

بررسی تغییر در فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز ترجیح دهنده DNA تک رشته‌ای،

میزان پروتئین و کلروفیل طی تنش شوری در دو رقم حساس و متحمل گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.)

شاهرخ اشرفی M.Sc.، رامین حسینی Ph.D.*، قاسمعلی گروسی Ph.D.، رحیم حداد Ph.D.، موسی مراد نژاد M.Sc.

- دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Raminh_2001@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۲۶

چکیده

هدف: این پژوهش به منظور بررسی تغییر در فعالیت آنزیم‌های نوکلئازی ترجیح دهنده DNA تک رشته ای (single stranded DNA preferring nuclease, SSPN)، میزان پروتئین و کلروفیل در گیاه جو در شرایط تنش شوری انجام شد.

مواد و روش‌ها: یک رقم متحمل (صحرا) و یک رقم حساس جو (ریحان) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تحت تیمار شوری در دو غلظت صفر و ۱۲۰ میلی مولار NaCl قرار گرفتند. آزمایش فعالیت نوکلئازی در دو pH ۵/۶ و ۷ در حضور محلول یک میلی مولار از کاتیون‌های دو ظرفیتی Ca^{2+} ، Mg^{2+} ، Zn^{2+} ، Cu^{2+} و ماده کلات کننده EDTA روی DNA تک رشته ای با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری و ژل native-PAGE صورت گرفت.

نتایج: بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به یون Ca^{2+} در تیمار ۱۲۰ میلی مولار نمک و در pH=۷ و کمترین میزان فعالیت نیز مربوط به یون Cu^{2+} در تیمار صفر میلی مولار نمک و pH=۵/۶ بود. EDTA نیز باعث توقف، یا کاهش شدید فعالیت آنزیم‌های نوکلئازی SSPN شد. در بررسی نتایج ژل، پنج آنزیم آشکار شدند که در میان آن‌ها آنزیم‌های ۵۹، ۴۷ و ۴۳ kD در هر دو pH ۵/۶ و ۷ و آنزیم‌های ۴۱ و ۳۴ kD تنها در pH=۷ آشکار شدند. غلظت یون Na^{+} در اثر تیمار شوری به طور معنی داری در هر دو رقم افزایش نشان داد. غلظت K^{+} نسبت $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$ ، میزان کلروفیل و پروتئین در اثر تنش شوری در هر دو ژنوتیپ به طور معنی داری کاهش یافت.

نتیجه گیری: تنش شوری باعث افزایش فعالیت نوکلئازی، کاهش میزان پروتئین و کلروفیل در هر دو رقم جو شد؛ اما این تغییرات در رقم متحمل نسبت به رقم حساس به طور معنی داری پایین تر بودند.

واژگان کلیدی: شوری، گیاه جو، آنزیم‌های نوکلئاز، Na^{+} ، K^{+}

مقدمه

نوکلئازها تنها از طریق اثر روی یک پیوند شیمیایی (پیوند فسفودی استر)، باعث ایجاد نظم در واکنش‌های بیوشیمیایی می‌شوند. نوکلئازها در جریان نمو موجودات پر سلولی نقش مهمی را نیز در مرگ سلولی برنامه ریزی شده بازی می‌کنند (۱). اندونوکلئازهای دخیل در مرگ سلولی در گیاهان به دو دسته اصلی اندونوکلئازهای وابسته به Zn^{2+} و اندونوکلئازهای وابسته به Ca^{2+} دسته بندی شده اند (۲). هر دو دسته اندونوکلئازها در بین اندونوکلئازهای یافت شده و در ساز و کار مرگ سلولی در گیاهان نقش دارند. برخی از تنش‌ها همچون شوری و پیری باعث افزایش بیان ژن‌های کد کننده نوکلئازها در گیاهان می‌شود. بدین منظور موراموتو و همکاران (۳) افزایش بیان ژن‌های کد کننده نوکلئازها را در برگ‌های جو تحت تنش شوری مورد بررسی قرار دادند. با استفاده از روش‌های مختلف، cDNA ژن کد کننده نوکلئاز I (Bnuc1) از برگ‌های جو تحت تنش شوری جدا گردید. لکه گذاری نوردن، افزایش تدریجی رونوشت ژن Bnuc1 را در برگ‌های جو تحت تنش شوری نشان داد (۳). در بررسی کاهش فعالیت RNase ها پس از شوک حرارتی در برگ‌های گندم و همبستگی آن با تغییرات پس از ترجمه مشخص شد که شوک حرارتی منجر به کاهش منظم در کرائی ترجمه و افزایش پایداری mRNA در گندم گردید و افزایش نیم عمر mRNA منجر به کاهش غیر مستقیم بیان ژن و یا کنترل درون سلولی فعالیت آنزیم RNase شد (۴).

