

تأثیر محلول پاشی متانول بر بیان برخی از ژن‌های میتوکندریایی در گیاه کلزا تحت تنش خشکی

سحر رمضان زاده بیشه گاهی^۱، محمد محسن زاده گلفزانی^۲، حبیب ا. سمیع زاده لاهیجی^۳

۱ و ۲- به ترتیب کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۲۷

چکیده

در این تحقیق، دو ژنوتیپ کلزا حساس Hyola308 و متحمل خشکی SLM046 تحت سه شرایط مرتب آبیاری شده، قطع آبیاری به مدت ۷۲ ساعت و قطع آبیاری به مدت ۷۲ ساعت و سپس محلول پاشی شده با متانول، از نظر بیان ژن‌های تیوردوکسین H (*TRX H*)، آلترناتیواکسیداز یک (*AOX1*)، پیرووات دهیدروژناز یک (*PDH1*)، ایزوسیترات دهیدروژناز یک (*IDH1*) و فوماراز یک (*FUM1*)، با استفاده از تکنیک Real-Time-PCR ارزیابی شدند. بیشترین میزان بیان *PDH* در SLM046 در ساعت صفر تنش (۷۲ ساعت پس از قطع آبیاری)، *IDH* در هشت ساعت پس از محلول پاشی متانول، *FUM* در ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی متانول، *TRX* در هشت ساعت پس از محلول پاشی متانول و *AOX* در ۲۴ ساعت پس از نمونه برداری دارای بود. در Hyola308، میزان بیان ژن‌های *PDH*، *FUM*، *TRX* و *AOX* در هشت ساعت پس از محلول پاشی به ترتیب ۲/۲۵، شش، ۱/۴ و پنج برابر نسبت به شاهد افزایش یافت و ژن *IDH* در ساعت صفر نمونه برداری دارای بیان بالا بود. به طور کلی محلول پاشی با متانول، بیان ژن‌های بررسی شده را افزایش داد و این میزان در ژنوتیپ SLM046 به مراتب بیشتر از Hyola308 بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز، بیان ژن، چرخه کربس، مسیر آلترناتیواکسیداز.

Effect of methanol foliar application on expression changes of some mitochondrial genes in canola under drought stress

Sahar Ramezanzadeh Bishegahi¹, Mohammad Mohsenzadeh Golfazani², Habibollah Samizadeh Lahiji³

1,2,3- Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan,
(Received: June 14, 2020 - Accepted: August 17, 2020)

ABSTRACT

In this study, two canola genotypes, Hyola308 (susceptible to drought) and SLM046 (tolerant to drought) were evaluated for expression of *thioredoxin H (TRX H)*, *alternativa oxidase 1 (AOX1)*, *pyruvate dehydrogenase 1 (PDH1)*, *isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1)* and *fumarase 1 (FUM1)* genes using real-time PCR technique under three conditions: non-drought stress, regular irrigation and methanol solutions spray after 72 hours irrigation interruption. *PDH* gene expression was the highest in SLM046 at zero stress (72 h after irrigation), *IDH* at 8 h after methanol spray, *FUM* at 24 h after methanol spray, *TRX* at 8 h after methanol spray, and *AOX* at 24 hours after sampling. In Hyola308 genotype, expression of *PDH*, *FUM*, *TRX*, and *AOX* genes increased 2, 25, 6, 1.4 and 5 folds, respectively after 8 hours of foliar application and *IDH* gene expression was high at zero hour of sampling. Overall, methanol foliar application increased the expression of the examined genes, which were significantly higher in SLM046 than Hyola308 genotypes.

Keywords: Alternative oxidase pathway, gene expression, Krebs cycle, oxidoreductase enzymes.

مقدمه

تنش چند بعدی است که گیاهان را در سطوح مختلف تحت تأثیر قرار می‌دهد. در سطح گیاه، پاسخ به تنش خشکی پیچیده است (Blum, 1996) و به‌عنوان به‌وسیله مهم‌ترین فاکتور کنترل‌کننده عملکرد محصولات، تقریباً روی کلیه فرآیندهای رشد گیاه تأثیرگذار است (Siddique *et al.*, 1999). آسیب‌های

در سراسر جهان، تنش آب، علت اصلی خسارات اقتصادی در کشاورزی و جنگلداری است (Rosegrant & Cline, 2003) و انتظار می‌رود به دلیل تغییرات آب و هوایی و کمبود روزافزون آب، خشکی به‌طور فزاینده ای شدیدتر شود (Zirgoli & Dudley, 1996); Sabagh *et al.*, 2019Kahrizi, 2015). خشکی یک

ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به ماکرومولکول‌ها تحت تنش خشکی، مهم‌ترین عامل پیشگیری کننده رشد است (Farooq *et al.*, 2009). یکی از مسیرهایی که تحت تاثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد، چرخه کربس (TCA) است که در ماتریکس میتوکندری قرار دارد (Gao *et al.*, 2018). آنزیم‌های چرخه TCA به تنش‌های اکسیداتیو بسیار حساس هستند (Fernie *et al.*, 2004). در گیاهان، پیرووات به وسیله کمپلکس آنزیمی پیرووات دهیدروژناز (PDC) میتوکندریایی به استیل COA تبدیل می‌شود و به دنبال آن CO₂ آزاد می‌شود و NAD⁺ به NADH تبدیل می‌شود (Budde & Randall, 1990). کمپلکس پیرووات دهیدروژناز میتوکندری (mtPDC)، محل ورود کربن به چرخه TCA می‌باشد (Tovar-Méndez *et al.*, 2003). در چرخه کربس، استیل COA به وسیله سیترات سینتاز و آکونیتاز به ایزوسیترات تبدیل می‌شود (Moeder *et al.*, 2007). ایزوسیترات دهیدروژناز با واکنش اکسیداتیو، ایزوسیترات را به ۲-اکسیدگلوکوتارات، تبدیل می‌کند و محصول این واکنش، CO₂ و NADP است (Lemaitre *et al.*, 2007)؛ Sulpice *et al.*, 2010؛ Foyer *et al.*, 2011a, 2010). ایزوسیترات دهیدروژناز میتوکندری و سیتوزول، نقش مهمی در تولید NADPH برای احیای گلوکوتاتیون و در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن در برابر تنش اکسیداتیو دارند (Abiko *et al.*, 2005). در گیاه آرابیدوپسیس، شش ایزومر برای ژن *IDH* گزارش شده است. فقدان ژن *AtIDH II* منجر به کاهش فعالیت ایزوسیترات دهیدروژناز در این گیاه شد (Lin *et al.*, 2004). در مطالعه‌ای که Lemaitre & Hodges (2006) روی ژن *IDH* در قسمتهای مختلف گیاه آرابیدوپسیس انجام دادند اعلام کردند که ایزومر شماره شش در برگ، دارای بیان بیشتری بود. چرخه کربس با فعالیت مالات دهیدروژناز تکمیل می‌شود که سبب اکسیداسیون برگشت‌پذیر مالات به اگزوالاستات (OAA) می‌شود (Nunes-Nesi *et al.*, 2005).

اگزوالگوتاراتات توسط آنزیم‌های اگزوالگوتارات دهیدروژناز، سوکسینات دهیدروژناز و فوماراز (فومارات دهیدروژناز) به فومارات تبدیل می‌شود (Zhang & Xie, 2014). در گوجه فرنگی، کاهش فعالیت آنزیم فوماراز، کاهش رشد گیاهان را در پی داشت (Nunes-Nesi *et al.*, 2007). تیوکسی‌ردوکسین (*TRX*) به‌عنوان یک تنظیم کننده اصلی برای چرخه TCA میتوکندری شناخته شده است (Daloso *et al.*, 2015). *TRX* نقش اساسی را در تحمل گیاهان به تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند. آن‌ها در مقابله با آسیب اکسیداتیو و با انتقال الکترون، موجب احیای ردوکتازهای مورد نیاز برای سم‌زدایی هیدروپراکسیدهای چربی و در نتیجه ترمیم پروتئین اکسید شده می‌شوند (Dos Santos & Rey, 2006). *TRX* برای احیای خود از فردوکسین (*FTR*¹) یا NADPH (*NTR*²) استفاده می‌کند (Reichheld *et al.*, 2005). در بررسی که روی گیاه آرابیدوپسیس انجام شد، افزایش بیان *NTR* باعث افزایش تحمل به تنش‌های خشکی و فتواکسیداتیو شد. همچنین نتایج نشان داد که افزایش بیان *NTR* به حفظ هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Kim *et al.*, 2017). تیوکسی‌ردوکسین می‌تواند فوماراز و سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی را غیرفعال کند و در شرایط *In vivo* نیز سبب متلاشی شدن ATP سیترات لیاژ سیتوزولی می‌شود (Daloso *et al.*, 2015). *TRX* نقش اساسی را در تحمل گیاهان به تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند. آن‌ها در مقابله با آسیب اکسیداتیو، با انتقال الکترون موجب احیای ردوکتازهای مورد نیاز برای سم‌زدایی هیدروپراکسیدهای چربی و در نتیجه ترمیم پروتئین اکسید شده می‌شوند (Dos Santos & Rey, 2006). مطالعه ژنومی برنج نشان داد که تحت شرایط تنش زیستی و غیرزیستی، تفاوت معنی داری در بیان ژن *TRX* وجود دارد (Nuruzzaman *et al.*, 2012)؛ بنابراین نقش *TRX*، محافظت گیاهان در برابر آسیب

