ سموتاز (Cu / Zn-SOD)، منگنز (Mn-SOD)، آ هن (Fe-SOD) و نیکل شامل (Ni-SOD) می با شد (Ghozlene *et al.*, 2014). الـ قاء SOD در سلول‌های گ یاهی در وا کنش به محیط های مختلف تنش ن شان ده نده ن قش م هم آن در مکانی سم د فاع گیا هان ا ست. شرایط تنش‌زا به‌طورکلی فعالیت های SOD را ا فزایش می‌د هد تا رادیـ کال های سوپراکسید را از بین ببرد.

نتایج مطالعه پیش‌رو نشان داد که بیان ژن Cu/Zn-SOD در شرایط تنش تحت تاثیر قرار گرفته و تغییر می‌کند. با افزایش میزان تنش و زمان تنش مقدار بیان آنی ژن افزایش پیدا کرد. میزان تغییرات بیان این در اندام هوایی نسبت به ریشه بیشتر بود و اندام هوایی سریع‌تر به تنش خشکی پاسخ داد. همچنین بین دو ژنوتیپ حساس و متحمل مورد استفاده در این آزمایش، میزان بیان ژن Cu/Zn-SOD هم در ریشه و هم در اندام هوایی در ژنوتیپ متحمل بالاتر از ژنوتیپ حساس تریتیکاله بود. به‌طورکلی مشخص شد که آنزیم سوپراکسیددیسموتاز یک آنزیم اساسی در گیاه برای پاسخ به تنش خشکی و همچنین ایجاد تحمل در گیاه تریتیکاله است.

References

Ahmadi, A., Emam, Y., & Pessarakli, M. 2010. Biochemical changes in maize seedlings exposed to drought stress conditions at different nitrogen levels. Journal of plant nutrition, 33, 541-556.

Blum, A., 2006. Drought adaptation in cereal crops: a prologue. Drought adaptation in cereals, 3-15.

Chen, Y., Gong, B., Xi, L., Tang, L., Zhu, W., Xu, L., Zeng, J., Wang, Y., Fan, X., & Sha, L., 2019. Effective introgression of wheat D-genome chromosomes into hexaploid triticale (× Triticosecale Wittm.) using trigeneric hybrids. Molecular Breeding, 39, 83.

CIMMYT, 2004. Triticale crop improvement: the CIMMYT programme. Triticale improvement production, 11.

Dvořák, P., Krasylenko, Y., Ovečka, M., Basheer, J., Zapletalová, V., Šamaj, J., & Takáč, T. 2020. In-vivo light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. Plant, Cell & Environment, 44 (1): 68-87.

Ghozlene, I., Mohammed-Reda, D., Rachid, R., & Houria, B. 2014. ROS and antioxidant system of Triticum durum after water stress. Annual Research & Review in Biology, 4, 1241-1249.

Moore, G., Devos, K., Wang, Z., & Gale, M. 1995. Cereal genome evolution: grasses, line up and form a circle. Current Biology 5, 737-739.

Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. 2014. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. Plant physiology 164, 1636-1648.

Oettler, G. 2005. The fortune of a botanical curiosity–Triticale: past, present and future. The Journal of Agricultural Science, 143, 329-346.

Saed-Moucheshi, A., Razi, H., Dadkhodaie, A., Ghodsi, M., & Dastfal, M. 2019. Association of biochemical traits with grain yield in triticale genotypes under normal irrigation and drought stress conditions. Australian Journal of Crop Science, 13, 272.

Saed-Moucheshi, A., Shekoofa, A., & Pessarakli, M. 2014. Reactive oxygen species (ROS) generation and detoxifying in plants. Journal of Plant Nutrition, 37, 1573-1585.

Saed-Moucheshi, A., Sohrabi, F., Fasihfar, E., Baniasadi, F., Riasat, M., & Mozafari, A. A. 2021. Superoxide dismutase (SOD) as a selection criterion for triticale grain yield under drought stress: a comprehensive study on genomics and expression profiling, bioinformatics, heritability, and phenotypic variability. BMC Plant Biology,21, 148.

Serna-Saldivar, S.O., Guajardo-Flores, S., & Viesca-Rios, R. 2004. Potential of triticale as a substitute for wheat in flour tortilla production 1. Cereal chemistry, 81, 220-225.

Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science, 151, 59-66.