زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره بیستم، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۴۷-۵۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۶/۰۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۰۸/۰۵
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲

افزایش بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز و متالوتیونین تحت تنش سرما در ارقام کلزا (*Brassica napus*)

صابر زهری * و فریبا ملکی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

کلزا (*Brassica napus*) گیاهی زراعی با ارزش اقتصادی قابل توجهی است که همواره تحمل آن نسبت به تنش‌ها مورد توجه بوده است. تنش سرما (دمای بین صفر تا ۲۰ درجه سانتیگراد) و تنش انجماد (دمای کمتر از صفر درجه سانتیگراد) می‌تواند رشد و بازده گیاهان زراعی را تحت تأثیر قرار دهد و میزان این تأثیرپذیری بستگی به نوع تنش و میزان عملکرد ژنتیکی گیاه و مکانیسم مقاومت آن دارد. در بررسی حاضر، ارقام SLMO46 و Quantum به ترتیب به عنوان ارقام مقاوم و حساس به تنش دمای پایین ارزیابی شد. از عوامل مؤثر و کارآمد در مقاومت گیاهان به تنش، میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز و متالوتیانین در بافت‌های گیاه است. فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز در بافت برگ رقم مقاوم نسبت به حساس هم درگروه‌های شاهد و هم در گروه‌های تیمار بیشتر بود و با ایجاد تنش میزان فعالیت آنزیم تا حدود دو برابر گروه شاهد افزایش نشان داد. بررسی ارقام مذکور از نظر بیان ژن‌های *Apx2* و *Mtl* نشان داد که در ارقام مقاوم، افزایش بیان ژنی با مقیاس $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به ترتیب با ۲/۱ و ۹/۱ و در رقم حساس ۱/۸ و ۵/۲ بود. بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیدازی در برگ نیز نشان دهنده میزان فعالیت بیشتر آن در رقم مقاوم بود و حدود ۶۰ درصد افزایش فعالیت آنزیمی در هر دو رقم طی تنش ثبت گردید. این داده‌ها نشان دهنده رابطه معنی‌دار بین مقاومت این گیاه نسبت به تنش سرما و عملکرد این گروه از پروتئین‌ها است.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، تنش سرمایی، کلزا، متالوتیانین، qPCR

مقدمه

گونه *Brassica napus* گیاهی با ارزش اقتصادی قابل توجهی است که در اروپا، کانادا و ایران به مقدار زیاد کشت می‌شود. کلزا با اختصاص ۱۵ درصد کل تولید روغن گیاهی در جهان، پس از سویا و نخل روغنی، مقام سوم را در بین دانه‌های روغنی به خود اختصاص داده است. در برخی از ارقام کلزا، بالغ بر ۴۸ درصد وزن خشک دانه را روغن گیاهی تشکیل می‌دهد. توانایی بذر گونه‌های کلزا برای جوانه‌زنی و رشد در دماهای پایین موجب شده است تا این گونه به

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: zahri@uma.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۵۱۵۵۱۰۸۰۱

عنوان معدود گیاهانی باشد که می‌تواند در شرایط خنک، ارتفاعات بالا و مناطق معتدله کشت شود. این گیاه در مقایسه با سایر گیاهان روغنی تا مرحله آغاز گل دهی به دمای بالا نیاز دارد، زیرا دمای کم همزمان با خشکی سبب کوچک ماندن دانه‌ها و کاهش درصد روغن می‌شود. کلزا می‌تواند محدوده وسیعی از طول دوره روشنایی را تحمل کند، به طوری که قادر است در منطقه اقیانوس منجمد شمالی با دوره‌های روشنایی روزانه ۲۴ ساعت و همچنین در مناطقی با دوره روشنایی ۸-۱۰ ساعت رشد نماید (Kimber and McGregor, 2000؛ Kole *et al.*, 2002؛ Asghari *et al.*, 2007). تنش سرما، شامل دماهای سرد (صفر تا ۲۰ درجه سانتیگراد) و انجماد (دمای کمتر از صفر درجه سانتیگراد) بر رشد و نمو و بازده گیاهان زراعی تأثیر منفی دارد. به لحاظ فیزیولوژیکی برخی از آثار این نوع تنش نظیر: کاهش موقت فتوسنتز، توقف رشد سلولی و کاهش جذب آب و مواد معدنی برگشت‌پذیر هستند و با رفع دوره سرما بهبود خواهند یافت اما برخی دیگر از آثار از جمله: نقص فتوسنتز در اثر تخریب کلروپلاست‌ها، اثر بر تنفس سلولی و پیری زودرس غیرقابل برگشت هستند. دمای پایین یا تنش سرما، به عنوان یکی از مهم ترین عوامل محیطی در رشد و نمو گیاهان اثر می‌گذارد و تولید گیاه را محدود می‌کنند. بسیاری از گیاهان مانند گیاهان مناطق گرمسیری، توانایی زنده ماندن در دماهای پایین را ندارند. در مقابل، گیاهان علفی مناطق معتدل بسته به گونه گیاهی در دماهای انجماد در دامنه ۵- تا ۳۰- درجه سانتیگراد زنده می‌مانند (Guy, 1999؛ Orvar *et al.*, 2000).