2 - Ferredoxin-dependent heterodimeric thioredoxin reductase

3 - NADPH-dependent thioredoxin reductases

1 - Reactive Oxygen Species

اکسیداسیون سریع به دی‌اکسیدکربن و ترکیب با محلول‌پاشی متانول، باعث تأخیر در پیری برگ‌ها از طریق اثر روی محرک‌های تولید اتیلن در گیاه می‌شود که این امر موجب دوام سطح برگ و افزایش دوره فعال فتوسنتزی می‌شود (Zbiec *et al.*, 2003). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده است که متانول، القا کننده بیان ژن‌ها در گیاه آراییدوپسیس است (Roslan *et al.*, 2001). در تحقیقی، تنش خشکی سبب افزایش میزان بیان ژن گلیکولات اکسیداز (که یک آنزیم کلیدی مسیر تنفس نوری می‌باشد)، در ساعات ابتدایی در ژنوتیپ متحمل SLM046 کلزا شد و ساعات بعدی، بیان آن به شدت کاهش یافت کرد (Pasandideh Arjmand *et al.*, 2017). محققان این تحقیق اظهار نمودند احتمالاً گیاه با افزایش گلیکولات اکسیداز، سعی در تولید CO₂ برای چرخه کالوین دارد و پس از این که NADPH به میزان زیادی انباشته شد، برای جلوگیری از تنش اکسیداتیو، بیان ژن گلیکولات اکسیداز را در ساعات بعدی کاهش داده است. در مطالعه دیگر، تیمار متانول روی پنبه باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم گلیکولات اکسیداز شد (Bai *et al.*, 2014) و محققان آن گزارش کردند که یکی از راهکارهای افزایش غلظت دی‌اکسیدکربن در گیاهان، استفاده از متانول است که این امر منجر به افزایش فتوسنتز خالص در واحد سطح و بالارفتن تولید ماده خشک در گیاهان زراعی سه کربنه می‌شود. کلزا همانند بسیاری از گیاهان زراعی، نسبت به تنش خشکی آسیب‌پذیر است و خسارت ناشی از ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در تنش خشکی، یکی از علل عمده کاهش محصول است. بنابراین در این تحقیق تلاش شد تا با توجه به تاثیر متانول که در مطالعات قبلی به آن اشاره شده است، بیان برخی رونوشت‌های ژن‌ها در شرایط تنش خشکی و بدون تنش در ژنوتیپ متحمل و حساس کلزا با استفاده از Real Time-PCR، بررسی شود تا شناخت مناسبی برای شناسایی عکس العمل گیاه کلزا به تنش خشکی و تیمار آن‌ها با متانول فراهم آورد.

اکسیداتیو می‌باشد و نشان می‌دهد که *TRX* در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی درگیر است (Kapoor *et al.*, 2015). مسیر آلترناتیو اکسیداز، یکی از راه‌های مهم کاهش تولید انواع اکسیژن فعال در اندامک‌های کلروپلاست و میتوکندری است (Mittler, 2002). در این مسیر، به جای این که الکترون‌ها، تک تک بر روی آن منتقل شوند، هر چهار الکترون لازم جهت احیای کامل اکسیژن به یک باره توسط آن دریافت می‌شود و آن را به آب تبدیل می‌کند؛ این عمل توسط آنزیم آلترناتیو اکسیداز (*AOX*) صورت می‌گیرد. فعال شدن این مسیر جایگزین همانند سایر مسیرهای ممانعت کننده، از تشکیل انواع اکسیژن فعال پیشگیری می‌کند و سبب می‌شود که فشار الکترون موجود روی زنجیر انتقال الکترونی کاهش یابد (Edreva, 2005). محققین نشان داده‌اند که فقدان ژن *AOX1* در گیاه، توانایی رشد یا تحمل به تنش را کاهش می‌دهد (Mohsenzadeh, 2017). همچنین نشان داده شده است که آلترناتیو اکسیداز در کاهش آسیب سلولی تحت تنش‌های محیطی مختلف نقش دارد، به طوری که تعداد زیادی از مطالعات اخیر، به نقش آن در پاسخ به تنش شوری و خشکی متمرکز شده است (Li *et al.*, 2013). افزایش بیان *AOX* در پاسخ به خشکی در برگ گندم نشان داده شده است (Bartoli *et al.*, 2009). (Vassileva *et al.*, 2009)؛ در حالی که هیچ افزایشی در پروتئین *AOX* برگ سویا دیده نشد (Ribas-Carbo *et al.*, 2005)، همچنین خشکی سبب کاهش میزان بیان ژن *AOX* در برگ یونجه شده است (Filippou *et al.*, 2011). در تحقیقات انجام شده، کاربرد متانول به عنوان یک منبع کربن برای گیاهان زراعی رواج پیدا کرده است، زیرا گیاهان می‌توانند متانول محلول‌پاشی شده روی برگ‌ها را به راحتی جذب کنند و به عنوان منبع کربنی مورد استفاده قرار دهند و از طرفی متانول، کمبود CO₂ را برای گیاه جبران می‌کند (Hemming *et al.*, 1996). (Bai *et al.*, 2014; Fall & Benson, 1996)؛ همچنین گزارش شده است که متانول با ریبولوز ۱۵۰ بیس فسفات، از رقابت اکسیژن می‌کاهد. همچنین

مواد و روش‌ها

بذرهای دو ژنوتیپ حساس (Hayola308) و متحمل (SLM046) خشکی کلزا از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (SPII) تهیه شدند (Mirzai *et al.*, 2013; Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2016). بذرهای جوانه‌زنی به مدت چهار روز در پتری‌دیش مرطوب استریل در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه گیلان قرار داده شدند و پس از جوانه‌زنی، پنج عدد بذر سالم در هر گلدان پلاستیکی با قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر کشت شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی، دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۱۹۸ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه (۶۵۵ لوکس) منتقل شدند و تا زمان نمونه برداری به صورت مرتب و روزانه آبیاری شدند. بررسی گیاهان در سه سطح شاهد (آبیاری کامل و منظم)، تنش خشکی (قطع آبیاری) و محلول پاشی گیاهان تحت تنش انجام شد. از نظر آماری به صورت فاکتوریل و در پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد که سه عامل متانول، ژنوتیپ و زمان به‌عنوان عوامل آزمایش در نظر گرفته شدند. نمونه‌های برگ‌ها از گیاهان (الف) به‌طور کامل و منظم آبیاری شده به‌عنوان شاهد، (ب) گیاهانی که به مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط تنش خشکی به صورت قطع آبیاری قرار داشتند (بر اساس روش وزنی تعیین FC (ظرفیت زراعی) و PWP (نقطه پژمردگی دائم)، تقریباً ۷۲ ساعت پس از قطع آبیاری گلدان‌ها آب خود را از دست داده بودند و به حدود ۳۰ درصد ظرفیت زراعی رسیده بودند که این زمان به‌عنوان زمان شروع تنش در نظر گرفته شد) و (ج) گیاهان تحت تنش خشکی که ۷۲ ساعت پس از قطع آبیاری، با متانول ۲۰ درصد محلول پاشی شدند (Armand *et al.*, 2016) و در هشت و ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی، نمونه‌گیری انجام شد.

برگ‌های سالم، سبز و کاملاً توسعه‌یافته گیاه کلزا در مرحله رویشی چهار تا شش برگگی (گیاهچه‌ای) برش داده شدند و در ورقه‌های آلومینیومی با ضخامت متوسط قرار گرفتند. پس از نمونه‌گیری و برای توقف فعالیت‌های متابولیک، ابتدا نمونه‌های برگگی درون

نیترژن مایع گرفتند و تا زمان استخراج، در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت دنا زیست و مراحل آن مطابق دستورالعمل مربوطه انجام شد. به‌منظور حذف DNA باقیمانده، از آنزیم DNase و سپس EDTA استفاده شد. سنجش کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از عکس‌برداری ژل آگارز یک درصد توسط دستگاه ژل داگ (مدل BIO RAD) و تحت نور UV و سنجش کمیت آن با استفاده از نانودراپ انجام شد. مشاهده باندهای مجزای 5S، 18S و 28S برای RNA ریبوزومی، نشان از کیفیت مناسب فرایند استخراج RNA دارد که در تمامی نمونه‌ها، صحت استخراج تأیید شد.

سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Revert Aid Reverse Transcriptase و M-MLV کیت فرمنتاز (Fermntas LIFE SCIENCE # K 1621) مطابق با دستورالعمل مربوطه اجرا شد و کنترل سنتز cDNA با استفاده از آغازگر ژن اکتین انجام شد. به‌منظور بررسی وجود آلودگی در cDNA سنتز شده، از واکنش کنترل منفی که شامل همه مواد موردنیاز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به غیر از cDNA بود، استفاده شد. برای بررسی بیان نسبی ژن‌ها، از دستگاه Real time-PCR (مدل LightCycler 96) و مخلوط مادر واکنش Real time PCR شرکت BIORON Life Science استفاده شد. در این مطالعه، بیان پنج ژن در فرایند Real time PCR مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۱) و از ژن *Actin* به‌عنوان ژن رفرنس جهت نرمال سازی داده‌ها استفاده شد (Yang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013; Aliakbari & Razi, 2011).

توالی ژن‌های مورد نظر با جستجو در بانک‌های اطلاعاتی (NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) و EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>)) و طراحی آغازگرهای اختصاصی با استفاده از برنامه‌های Tcoffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:mcoffee>) و primer3 (<http://primer3.ut.ee>) صورت گرفت. پس از طراحی آغازگرها، BLAST آن‌ها انجام شد (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) تا از صحت طراحی آغازگرها اطمینان حاصل شود. جهت

Real-Time- در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. مواد مورد نیاز برای انجام واکنش Real-Time PCR با حجم نهایی ۱۱/۵ میکرولیتر با سه تکرار برای هر نمونه تهیه شد.

به دست آوردن راندمان PCR برای ژن‌های مورد مطالعه، از یک cDNA، سه رقت یک، ۱۰ و ۱۰۰ تهیه شد و بعد از انجام واکنش، کارایی تکثیر ۹۹ درصد به دست آمد.

اندازه محصول PCR برای ژن‌های مختلف از ۱۵۰-۱۸۷ متغیر بود (جدول ۱) و واکنش PCR

جدول ۱- لیست توالی و خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. The sequence and characteristics of the primers used in this study

Number	Gene	Primer sequence	Melting Tem (°C)	PCR production length	NCBI accession number
1	<i>Actin-F</i>	5-TCCCGAGTATTGTTGGTCGT-3'	54	157	AF111812
	<i>Actin-R</i>	5-TCCATGTCATCCCAGTTGCT-3'			
2	<i>AOX 1a-F</i>	5'-GCGGTTGGATCTGGACTACT-3'	56/8	171	JX110773
	<i>AOX1a -R</i>	5'-TAGCGATTCTTCCCTCCC -3'			
3	<i>TrxH-F</i>	5'-CTTGCCGTTTCATTGCACCT-3'	58	159	U59379
	<i>Trx -R</i>	5'-CGAGCTTCTCTTCGCCTTTC-3'			
4	<i>IDH1-F</i>	5'-GGCGTTGCTTCTCTCATCAG-3'	58	150	XM_013784764
	<i>IDH1-R</i>	5'-ACGACCTCTTGAGTAGTGCT-3'			
5	<i>FUMI-F</i>	5'-CACAATCGCCACATCGTTGA-3'	58	181	XM_013892089
	<i>FUMI-R</i>	5'-GCCCATACCTGAGCACAAA-3'			
6	<i>PDHI-F</i>	5'-CGCACTGAGGAATGTACGAC-3'	58	187	XM_013831235
	<i>PDHI-R</i>	5'-TTGTGCCAGCTCCTTAACCT-3'			

AOX1a : Alternative oxidase 1a, *Trx*: Thioredoxin H-type, *IDH*: Isocitrate dehydrogenase 1, *FUM*: Fumarate hydratase 1, *PDH*: Pyruvate dehydrogenase

Real time-PCR، از معادله لیواک (Livak & Schmittgen, 2001) استفاده شد. نمودارها با استفاده از اکسل ۲۰۱۶ رسم شد و برای مقایسه ستون‌ها، از خطای استاندارد (SE) استفاده شد. همچنین سطح معناداری بیولوژیکی، دو برابر بیان نسبی در نظر گرفته شد (Pasandideh Arjmand *et al.*, 2017; Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2019; Vahedi *et al.*, 2019).

نتایج و بحث

بررسی مورفولوژیکی گیاه کلزا ژنوتیپ Hyola308 در مقایسه با شاهد، ظهور تدریجی علائم پژمردگی پس از اعمال تنش و تداوم آن را نشان داد؛ در مقابل در ژنوتیپ SLM046 تحت تنش قطع آبیاری در مقایسه با شاهد، در ساعات ابتدایی علائم پژمردگی دیده شد و سپس در ساعات بعدی به تدریج علائم پژمردگی از بین رفت و رشد عادی گیاه از سر گرفته شد. بررسی

ابتدا در هر تیوپ ۱۱/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام آغازگرهای رفت و برگشت و ۴/۲۵ میکرولیتر ddH₂O ریخته شد و سپس با اضافه کردن یک میکرولیتر از cDNA مورد نظر، با هم مخلوط شدند. برای واکنش کنترل منفی (NTC^۱)، همه مواد گفته شده بدون cDNA به کار رفت. عدم مشاهده پیک در انتها برای این واکنش نیز عدم وجود آلودگی یا تکثیر غیراختصاصی بود. چرخه حرارتی مورد استفاده شامل سه دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵°C، سپس ۴۰ سیکل به صورت ۱۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۵°C، ۲۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای Tm (بسته به آغازگر متفاوت بود، جدول ۱) و ۱۵ ثانیه مرحله بسط در دمای ۷۲°C بود. برای مقایسه بیان نسبی ژن‌های موردنظر در فرایند

¹. No template negative control

پاشی با متانول، سبب تحمل گیاه به تنش خشکی شده است (شکل ۱- A و B).

هر دو ژنوتیپ در شرایط تنش پس از محلول پاشی نشان داد که رشد عادی گیاهان پس از محلول پاشی دوباره از سر گرفته شد و به نظر می‌رسد که محلول



B



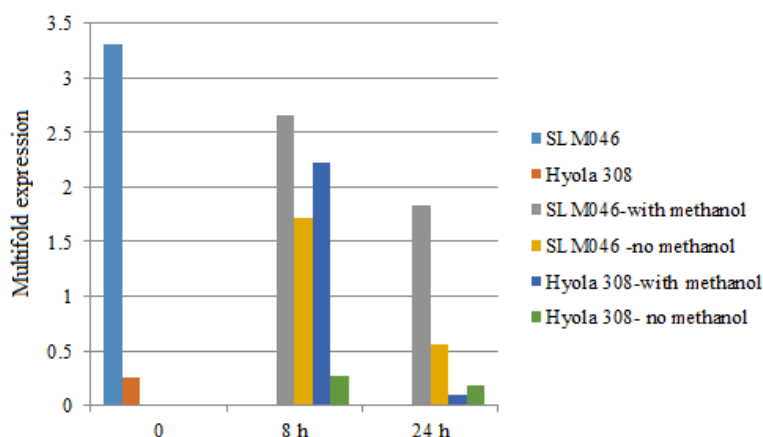
A

شکل ۱- A. ژنوتیپ SLM046، سمت چپ محلول پاشی شده با متانول و سمت راست تحت تنش قطع آبیاری. B. ژنوتیپ Hyola308، سمت راست محلول پاشی شده با متانول و سمت چپ تحت تنش قطع آبیاری.

Figure 1- A. SLM046 genotype, left side: methanol sprayed and right side: under irrigation interruption. B. Hyola308 genotype, right side: methanol sprayed and left side: under irrigation interruption

نگه دارد و در ساعات بعدی، دچار کاهش بیان شده است. به‌طور کلی در ساعات ابتدایی، هشت و ۲۴ برای گیاهان Hyola308 که تحت تنش قطع آبیاری قرار داشتند و با متانول محلول پاشی نشده بودند، میزان بیان ژن *PDH* تغییر معنی‌داری نداشت، اما محلول پاشی با متانول، سبب افزایش معنی‌داری در هشت ساعت شد. نتایج کلی به‌دست آمده از مقایسه بیان ژن *PDH* در دو ژنوتیپ متحمل و حساس نشان داد که به‌طور کلی در ژنوتیپ متحمل، با افزایش زمان تنش، مقدار ژن *PDH* نیز کاهش یافت، اما بیان این ژن با محلول پاشی متانول افزایش یافت. به‌طور کلی با افزایش زمان تنش در ژنوتیپ حساس، میزان بیان این ژن ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت، به‌طوری‌که در رقم حساس و هشت ساعت پس بدون محلول پاشی، مقدار *PDH* بیش‌ترین مقدار خود بود و با افزایش زمان تنش یعنی در ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی، به کمترین مقدار خود رسید؛ احتمالاً گیاه در ساعت ابتدایی سعی در تولید استیل‌کوا برای چرخه کربس داشته اسن، اما نتوانسته است که این میزان بیان را بالا نگه دارد.

بیان ژن *PDH* در ژنوتیپ SLM046 در ساعت ابتدای نمونه برداری (۷۲ ساعت بدون آبیاری) به شدت افزایش پیدا کرد و تا سه برابر شاهد رسید و در ساعات بعدی بیان کمتری داشت (شکل ۲). تنش خشکی بر افزایش بیان ژن مذکور نسبت به شاهد افزایش داشت و در هشت ساعت، بیشتر از ۲۴ ساعت بود. همان‌طور که دیده می‌شود، محلول پاشی متانول در ژنوتیپ SLM046 در ساعات هشت و ۲۴ نسبت به گیاهان تحت تنش بدون محلول پاشی متانول، روی افزایش بیان ژن *PDH* تاثیر مثبت داشت و در این رقم، موجب عدم کاهش معنی‌دار بیولوژیکی بیان ژن شد. میزان بیان ژن پیرووات دهیدروژناز در ژنوتیپ حساس در گیاهان تحت تنش قطع آبیاری، نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نداشت، اما در هشت ساعت پس از محلول پاشی با متانول، بیان ژن *PDH* در ژنوتیپ Hyola308 به بیشترین مقدار خود رسید و پس از ۲۴ ساعت بعد از محلول پاشی، میزان بیان ژن مربوطه دوباره کاهش یافت و به‌نظر می‌رسد که سیگنال‌هایی که پاسخ آن، بیان ژن *PDH* را در پی دارد، باعث شده است که این ژن به‌طور موقت افزایش بیان داشته باشد و پس از آن نتوانسته است این بیان را در سطح بالا

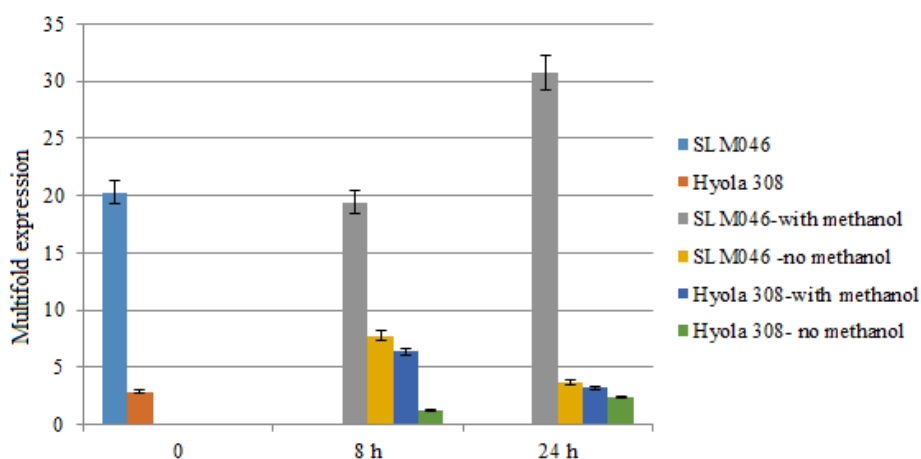


شکل ۲- الگوی بیان ژن *PDH* با روش Real time PCR تحت تنش خشکی و محلول پاشی با متانول در گیاهچه‌های SLM046 و Hyola308.

Figure 2. Expression pattern of *PDH* gene using Real-time PCR under drought stress and foliar application of methanol in SLM046 and Hyola308 seedlings.

Hyola308 در هشت ساعت پس از محلول پاشی با متانول، دارای بیشترین مقدار و حدود پنج برابر شاهد بود و در زمان دیگر، تغییری در بیان این ژن دیده نشد، به طوری که در ۲۴ ساعت، گیاهان محلول پاشی شده با متانول و گیاهان بدون محلول پاشی، تغییر چندانی دیده نشد. در مجموع، تنش خشکی تأثیر چندانی بر افزایش میزان بیان ژن مذکور نداشت، اما با محلول پاشی در هشت ساعت افزایش معنی دار دیده شد.

بیان ژن *FUM* در برگ ژنوتیپ متحمل به خشکی SLM046 در ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی متانول به شدت افزایش پیدا کرد، به طوری که این میزان، حدود ۳۰ برابر شاهد بود (شکل ۳). همان طور که دیده می‌شود، در ژنوتیپ SLM046 در هشت ساعت پس از محلول پاشی متانول، تغییر چندانی نسبت به زمان ابتدای نمونه برداری مشاهده نشد و این میزان، چهار برابر بیشتر از گیاهچه‌های محلول پاشی نشده بود. بیان ژن *FUM* در ژنوتیپ حساس به خشکی



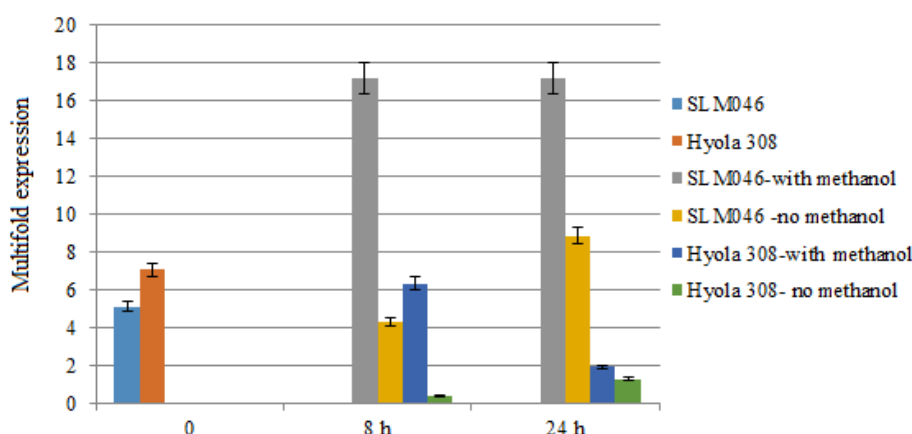
شکل ۳- الگوی بیان ژن *FUM* با روش Real time PCR تحت تنش خشکی و محلول پاشی با متانول در گیاهچه‌های SLM046 و Hyola308.

Figure 3. Expression pattern of *FUM* gene using Real-time PCR under drought stress and foliar application of methanol in SLM046 and Hyola308 seedlings.

به ترتیب در هشت و ۲۴ ساعت میزان بیان ژن *FUM* افزایش یافت، که نشان می‌دهد احتمالاً گیاه سعی دارد که چرخه کربس را راه اندازی کند و NADPH تولید شده را به مصرف برساند.

بیشترین بیان ژن *IDH* در ژنوتیپ SLM046 در ساعات هشت و ۲۴ ساعت در گیاهان پس از محلول پاشی متانول مشاهده شد و میزان بیان آن‌ها تقریباً یکسان و حدود ۱۷ برابر شاهد بود (شکل ۴). تنش خشکی باعث افزایش میزان بیان ژن ایزوسیترات دهیدروژناز شد و این میزان در ۲۴ ساعت پس از شروع نمونه برداری، حدود نه برابر، در هشت ساعت، چهار برابر و در زمان شروع نمونه برداری، پنج برابر شاهد بود. در برگ گیاه Hyola308 با افزایش زمان تنش خشکی، بیان ژن *IDH* کاهش چشمگیری پیدا کرد، به طوری که در زمان قطع آبیاری (۷۲ ساعت قطع آبیاری)، بالاترین میزان بیان بود، اما در ساعات هشت و ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی، بیان این ژن کاهش پیدا کرد. بیان ژن *IDH* در برگ Hyola308 در هشت و ۲۴ ساعت گیاهان محلول پاشی شده با متانول، نسبت به گیاهان تحت شرایط تنش خشکی بدون محلول پاشی افزایش داشت و این میزان در هشت ساعت به مراتب خیلی بیشتر و حدود شش برابر بود.