آسکوربات پراکسیداز (APX) یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو است که به عنوان سیستم دفاعی گیاهان نقش کلیدی در برابر تنش‌های مختلف دارد. آنزیم APX یک پروتئین متصل به گروه پروستیک هِم است که در آن آهن نقش مهمی را در جایگاه کاتالیتیکی ایفا می‌کند. این آنزیم نقش مهمی را در تنظیم غلظت هیدروژن پراکسید در سلول‌ها دارد و هیدروژن پراکسید را به عنوان ماده مضر برای گیاهان تجزیه می‌کند. تجزیه آسکوربات پراکسید از مسیر آسکوربات گلوتاتیون در گیاهان صورت می‌گیرد. آسکوربات به عنوان دهنده الکترون عمل می کند و نقش حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو دارد. آنزیم‌های APX به دو صورت سیتوزولی و کلروپلاستی وجود دارد، APX کلروپلاستی خود به دو نوع متصل به غشای تیلاکوئید و استرومایی تقسیم می‌شود. این آنزیم‌ها از لحاظ اسیدیته بهینه، وزن مولکولی و سوبسترا متفاوت هستند (Ishikawa *et al.*, 1997؛ Dąbrowska *et al.*, 2007). مطالعات نشان داده است که عوامل متعددی مانند تجمع ایزوتیوسیانات و روی نیز می‌تواند د رتشدید تنش اکسیداتیو نقش داشته باشد و باعث القا مسیر گلوتاتیون و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مانند آسکوربات پراکسیداز شوند (Hosseini and Pourakbar, 2013؛ Tavakoli Zanyani *et al.*, 2013). آنزیم متالوتیونین (MTL) دارای جرم مولکولی۴ تا ۸ کیلودالتون بوده، پروتئین‌های غنی از سیستئین است که می‌تواند به فلزات متصل گردد. گزارش های قبلی نشان داده است که متالوتیانین در پاسخ به تنش اکسیداتیو در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا نقش دارد. در تنش‌هایی چون

سرما، خشکی و شوری بیان ژن *Mtl* القا می شود، به ویژه تحت تنش سرما، میزان H_2O_2 افزایش می یابد که در این حالت محصول ژن *Mtl*، H_2O_2 را پاکسازی کرده، باعث حفاظت گیاه می‌شود (Lanfranco *et al.*, 2002). این پروتئین قابلیت اتصال به یون‌های فلزی فیزیولوژیک نظیر روی و مس را دارد همچنین می تواند از طریق بنیان‌های تیول با اتصال به فلزات سنگین با منشأ خارجی احتمالاً در تحمل سمّیت فلزات نیز مؤثر باشد (Perales-Vela *et al.*, 2006). برای دستیابی به کمّیت پروتئین متالوتیونین از دو روش می توان استفاده کرد بدین ترتیب که در صورت در دسترس بودن پادتن اختصاصی از طریق سنجش الیزا و در صورت تعیین دقیق ساختار و درصد محتوای سیستئین آن از طریق سنجش میزان گلوتاتیون کاهیده در حضور ۵ و ۵- دی تیو بیس -۲- نیترو بنزوییک اسید می توان استفاده کرد (Tanguy *et al.*, 2002). در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم APX2 و میزان بیان ژن‌های *Apx2* و *Mtl* در دو رقم کلزای مقاوم و حساس به سرما بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: دو رقم SLMO46 (مقاوم به سرما) و Quantum (حساس به سرما) از دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی تهیه گردید (Asghari *et al.*, 2007). بذر این ارقام در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد جوانه زده، در شرایط گلخانه‌ای در گلدان‌های مجزا و در چهار تکرار کشت داده شدند و در مرحله شش تا هشت برگی (پنج هفته)، نمونه‌های شش برگی شاهد پس از انجماد در ازت مایع به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل گردید. نمونه‌های شش برگی گروه تیمار به مدت ۲۴ ساعت تحت تنش سرما (۲- درجه سانتیگراد) قرار گرفت و برگ‌های تیمار شده نیز برای مطالعات مولکولی پس از انجماد در ازت مایع در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: برگ‌های تازه نمونه‌های شاهد و تیمار از هر دو رقم، با وزن ۱۰ میلی‌گرم در آون چینی سرد همراه با خرده شیشه و بافر Tris-HCL (۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته برابر با ۷/۸) له شدند. پس از سانتریفیوژ (مدل 5415R، شرکت Eppendorf، ساخت آلمان) به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد، فاز رویی جمع‌آوری و برای سنجش فعالیت آنزیمی به کار گرفته شد. فعالیت آنزیمی در حضور ۵۰ میلی‌مولار بافر سدیم فسفات سرد (اسیدیته=۷)، ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات، ۰/۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۰/۱ میلی‌مولار EDTA در حجم نهایی ۰/۳ میلی‌لیتر ارزیابی شد. با افزودن پراکسید هیدروژن فعالیت آنزیمی آغاز شد و جذب نمونه در طول موج ۲۹۰ نانومتر در فاصله‌های زمانی ۴۰ ثانیه ثبت شد و نتایج در ضریب خاموشی مولی cm^{-1} $mmol^{-1}$ ۲/۸ ضرب شده، فعالیت آسکوربات پراکسیداز به دست آمد (Braga *et al.*, 2009).

طراحی آغازگر: با استفاده از توالی ژن‌های *Apx2* و *Mtl* که در بانک ژنی (NCBI) ثبت شده بود و از طریق هم‌ردیف‌سازی ژن‌ها و تشخیص نواحی حفاظت شده، آغازگرهای مورد نظر طراحی گردید. ژن آکتین گیاهی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده. F: توالی رفت، R: توالی برگشت

نام ژن	توالی پرایمر	منبع
متالوتیونین (*Mtl*)	F: 5'-GCAAAATGTACCCGGACTTG R: 5'-TACAGCTGCAAGGGTCACAC	Alignment: GI: 77817369, 400381441, 400381441, 967969, 967969, 967969, 7920169, 7920169, 7920169
آسکوربات پراکسیداز II (*APX2*)	F: 5'-CATGGCACTCTGCTGGAAC R: 5'-CCAAGCTCAGAAAGCTTTTGGTG	Alignment: GI: 73761752, 73761752, 737 61752, 73761752, 73761752
بتا اکتین β-Actin	F: 5'-GCTCGACTCTGGTGATGGTGTG R: 5'-CAGCTCCGATGGTGACTTG	GI: 4139263

استخراج RNA: RNA تام برگ‌های گیاه شاهد و گیاه تیمار حاصل از سه تکرار هر دو رقم با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناژن-ایران) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده آن استخراج گردید. RNA تام حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از نظر کمّیت و کیفیت ارزیابی سپس روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شد.

سنتز cDNA: برای سنتز cDNA، ۶ میکروگرم از RNA تام به عنوان الگو تحت واکنش RT-PCR قرار گرفت. این واکنش شامل: ۰/۰۱ مولار DTT، ۰/۵میکروگرم $oligo(dt)_{18}$، ۰/۵ میلی‌مولار dNTPs (سیناژن- ایران)، ۲۰ واحد مهار کننده RNase و ۲۰۰ واحد آنزیم M-Mulv-RT (هر دو از شرکت فرمنتاز- آلمان) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به اجرا در آمد (Zahri *et al.*, 2005). مخلوط الگو و آغازگرها تا ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه تیمار و به سرعت سرد شد، سپس سایر واکنشگرها اضافه شده، به ترتیب در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۵ دقیقه و در نهایت، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه تیمارگردید. این واکنش در سه تکرار و به همراه یک واکنش فاقد آنزیم نسخه‌بردار معکوس (برای بررسی آلودگی DNA) انجام گرفت. بدین ترتیب، زنجیره نخست cDNA سنتز و به عنوان الگوی PCR به کار گرفته شد.