افزایش بیان ژن *FUM* در ژنوتیپ متحمل در ساعات ابتدایی که با ادامه چرخه کربس مواجه است، نشان‌دهنده تولید انرژی ATP برای مقابله با تنش است. محصول دیگر چرخه کربس، NAD(P)H است که اگر از طریق مسیرهای دیگر مصرف نشود، برای گیاه خطرناک خواهد بود؛ بنابراین به نظر می‌رسد که ژنوتیپ حساس با یک تنش ابتدایی مواجه شده است. میزان بیان ژن *FUM* در ژنوتیپ حساس نسبت به ژنوتیپ متحمل، به مراتب کمتر بود احتمالاً گیاه سعی دارد که با سرکوب چرخه کربس، میزان NAD(P)H را کاهش دهد اما در هشت ساعت پس از محلول پاشی، میزان بیان *FUM* افزایش داشته است و گیاه در ۲۴ ساعت، میزان بیان این ژن را مجدد کاهش دهد. همان طور که Palatnik *et al.* (1997) بیان نمودند اگر میزان NADPH تولید شده توسط سایر عوامل آنتی اکسیدان کنترل نشود، خطرات آسیب اکسیداتیو افزایش خواهد یافت؛ بنابراین تولید NADPH در زمان تنش باید کنترل شود. بیان ژن *FUM* در ژنوتیپ متحمل در ساعات هشت و ۲۴ ساعت بدون محلول پاشی کم بود و احتمالاً گیاه با کاهش بیان این ژن، میزان تولید NADPH را کاهش می‌دهد و با کاهش این نسبت، تولید گونه‌های فعال اکسیژن نیز کاهش می‌یابد. ژنوتیپ متحمل با محلول پاشی متانول



شکل ۴- الگوی بیان ژن *IDH* با روش Real time PCR تحت تنش خشکی و محلول پاشی با متانول در گیاهچه‌های SLM046 و Hyola308.

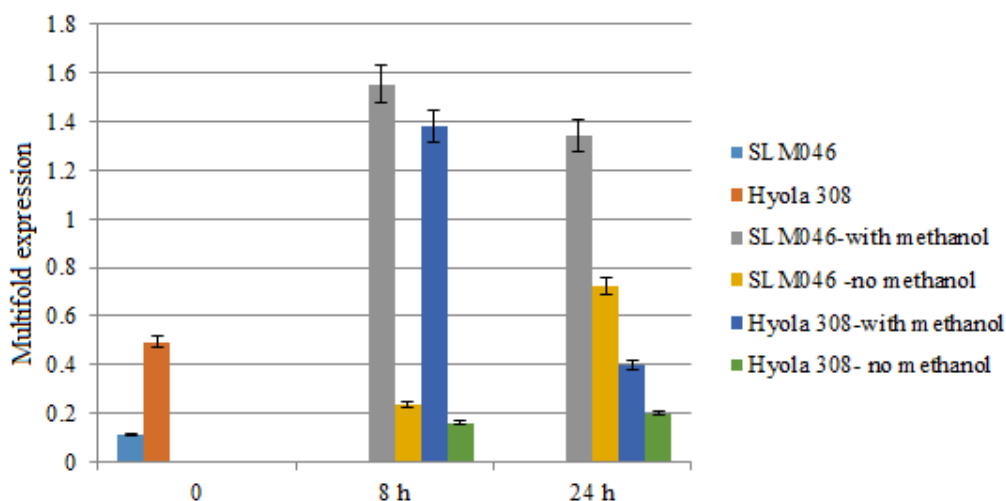
Figure 4. Expression pattern of *IDH* gene using Real-time PCR under drought stress and foliar application of methanol in SLM046 and Hyola308 seedlings.

محلول پاشی به مقدار بسیار کمی بیان شد و در رقم

در این پژوهش، ژن *IDH* در رقم حساس بدون

آبیاری بدون محلول پاشی، به تدریج افزایش یافت و در ۲۴ ساعت پس از شروع نمونه برداری، بیشترین میزان را دارا بود. به نظر می‌رسد که بیان ژن *TRX* در شرایط تنش خشکی، افزایش یافته است تا بتواند به تدریج با تنش مقابله کند و با محلول پاشی متانول زودتر به بالاترین مقدار خود می‌رسد. بیان ژن *TRX* در ژنوتیپ Hyola308 در زمان هشت ساعت پس از محلول پاشی متانول، داری بیشترین مقدار و حدود شش برابر گیاهان بدون محلول پاشی بود، ولی در ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی، میزان بیان ژن *TRX* در SLM046 به مراتب بیشتر از Hyola308 بود. همان‌طور که دیده می‌شود، محلول پاشی با متانول در هشت و ۲۴ ساعت نسبت به ساعت ابتدایی در SLM046 افزایش بیان داشت اما در Hyola308 فقط در هشت ساعت افزایش بیان داشت. ژن *TRX* در Hyola308 در ساعت ابتدایی نمونه برداری دارای افزایش میزان بیان نسبت به شاهد بود و این میزان در ساعت بعدی در گیاهان بدون محلول پاشی کاهش یافت، اما با محلول پاشی متانول، تغییر معنی داری در افزایش میزان بیان این ژن دیده شد. به نظر می‌رسد که محلول پاشی با متانول می‌تواند باعث تاثیر مثبت بر در بیان ژن *TRX* شود.

متحمل در پاسخ به تنش خشکی افزایش یافت و میزان آن در هشت و ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی، برای گیاه متحمل یکسان بود و این موضوع نشان دهنده این است که *IDH* نقش مهمی در تولید NADPH برای احیای گلوکوتایون داشته است و سپس در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن در برابر تنش اکسیداتیو دخیل بوده است (Abiko *et al.* 2005). ثبات بیان نسبی ژن *IDH* در هشت و ۲۴ ساعت ممکن است سبب افزایش تحمل گیاه به تنش شود. احتمالاً گیاه متحمل با ثابت نگهداشتن میزان بیان *IDH* و افزایش بیان نسبی این ژن، مانع از خسارات ناشی از تنش می‌شود؛ این در حالی است که محلول پاشی متانول، افزایش کمتری در ژنوتیپ حساس نسبت به ژنوتیپ متحمل را در پی داشت. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *TRX* در دو ژنوتیپ SLM046 و Hyola308 مورد مطالعه تحت شرایط تنش خشکی و محلول پاشی با متانول نشان داد که بیان این ژن در ژنوتیپ مقاوم به خشکی SLM046 در هشت ساعت و سپس ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی متانول به شدت افزایش پیدا کرد، به طوری که هشت ساعت پس از تنش، به بالاترین میزان خود رسید (شکل ۵). بیان ژن مذکور در گیاهان تحت تنش قطع



شکل ۵- الگوی بیان ژن *TRX* با روش Real time PCR تحت تنش خشکی و محلول پاشی با متانول در گیاهچه‌های SLM046 و Hyola308.

Figure 5. Expression pattern of *TRX* gene using Real-time PCR under drought stress and foliar application of methanol in SLM046 and Hyola308 seedlings.