مطالعه کمّی بیان ژن‌های هدف: واکنش PCR real time با استفاده از الگوی زنجیره اولیه cDNA حاصل از سه تکرار و کیت PCR SYBER GREEN I kit (شرکت Qiagen، ساخت آمریکا) در دو مرحله و با دستگاه Rotor gene RG-3000 (شرکت Corbett Research، ساخت استرالیا) برای تکثیر ژن های *Apx2*، *Mtl* و Act انجام شد. واکنش qPCR طی یک برنامه دو مرحله‌ای شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و مرحله دوم شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ثانیه و ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. داده‌های حاصل از چرخه آستانه تکثیر (Noctor and Foyer, 1998) با روش ارزشیابی $2^{-\Delta\Delta CT}$ به عنوان شاخص میزان بیان نسبی ژن‌ها و طی رابطه ۱ بررسی شد (Livak and Schmittgen, 2001). در این رابطه، target، act و Ct به ترتیب نشان دهنده ژن هدف، ژن شاهد (آکتین) و چرخه آستانه است. در این روش، میزان بیان ژن‌های *Apx2* و *Mtl* بر اساس ژن آکتین به عنوان ژن خانه‌دار با بیان ثابت نرمال گردید.

رابطه ۱:

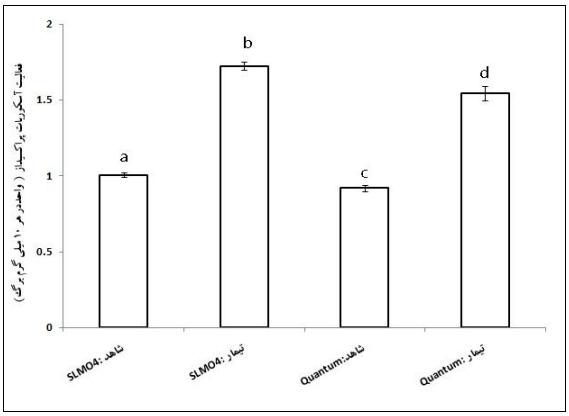
$$\Delta\Delta CT= [(Ct_{target}-Ct_{act})_{time\ x}-(Ct_{target}-Ct_{act})_{time\ 0}]$$

برای ارزیابی واکنش تکثیر، از بررسی منحنی ذوب محصول و سپس الکتروفورز در سطح آگاروز استفاده

شد. در پایان واکنش qPCR، با افزایش تدریجی دما از ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتیگراد و ثبت مستمر کاهش فلورسنس ناشی از افتراق دو رشته DNA، منحنی ذوب حاصل می‌شود. در پایان، محصول حاصل از طریق تعیین توالی تأیید گردید.

نتایج

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز در هر دو رقم SLMO46 و Quantum نشان دهنده افزایش قابل توجه در فعالیت آسکوربات پراکسیدازی استخراج بافت گیاه بود. به طوری که طی تنش سرما در ارقام SLMO46 و Quantum این فعالیت به ترتیب از ۱ به ۱/۷ و از ۰/۹ به ۱/۵ واحد در ۱۰ میلی‌گرم برگ افزایش نشان داد، به عبارت دیگر تنش به افزایش تقریبی ۶۰ درصدی در فعالیت آنزیمی عصاره برگ منجر گردیده است (شکل ۱).

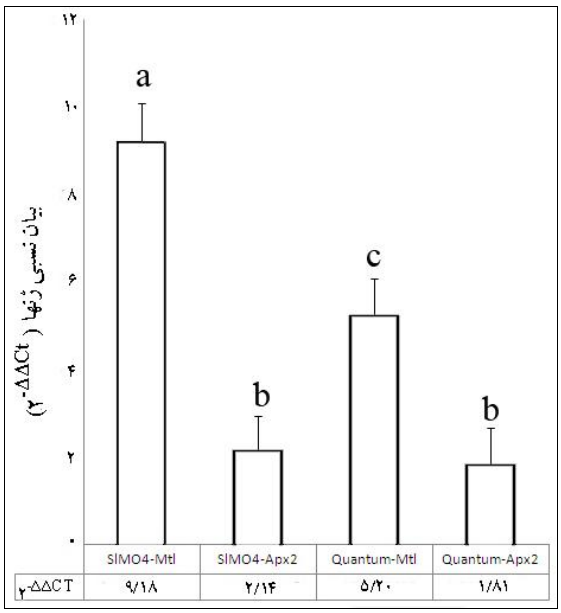


شکل ۱- مقایسه تغییر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش انجماد در دو رقم Quantum و SLMO46 که نشان دهنده افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیمی در نمونه‌های تیمار نسبت به شاهد. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± StD است، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