نیست؛ مطالعات پروتئومیکس نشان می‌دهد که

نقش تیوردوکسین، تنها ایفای نقش آنتی‌اکسیدانی

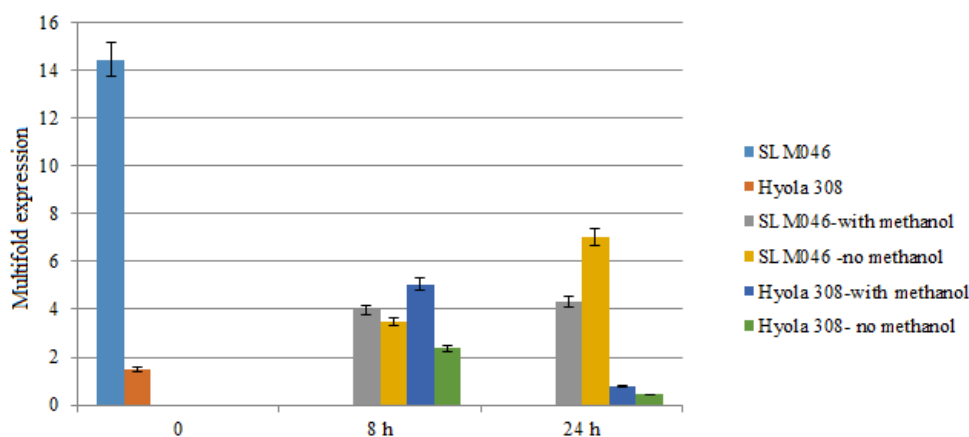
گلوئوتارودوکسین و تیوردوکسین‌های نوع h در فرآیندهای متعدد سلولی دخالت دارند و ویژگی‌های اکسیداسیون و احیایی مهمی را بروز می‌دهند که آن‌ها را در اجرای فعالیت‌های متنوعی توانمند می‌سازد. تعدادی از اعمال آن‌ها عبارتند از: تحریک جوانه زنی بذر و رشد و نمو گیاه، محافظت سلول در برابر تنش اکسیداتیو، غیرفعال‌سازی پروتئین‌های سمی و محافظت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی. همچنین بیش از ۵۰۰ هدف تیوردوکسین در موجودات فتوسنتزکننده هوازی شناسایی شده است که از جمله آنزیم‌های حیاتی برای واکنش‌های گیاه به تنش خشکی همچون آنزیم‌های چرخه کالوین و چرخه کربس، آنزیم‌های آنتی اکسیدان (برای مثال کاتالاز، سوپراکسید دیس‌موتاز و مونو‌دهیدروآسکوربات ردوکتاز) و پروتئین‌های دخیل در انتقال الکترون فتوسنتزی و برداشت نور (Fd و LHCIIb) را در بر می‌گیرد (Montrichard et al., 2009). نتایج نشان داد که تیوکسی‌ردوکسین می‌تواند فوماراز و سوکسینات دهیدردژناز میتوکندریایی را غیرفعال کند؛ همچنین در شرایط *In Vivo* سبب متلاشی شدن ATP سیترات لیاز سیتوزولی می‌شود (Daloso et al., 2015). نقش اساسی را در تحمل گیاهان به تنش اکسیداتیو را ایفا می‌کند. آن‌ها در مقابله با آسیب اکسیداتیو، با انتقال الکترون، موجب احیا ردوکتازهای مورد نیاز برای سم‌زدایی هیدروپراکسیدهای چربی و در نتیجه ترمیم پروتئین اکسید می‌شوند (Dos Santos & Rey, 2006). برای احیا خود از فردوکسین (FTR^1) یا NADPH (NTR^1) استفاده می‌کند (Reichheld et al., 2005). در بررسی انجام شده روی گیاه آرابیدوپسیس گفته شد که افزایش بیان NTR باعث افزایش تحمل به تنش‌های خشکی و فتواکسیداتیو می‌شود. نتایج آن‌ها نشان داد که افزایش بیان NTR به حفظ هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Kim et al., 2017). با توجه به نقش مشترک گلوئوتارودوکسین و تیوردوکسین برای احیای

پروکسی‌ردوکسین در گیاهان مختلف، که در گزارشات دیگر ارائه شده است (Dos Rouhier et al., 2001)؛ Michelet et al., 2006 Santos et al., 2005؛ Rouhier et al., 2007؛ Rouhier et al., 2006؛ Vieira et al., 2007). به نظر می‌رسد که در گیاه کلزا، پروکسی‌ردوکسین برای احیای خود از Trx استفاده کرده است و میزان پراکسید هیدروژن که در اثر تنش افزایش پیدا می‌کند را کاهش داده است که این عمل در هشت ساعت پس از محلول پاشی بیشتر بوده است. بیشترین بیان ژن AOX در برگ گیاه مقاوم به خشکی SLM046 در ابتدای زمان نمونه برداری و حدود ۱۴ برابر شاهد بود (شکل ۶). به‌طور کلی میزان بیان ژن AOX در گیاهان بدون محلول پاشی در ساعت بعدی نسبت به ساعت ابتدایی کاهش و به یک میزان و حدود چهار برابر شاهد بود. ژنوتیپ SLM046 در هشت ساعت پس از محلول پاشی متانول با گیاهان بدون محلول پاشی، تفاوت چندانی نداشت و به نظر می‌رسد که محلول پاشی متانول تاثیر چندانی روی افزایش بیان ژن AOX در ژنوتیپ SLM046 در این ساعت نداشت است، ولی در ۲۴ ساعت پس از نمونه برداری، میزان بیان ژن AOX در گیاه بدون محلول پاشی بالا بود. کاهش میزان بیان ژن AOX در برگ گیاه حساس به خشکی Hyola308 در هشت ساعت پس از محلول پاشی با متانول نسبت به گیاهان بدون محلول پاشی بالا بود و در ۲۴ ساعت، محلول پاشی با متانول در این ژنوتیپ تغییر معنی داری نداشت. میزان بیان ژن AOX در ژنوتیپ Hyola308 در گیاهان بدون محلول پاشی به تدریج افزایش یافت اما در ۲۴ ساعت، دوباره کاهش یافت و محلول پاشی با متانول باعث شد که در هشت ساعت، افزایش میان بیان ژن AOX دیده شود. به نظر می‌رسد که ژنوتیپ Hyola308 با کم شدن میزان متانول سطح برگ نتواند بیان ژن AOX را حفظ کند. مسیر آلترناتیو اکسیداز، یکی از راه‌های مهم کاهش میزان تولید انواع اکسیژن فعال در اندامک‌های کلروپلاست و میتوکندری است (Mittler et al., 2004؛ Edreva, ; Mittler, 2002). افزایش بیان ژن $AOXI$ برای جلوگیری از آسیب رسیدن به فرایند فتوسنتز و تعدیل تولید ROS ضروری است (Fu et al., 2012). شواهد دیگر نشان

1 - *Ferredoxin-dependent heterodimeric thioredoxin reductase*
2 - *NADPH-dependent thioredoxin reductases*

(Vanlerberghe *et al.*, 2009).

داد که بیان بیش از حد *AOX1* می‌تواند با تولید ROS کمتر، توانایی تحمل به تنش را افزایش دهد



شکل ۶- الگوی بیان ژن *AOX* با روش Real time PCR تحت تنش خشکی و محلولپاشی با متانول در گیاهچه‌های SLM046 و Hyola308.

Figure 6. Expression pattern of *AOX* gene using Real-time PCR under drought stress and foliar application of methanol in SLM046 and Hyola308 seedling.

نمایند. این آنزیم‌ها تولید ROS را به‌وسیله دو مکانیسم کاهش می‌دهند: الف) آن‌ها از احیای O_2 به O_2^- توسط الکترون‌ها جلوگیری می‌کنند و ب) تمامی سطوح اکسیژن را که سوبسترای تولید ROS در اندامک‌ها می‌باشد را احیا می‌کنند. با افزایش بیان ژن *AOX* در ژنوتیپ SLM046 می‌توان مسیر آلترناتیو اکسیداز را به‌عنوان یکی از مسیرهای ایجاد مقاومت در تنش اکسیداتیو دانست که گیاه با افزایش بیان آن، در برابر تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش اسمزی مقابله می‌کند.

میزان بیان ژن *AOX* در ژنوتیپ حساس بسیار کم بود و کاهش میزان *AOX* میتوکندریایی، حساسیت گیاهان به تنش‌های اکسیداتیو را افزایش می‌دهد (Desikan *et al.*, 2001; Maxwell *et al.*, 1999). هر چند که افزایش بیان در ژنوتیپ Hyola308 در هشت ساعت دیده شد، ولی گیاه نتوانست این افزایش بیان را حفظ کند و دوباره در ۲۴ ساعت دچار کاهش بیان در ژن *AOX* شد. کاهش در میزان بیان *AOX* می‌تواند سبب انباشته شدن اکسیژن در میتوکندری شود، زیرا این آنزیم با استفاده از زنجیره انتقال الکترون، سبب

میزان بیان ژن *AOX* در ژنوتیپ مقاوم SLM046 در ۲۴ ساعت صفر و ۲۴ ساعت پس از نمونه برداری نسبت به ژنوتیپ حساس بیشتر بود و این میزان برای ژنوتیپ SLM046 در هشت ساعت کم بود. کاهش رونوشت *AOX* در تنش خشکی در مطالعه Filippou *et al.* (2011) در نه روز پس از تنش خشکی دیده شد. اجتناب از تولید ROS می‌تواند به اندازه از بین بردن آن مهم باشد. از آن‌جا که بسیاری از تنش‌های محیطی از جمله خشکی، با سرعت زیاد تولید ROS همراه هستند، اجتناب یا کاهش اثرات تنش‌هایی مانند درجه حرارت پایین و یا خشکی، خطر تولید ROS را کاهش خواهد داد. یکی از مکانیزم‌هایی که می‌توانند تولید ROS را در سلول‌های گیاهی کاهش دهند، سیستم‌های جایگزین در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری است که توسط گروهی از آنزیم‌ها به نام آلترناتیو اکسیداز فعال می‌شوند و می‌توانند تولید ROS را کاهش دهند، زیرا همان‌طور که گفته شد، این آنزیم‌ها می‌توانند با برگرداندن جریان الکترون از طریق زنجیره‌های انتقال الکترون، از جریان الکترون‌ها برای احیای O_2 به H_2O استفاده