برای بررسی کمّی بیان ژن‌های *Apx2* و *Mtl* به عنوان ژن‌های دخیل در مقاومت گیاه به تنش، RNA تام استخراج شده، پس از ارزیابی کمّی و کیفی هدف بررسی در qPCR قرار گرفت. پیش از آنالیز داده‌های حاصل از واکنش PCR برای بررسی میزان اختصاصی بودن محصول، پیک ذوب آن مشخص گردید. نشانگر پیک اختصاصی آکتین، apx و Mtl به ترتیب در ۸۷، ۸۶ و ۸۹ درجه سانتیگراد بسته محتوای GC بود. این نتایج با بررسی در سطح ژل الکتروفورز تأیید گردید. نوار حاصل از تکثیر cDNA ژن‌های *Mtl*، *Apx2* و *Act* به ترتیب برابر با حدود ۲۰۰، ۶۰۰ و ۳۰۰ جفت باز بود.

طیف کمّی حاصل از چرخه آستانه تکثیر ژن‌های *Apx2* و *Mtl* در مقایسه با ژن شاهد (آکتین)، نشان‌دهنده افزایش میزان الگوی mRNA ژن‌های مرتبط با تنش در هردو رقم بود. بدین منظور، مقادیر Ct، ΔΔCt و $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای هر یک از ژن‌ها محاسبه گردید. این داده نشان داد که در مقیاس $2^{-\Delta\Delta Ct}$، میزان افزایش بیان ژن *Apx2* در ارقام Quantum و SLMO46 به ترتیب برابر با ۱/۸۱ و ۲/۱۴ است در حالی که میزان بیان ژن *Mtl* به ترتیب ۵/۲ و ۹/۱۸ است (شکل ۲). بررسی نمودار استانداردهای واکنش نشان دهنده دقت خط حاصل در R2>98% بود. میزان انحراف استاندارد ΔCt شش گروه آزمایشی شامل گروه‌های تیمار و شاهد برای سه ژن *Mtl*، *Apx2* و آکتین بین ۰/۰۷ تا ۱/۷ محاسبه گردید. اعمال تنش سرما در هر دو رقم کلزا باعث افزایش قابل توجه بیان ژن های *Apx2* و *Mtl* گردید اما در نمونه مقاوم میزان بیان ژن *Mtl* افزایش قابل توجهی نشان داد، به ویژه در رقم Quantum با ضریب ۹/۳ افزایش نشان داد که

احتمالاً نقش برجسته‌ای در مکانیسم مقاومت این گیاه دارد.



شکل ۲- نتایج حاصل از بررسی کمّی بیان ژن‌ها آسکوربات پراکسیداز (*Apx2*) و متالوتیونین (*Mtl*) که نشان دهنده افزایش قابل توجه در بیان هر دو ژن طی تنش انجماد بود. افزایش قابل توجه در بیان ژن متالوتیونین به ویژه در رقم SLMO4 ثبت گردید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± STD است، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

بحث

گونه فعال اکسیژن مانند رادیکال‌های آزاد اکسیژن و رادیکال‌های هیدروکسید در گیاهانی که تحت تنش‌های مختلف قرار می‌گیرند انباشته شده، به آسیب سلولی منجر می‌شوند. در گیاهان، مکانیسم‌های تجزیه گونه فعال اکسیژن متشکل از دو سیستم دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی است (Xiong *et al.*, 2002). آنزیم APX نقش مهمی در تنظیم غلظت هیدروژن پراکسید در سلول‌های گیاهی ایفا می‌کند. APX آنزیمی کلیدی در چرخه آسکوربات گلوتاتیون است که به تجزیه هیدروژن پراکسیداز منجر می‌شود. به نظر می‌رسد که القای بیان ژن *Apx* طی مرحله ابتدایی تنش اکسیداتیو نقش مهمی در حذف H_2O_2 و به حداقل رساندن خطرات اکسیداتیو نوری دارد. پیشنهاد شده است که عملکردهای H_2O_2 به عنوان پیامبر ثانویه در سلول‌های گیاهی که در معرض تنش‌های محیطی مثل سرما قرار گرفته اند عمل می‌کند. میزان بیان ژن‌های *Apx* در گیاهانی نظیر اسفناج و توت‌فرنگی که در معرض تنش سرما قرار گرفته‌اند افزایش می‌یابد (Noctor and Foyer, 1998؛ Yong *et al.*, 2008). گیاه برنج دارای دو رقم مقاوم به سرما (Xiangnuo-1) و حساس به سرما (IR-50) است. بیان ژن *Apx* در رقم مقاوم به سرما مشابه نمونه گیاهی در شرایط کنترل است اما در رقم حساس به سرما بیان ژن کاهش می‌یابد (Huang and Guo, 2005). بررسی بیان ژن *Apx2* در برگ گیاه کلزا در رقم‌های مقاوم و حساس به سرما نتایج معناداری نشان می‌دهد، به طوری که بیان ژن *Apx2* در رقم SLMO46 نسبت به رقم Quantum افزایش قابل توجهی نشان داد. دمای پایین، خشکی، شوری و عوامل ویژه نظیر: کمبود آب، پرتو اشعه فرابنفش، مکانیسم فشار، تنش شوری، دمای بالا و ... تنش‌های متداولی هستند که تأثیرات منفی بر رشد و تولید محصولات زراعی می‌گذارد. تنش سرما در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا به افزایش محصول گونه فعال اکسیژن منجر شده، به دنبال آن تنش اکسیداتیو باعث اختلال در متابولیسم سلول می‌شود (Lanfranco *et al.*, 2002؛ Xiong *et al.*, 2002). از سوی دیگر، یافته‌ها نشان داده است که که میزان رونویسی mRNA ژن متالوتیونین در گیاه آرابیدوپسیس پس از قرار گرفتن در دمای پایین افزایش می‌یابد که به افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز منجر

می‌شود (Braga *et al.*, 2009). در برنج نیز نوعی متالوتیونین Os(Mtl) شناسایی شده است که به دنبال تنش اکسیداتیو میزان بیان آن افزایش می‌یابد (Zhu *et al.*, 2009). بر اساس داده‌های موجود، به موازات افزایش تنش سرما در ارقام SLMO46 و Quantum علاوه بر تشدید بیان ژن *Apx2*، افزایش قابل توجهی در بیان ژن *Mtl* روی می‌دهد. پژوهش‌های پیشین نشان داده است که رقم SLMO46 نسبت به رقم Quantum در مقابل تنش سرما بسیار مقاوم است (Asghari *et al.*, 2007). داده‌های حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان دهنده میزان بالای بیان *Mtl* در رقم SLMO46 نسبت به رقم Quantum بود، به طوری که میزان ژن *Mtl* در رقم مقاوم به سرمای کلزا حدود دو برابر آن در رقم حساس است. این یافته‌ها و داده‌های قبلی، شاهد مهمی بر نقش ضد تنشی مسیرهای بیوشیمیایی آسکوربات پراکسیداز و متالوتیونین در گیاهان است؛ با وجود این، بیان بالای ژن‌های تنشی به ویژه *Mtl* در رقم SLMO46 می‌تواند با مقاومت بیشتر آن به تنش انجماد مرتبط باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر تأمین هزینه اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

Asghari, A., Mohammadi, S. A., Moghaddam, M. and Mohammaddoost, H. (2007) Identification of QTLS controlling winter survivalin *Brassica napus* using RAPD markers. Biotechnology and Biotechnological Equipment 21(4): 413-416.

Braga, L. F., Sousa, M. P., Ferreira, L. C., Delachiave, M. E. A., Cataneo, A. C. and Braga, J. F. (2009) Proline level and amylase and ascorbate peroxidase activity in germination of Plantago ovata forsk (plantaginaceae) seeds. Asian Research Publishing Network (ARPN) Journal of Agricultural and Biological Science 4(6): 49-54.

Dąbrowska, G., Kata, A., Goc, A., Szechyńska-Hebda, M. and Skrzypek, E. (2007) Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 49(1): 7-17.