همچنین از آن‌جا که *PDH* و *FUM*، *IDH* از ژن‌های کلیدی چرخه کربس می‌باشند و افزایش فعالیت این ژن‌ها به تنهایی یا با همدیگر می‌تواند عامل مهم در بالا بردن میزان تحمل گیاهان به تنش خشکی باشد، از این ژن‌ها می‌توان برای افزایش تحمل به تنش خشکی استفاده نمود. به‌طور کلی نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان بیان ژن‌های *FUM*، *IDH* و *PDH* در ژنوتیپ متحمل به خشکی کلزا (SLM046) در مقایسه با ژنوتیپ حساس (Hyola308)، پس از محلول پاشی با متانول در میتوکندری افزایش معنی‌داری داشت که به‌نظر می‌رسد متانول باعث افزایش تحمل در ژنوتیپ SLM046 شده است. در ژنوتیپ حساس نیز در ساعات ابتدای تنش، میزان بیان ژن‌های گفته‌شده پس از تیمار متانول در مقایسه با گیاهان بدون محلول پاشی افزایش داشت، اما در ساعت بعدی، میزان آن کاهش یافته است. افزایش بیان ژن *TRX* در ژنوتیپ Hyola308 در هشت ساعت و در ژنوتیپ SLM046 در هشت و ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی متانول دیده شد که احتمالاً نشان دهنده کاهش H_2O_2 در مقابله با تنش خشکی در این ساعات باشد؛ بنابراین هرچه مقدار بیان این ژن‌ها در شرایط تنش خشکی بیشتر باشد، می‌توان اظهار داشت که تحمل گیاه به شرایط تنش افزایش می‌یابد. افزایش میزان بیان ژن *AOX* پس از محلول پاشی متانول فقط در ژنوتیپ Hyola308 در هشت ساعت دیده شد و به‌نظر می‌رسد که گیاه کلزا برای مقابله با تنش و راه‌اندازی مسیر آلترناتیو اکسیداز، نیازی به متانول نداشته است. با توجه به نقش *AOX* در کاهش ROS در میتوکندری، نتایج حاصل از بررسی بیان این ژن نشان می‌دهد که بیان ژن‌های *AOX* تحت تنش خشکی در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس افزایش می‌یابد؛ بنابراین ژنوتیپ SLM046 با کنترل تنظیم بیان این ژن‌ها می‌تواند اثرات ناشی از تنش اکسیداتیو را مدیریت نماید؛ این امر حاکی از نقش مهم *AOX* در سم زدایی ROS است

با توجه به اثر متانول در شرایط تنش خشکی بر میزان

احیا اکسیژن در عرض غشا درونی میتوکندری می‌شود و آن‌را به آب تبدیل می‌کند (Edreva, 2005). بنابراین کاهش *AOX* در زمان بروز تنش در ژنوتیپ حساس Hyola308، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و متعاقب آسیب سلولی را در پیش دارد. فعال شدن این ژن در ژنوتیپ مقاوم کلزا می‌تواند از تشکیل انواع اکسیژن فعال پیشگیری کند و سبب شود که فشار الکترون موجود روی زنجیره انتقال الکترونی کاهش یابد. با ارزیابی فعالیت اجزای سازنده مکانیسم‌هایی که NADPH اضافه را بدون تولید ATP (برای جلوگیری از احیای بیش از حد زنجیر تنفسی) اکسید می‌کنند، می‌توان نقاط ضعف و قوت گیاهان را از نظر بیان این ژن‌ها ارزیابی کرد. به‌طور کلی نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان بیان ژن *AOX* در ژنوتیپ متحمل به خشکی کلزا در مقایسه با ژنوتیپ حساس افزایش معنی‌داری داشت. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت این ژن‌های میتوکندریایی به تنهایی یا با همدیگر می‌تواند عامل مهمی در بالا بردن میزان تحمل گیاه کلزا به تنش خشکی از طریق خنثی‌سازی تاثیرات مضر گونه‌های فعال اکسیژن باشد (Mohsenzadeh Golafazani et al., 2017).

نتیجه‌گیری کلی

بررسی مورفولوژی هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل کلزا در شرایط محلول پاشی متانول پس از تنش قطع آبیاری نشان داد که گیاهان کلزا پس از محلول پاشی، رشد عادی خود را از سر گرفت. تنش خشکی با تغییر در میزان فتوسنتز گیاه و وضعیت آب برگ، باعث کاهش رشد گیاه می‌شود. از طرفی سلول نیز سعی می‌کند تا با اجرای تدابیر خاص (از جمله تغییر بیان ژن‌ها)، از بروز تنش اکسیداتیو پیشگیری نماید. با توجه به اهمیت ژن‌های *PDH*، *FUM*، *IDH*، *TRX* و *AOX* در کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از تنش خشکی، کاهش فعالیت ژن‌های فوق باعث تشدید تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت این ژن‌ها، باعث کاهش تنش اکسیداتیو خواهد شد و می‌توان اظهار داشت تحمل گیاه به شرایط دشوار افزایش می‌یابد.

گیاه به خشکی، نتیجه تغییر در میزان بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها، پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی با عملکردهای متفاوت و تنظیم دقیق شبکه پروتئین‌های هم بیان و برهم‌کنش پروتئین-پروتئین است. بدیهی است انجام مطالعات بیشتر بر روی کلزا می‌تواند الگوهای مولکولی مناسبی را برای شناخت مقاومت به خشکی فراهم کند.

بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، به نظر می‌رسد که متانول، کارایی مثبتی در شرایط تنش خشکی داشته است و احتمالاً با کاربرد متانول، تثبیت دی‌اکسیدکربن صورت گرفته است و تولید پراکسید هیدروژن کاهش یافته است. به‌طور کلی تحمل تنش خشکی تنها مربوط به بیان ژن‌ها، پروتئین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان خاص نیست، بلکه پاسخ کلی

REFERENCES

1. Aliakbari, M. & Razi, H. (2013). Isolation of Brassica napus MYC2 gene and analysis of its expression in response to water deficit stress. *Molecular Biology Research Communications*, 2, 63-71.
2. Armand, N., Amiri, H. & Ismaili, A. (2016). The effect of methanol on photosynthetic parameters of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under water deficit. *Photosynthetica* 54, 288-294.
3. Bai, Y., Yang, P., Su, Y.Y., He, Z.L. & Ti, X. N. (2014). Effect of exogenous methanol on glycolate oxidase and photorespiratory intermediates in cotton. *Journal of Experimental Botany* 65, 5331-5338.
4. Bartoli, C., Facundo Gomez, G., Gergoff, G., Guiamét, J. J. & Puntarulo, S. (2005). Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany* 56, 1269-1276.
5. Blum, A. (1996). Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regulation* 2, 135-148.
6. Budde, R.J. & Randall, D. D. (1990). Pea leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex is inactivated in vivo in a light-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 673-676.
7. Daloso, D. M., Müller, K., Obata, T., Florian, A., Tohge, T., Bottcher, A., Riondet, C., Bariat, L., Carrari, F. & Nunes Nesi, A. (2015). Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 1392-1400.
8. Desikan, R., Soheila, A-H., Hancock, J. T. & Neill, S.J. (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*, 127, 159-172.
9. Dos, S., Vieira, C., Cuiñé, S., Rouhier, N. & Rey, P. (2005). The Arabidopsis plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. *Plant Physiology*, 138, 909-922.
10. Dos S., Vieira, C. & Rey, P. (2006). Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science*, 11, 329-334.
11. Dudley, S. A. (1996). Differing selection on plant physiological traits in response to environmental water availability: a test of adaptive hypotheses. *Evolution*, 50, 92-102.
12. Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106, 119-133.
13. Fall, R. & Benson, A. A. (1996). Leaf methanol the simplest natural product from plants. *Trends in Plant Science* 1, 296-301.
14. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. & Basra, S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *In Sustainable Agriculture*, 29, 153-188.
15. Fernie, A., Fernando Carrari, R. & Sweetlove, L. J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 254-261.
16. Filippou, P., Antoniou, C. & Fotopoulos, V., (2011). Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of Medicago truncatula plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 270-277.
17. Foyer, C., Noctor, G. & Hodges, M. (2011). Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1467-1482.