Guy, C. (1999) Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 1(2): 231-242.

Hosseini, Z. and Pourakbar, L. (2013) Investigation of interaction between zinc and organic acid (malic acid, citric acid) on antioxidant responses in *Zea mays* L.. Iranian Journal of Plant Biology 5(16): 1-12 (in Persian).

Huang, M. and Guo, Z. (2005) Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. Biologia Plantarum 49(1): 81-84.

Ishikawa, T., Yoshimura, K., Tamoi, M., Takeda, T. and Shigeoka, S. (1997) Alternative mRNA splicing of 3'-terminal exons generates ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. Biochemical Journal 328: 795-800.

Kimber, D. and McGregor, D. I. (2000) Brassica oilseeds: production and utilization. 1st edition, CAB International, Oxford.

Kole, C., Thorman, C. E., Karlsson, B. H., Palta, J. P., Gaffney, P., Yandell, B. S. and Osborn, T. C.

(2002) Comparative mapping of loci controlling winter survival and related traits in oilseed *Brassica rapa* and *B. napus*. Molecular Breeding 9: 201-210.

Lanfranco, L., Bolchi, A., Ros, E. C., Ottonello, S. and Bonfante, P. (2002) Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. Plant Physiology 130(1): 58-67.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods, 25(4): 402-408.

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

Orvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F. and Dhindsa, R. S. (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. The Plant Journal 23(6): 785-794.

Perales-Vela, H. V., Pena-Castro, J. M. and Canizares-Villanueva, R. O. (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. Chemosphere 64(1): 1-10.

Tanguy, A., Boutet, I., Bonhomme, F., Boudry, P. and Moraga, D. (2002) Polymorphism of metallothionein genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure. Biomarkers 7(6): 439-450.

Tavakoli Zanyani, F., Shabani, L. and Razavizadeh, R. (2013) Activation of defense responses under isothiocyanate stress in oilseed rape plantlets. Iranian Journal of Plant Biology 5(16): 81-92 (in Persian).

Xiong, L., Schumaker, K. S. and Zhu, J. K. (2002) Cell signaling during cold, drought and salt stress. Plant Cell 14: S165-S183.

Yong, Z., Hao-Ru, T. and Ya, L. (2008) Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. World Journal of Agricultural Sciences 4(4): 458-462.

Zahri, S., Zamani, M. R., Motallebi, M. and Sadeghi, M. (2005) Cloning and characterization of cbhII gene from trichoderma parceramosum and its expression in *Pichia pastoris*. Iranian Journal of Biotechnology 3(4): 204-215.

Zhu, W., Zhao, D.-X., Miao, Q., Xue, T.-T., Li, X.-Z. and Zheng, C.-C. (2009) *Arabidopsis thaliana* metallothionein, AtMT2a, mediates ROS balance during oxidative stress. Journal of Plant Biology 52: 582-592.

Increment of Ascorbate peroxidase and metalothionin gene expressions by the cold stress in varieties of rape (*Brassica napus*)

Saber Zahri * and Fariba Maleki

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabili, Iran

Abstract

The rape (*Brassica napus*) is an economically valuable plant shose tolerance to stresses has always drown concern. It is well known that, the cold (0-20 °C) and freezing (<0 °C) stresses can influence growth and productivity of the farm plants and the degree of impressionability is dependent on the type of stresses, genetics of the plants and the resistance mechanisms. In this investigation, the varieties of SLMO46 and Quantum were evaluated as resistant and sensitive varieties, respectively, against low temperature stresses. One of the effective factors in plant resistance to the stresses is quantity of the ascorbate peroxidase (APX) and the metallothionein (MTL) in the plant tissues. The ascorbate peroxidase activity in the SLMO46 tissues was more than Quantum and the activity was increased about two times during the cold stress. Quantitave analysis of *Apx2* and *Mtl* genes expression according to $2^{-\Delta\Delta Ct}$ showed that the quantities were 2.1 and 9.1 in the SLMO46 and 1.8 and 5.2 in the Quantum, respectively. The data indicated that under normal condition, the enzyme activity in the resistant plants was more than the sensitive one and the stress can induce about 60% increment in the enzyme activity.

Key words: Ascorbate peroxidase, Cold stress, *Brassica napus*, Metalothionin, qPCR

* Corresponding Author: zahri@uma.ac.ir