18. Fu, A., Liu, H., Yu, F., Kambakam, S., Luan S. & Rodermel, S. (2012). Alternative oxidases (*AOX1a* and *AOX2*) can functionally substitute for plastid terminal oxidase in Arabidopsis chloroplasts. *The Plant Cell*, 24, 1579-1595.
19. Hemming, D.J.B., Criddle, R. S. & Hansen, L. D. (1995). Effects of methanol on plant respiration. *Journal of Plant Physiology*, 146, 193-198.
20. Kapoor, D., Sharma, R., Handa, N., Kaur, H., Rattan, A., Yadav, P., Gautam, V., Kaur, R., & Bhardwaj, R., (2015). Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. *Frontiers in Environmental Science*, 3, 13.
21. Kim, M. R., Khaleda, L., Jung, I. J., Kim, J. Y., Yeol Lee, S., Cha J. & Kim, W. (2017). Overexpression of chloroplast-localized *NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC)* enhances tolerance to photo-oxidative and drought stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*, 60, 175-180.
22. Lemaitre, T. & Hodges, M. (2006). Expression analysis of *Arabidopsis thaliana* NAD-dependent isocitrate dehydrogenase genes shows the presence of a functional subunit that is mainly expressed in the pollen and absent from vegetative organs. *Plant and Cell Physiology*, 47, 634-643.
23. Lemaitre, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Flesch, V., Bismuth, E., Fernie, A. R. & Hodges, M. (2007). NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of Arabidopsis suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. *Plant Physiology*, 144, 1546-1558 .
24. Li, C.R., Liang, D.D., Xu, R.F., Li, H., Zhang, Y.P., Qin, R.Y., Li, L., Wei, P.C. & Yang, J.B. (2013). Overexpression of an *alternative oxidase* gene, *OsAOX1a*, improves cold tolerance in *Oryza sativa* L. *Genetics and Molecular Research*, 12, 5424-5432.
25. Lin, M., Behal, R. H. & Oliver, D. J. (2004). Characterization of a mutation in the IDH-II subunit of the NAD⁺ dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 166, 983-988.
26. Livak, K.J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25, 402-408.
27. Maxwell, D., Yong, W. P. & McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 8271-8276.
28. Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E. & Lemaire, S. D. (2006). Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: New crosstalks to explore. *Photosynthesis Research*, 89, 225-245.
29. Mirzai, M., Moeini, A. & Ghanati, F. (2013). Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Journal of Agriculture, Science and Technology*, 15, 593-602.
30. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405-410.
31. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Breusegem, F. V. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9, 490-498.
32. Moeder, W., Pozo, O. D., Navarre, D. A., Martin, G. B. & Klessig, D. F. (2007). Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, 63, 273-287.
33. Mohsenzadeh Golafazani, M., Samizadeh Lahiji, H., & Hassani Kumleh, H. (2017). Patterns of mitochondrial gene expression in rapeseed leaves (*Brassica napus* L.) at early growth stage in response to drought stress. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 48, 67-77.
34. Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M., Hassani Kumleh, H., Samizadeh Lahiji, H., Vahedi, R. & Ramezanzadeh Bishegahi, S. (2019). The effect of iron toxicity on some of morphological traits, relative gene expression of *G6PDH* and peroxidase enzyme activity in resistant and susceptible genotypes of Rice (*Oryza sativa*). *Cereal Research*, 9, 207-220. (In Persian)
35. Mohsenzadeh Golfazani, M., Mohammad, F., Hasani Kumleh, H. & Samizadeh Lahiji, H. (2016). Grouping of some canola genotypes in various drought stress treatment in Germination Stages based on multivariate statistical methods. *Iranian Journal of Seed Sciences and Research*, 3: 53-65. (In Persian)
36. Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A., O., Loureiro, M. E., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J. & Fernie, A. R. (2005). Enhanced photosynthetic performance and growth as a

- consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology*, 137, 611-622.
37. Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J. & Fernie, A. R. (2007). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal*, 50, 1093-1106.
 38. Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., Satoh, K., Moumeni, A., Venuprasad, R., Serraj, R., Kumar, A., Leung, H., Attia, K. & Kikuchi, S. (2012). Comprehensive gene expression analysis of the *NAC* gene family under normal growth conditions, hormone treatment, and drought stress conditions in rice using near-isogenic lines (NILs) generated from crossing Aday Selection (drought tolerant) and IR64. *Molecular Genetics and Genomics*, 287, 389-410.
 39. Palatnik, J. F., Valle E. M. & Carrillo, N. (1997). Oxidative stress causes ferredoxin-NADP+ reductase solubilization from the thylakoid membranes in methyl viologen-treated plants. *Plant Physiology*, 115, 1721-1727.
 40. Pasandideh Arjmand, M., Samizadeh Lahiji, H. & Mohsenzadeh Golfazani, M. (2017). The investigation of some photorespiration genes relative expression in response to drought stress in canola (*Brassica napus*). *Crop Biotech.* 7: 31-42. (In Persian)
 41. Reichheld, J.P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G. & Meyer, Y. (2005). *AtNTRB* is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 579, 337-342.
 42. Ribas-Carbo, M., Taylor, N.L., Giles, L., Busquets, S., Finnegan, P. M., Day, D.A., Lambers, H., Medrano, H., Berry, J. A. & Flexas, J. (2005). Effects of water stress on respiration in soybean leaves. *Plant Physiology*, 139, 466-473.
 43. Rosegrant, M. W. & Cline, S. A. (2003). Global food security: challenges and policies. *Science*, 302, 1917-1919.
 44. Roslan, H. A., Salter, M. G., Wood, C. D., White, M. R. H., Croft, K. P., Robson, F., Coupland, G., Doonan, J., Laufs, P. & Tomsett, A. B. (2001). Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 28, 225-235.
 45. Rouhier, N., Santos, C. V. D., Tarrago, L. & Rey, P. (2006). Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families. *Photosynthesis Research*, 89, 247-262.
 46. Rouhier, N., Gelhaye, E., Sautiere, P.E., Brun, A., Laurent, P., Tagu, D., Gerard, J., Faÿ, E., Meyer, Y. & Jacquot, J. P. (2001). Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiology*, 127, 1299-1309.
 47. Rouhier, N., Kauffmann, B., Tete-Favier, F., Palladino, P., Gans, P., Branlant, G., Jacquot, J.P. & Boschi Muller, S. (2007). Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 3367-3378.
 48. Sabagh, A., Akbar Hossain, E.L., Barutçular, C., Islam, M. S., Ratnasekera, D., Kumar, N., Swaroop Meena, R., Sobhy Gharib, H., Saneoka, H., & Silva, J. (2019). Drought and salinity stress management for higher and sustainable canola (*Brassica napus* L.) production: A critical review. *Australian Journal of Crop Science*, 13, 88-97.
 49. Siddique, M.R.B., Hamid, A. & Islam, M.S. (1999). Drought stress effects on photosynthetic rate and leaf gas exchange of wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 40, 141-145.
 50. Sienkiewicz-Porzucek, A., Sulpice, R., Osorio, S., Krahnert, I., Leisse, A., Urbanczyk-Wochniak, E., Hodges, M., Fernie, A., & Nunes-Nesi, A. (2010). Mild reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth. *Molecular Plant*, 3, 156-173.
 51. Sulpice, R., Sienkiewicz-Porzucek, A., Osorio, S., Krahnert, I., Stitt, M., Fernie, A. R. & Nunes-Nesi, A. (2010). Mild reductions in cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in lower amino acid contents and pigmentation without impacting growth. *Amino Acids*, 39, 1055-1066.
 52. Tovar-Méndez, A., Miernyk, J. A. & Randall, D. D. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *The FEBS Journal*, 270, 1043-1049.
 53. Vahedi, R., Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M., & Samizadeh Lahiji, H. (2019). Investigation of relative expression of some genes related to iron-induced toxicity in two varieties of Rice (*Oryza sativa*). *Crop Biotech*, 9, 15-28. (In Persian)
 54. Vanlerberghe, G. C., Cvetkovska, M., & Wang, J. (2009). Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiologia Plantarum*, 137, 392-406.

55. Vassileva, V., Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., & Feller, U., (2009). Variety-specific response of wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf mitochondria to drought stress. *Journal of PLANT Research*, 122, 445-454 .
56. Vieira, D., Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis-Bourguet, E., Rouhier, N. & Rey, P. (2007). Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of Arabidopsis plastidial methionine sulfoxide reductases B. *Febs Letters*, 581, 4371-4376.
57. Zbieć, I., Karczmarczyk, S. & Podsiadło, C. (2003). Response of some cultivated plants to methanol as compared to supplemental irrigation. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 6, 1-7.
58. Zhang, G. & Xie, S. (2014). Influence of water stress on the citric acid metabolism related gene expression in the ponkan fruits. *Agricultural Sciences*, 5, 1513-1518.
59. Zirgoli, M. H & Kahrizi, D. (2015). Effects of end-season drought stress on yield and yield components of rapeseed (*Brassica napus* L.) in warm regions of Kermanshah Province. *Biharean Biologist*, 9, 133-140