DNase II نیز از جمله نوکلئازهایی است که در فرایند تخریب DNA در شرایط تنش، از جمله تنش شوری فعال می‌شود. یون کلسیم و شوری باعث افزایش فعالیت این آنزیم در پنج گونه از تیره چغندر (۵)، گوجه فرنگی و لوبیا شده است (۶ و ۷). تنش‌های مختلف اثر متفاوتی بر فعالیت نوکلئازها دارند. تنش‌های شوری و پیری باعث افزایش فعالیت نوکلئازی می‌شوند (۷). فرآیند پیری نیز در گیاهان به‌عنوان بخشی از مرگ سلولی برنامه ریزی شده تعریف شده است (۸). در سوسن یک روزه و گلبرگ‌های اطلسی، القاء فعالیت نوکلئازها، همراه با افزایش خرد شدن DNA در جریان پیری گلبرگ‌ها گزارش شده است (۹). پیری به وسیله تغییرات قابل توجهی در الگوی بیان ژن‌ها از جمله ژن‌های مربوط به نوکلئازها اتفاق می‌افتد. نوکلئاز BFN1 از جمله نوکلئازهای موجود در اربیدوپسیس و مرتبط با پیری است (۱۰). شوری خاک به دلیل جلوگیری از جذب آب و عناصر

به درون گیاه یکی از مهمترین محدودیت‌های رشد گیاهان زراعی محسوب می‌شود و به‌عنوان مشکل بزرگ کشاورزی، بالاخص در کشاورزی آبی در منابع گزارش شده است (۱۱). تنش شوری عموماً باعث تاخیر در جوانه‌زنی، کاهش درصد جوانه‌زنی، کاهش سرعت جوانه‌زنی و کاهش رشد گیاهچه می‌شود (۱۱). جو در بین غلات چه در مرحله جوانه زنی و چه در حالت گیاهچه‌ای مقاوم‌ترین گیاه زراعی به شوری است (۱۲). شوری با اثر بر مریستم انتهایی ساقه جو و تعداد برگ و سنبلچه در سنبله باعث کاهش عمل کرد می‌شود (۱۳). همچنین شوری طول دوره پر شدن دانه، ارتفاع و تعداد برگ به‌ویژه در ارقام حساس جو را کاهش می‌دهد که کاهش عمل کرد، نتیجه کاهش تعداد سنبله در هر گیاه و وزن دانه در هر سنبله خواهد بود (۱۴). اثرات مضر شوری روی رشد گیاهان ممکن است به سبب سمیت یونی باشد (بیشتر NaCl و SO_4) و تنش اسمزی که در نتیجه کمبود مواد غذایی و عدم تعادل متابولیکی رخ می‌دهد (۱۵). افزایش غلظت یون‌های نمک (کلر، کلسیم، سدیم و سولفات) در محلول خاک اثرات زیادی را به‌دنبال دارد، از جمله: کمبود آب (تنش خشکی)، سمیت یونی، از بین رفتن تعادل یونی و متراکم شدن خاک (۱۶). تجمع سدیم در نتیجه عدم تعادل در یون‌ها اتفاق می‌افتد به‌ویژه از اثرات عدم تعادل یون‌ها می‌توان علائم کمبود مواد مغذی و تخریب متابولیت‌ها را نام برد (۱۷). هر گونه اختلال در سیستم جذب و انتقال انتخابی مواد که در اثر نامناسب بودن شرایط شیمیایی خاک ایجاد می‌شود می‌تواند از طریق ایجاد نسبت نا مطلوب K^+/Na^+ روی فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه تاثیر منفی گذارد و به اصطلاح ایجاد مسمومیت کند (۱۸)، برخی گیاهان با استفاده از سازوکارهایی مانند تراوش یون‌ها به بیرون ریشه، جذب توسط سلول‌های پارانشیمی آوند چوبی، سیستم مبادله بین آوند آبکش و توزیع شیب یونی بین بخش‌های در حال رشد نمک موجود در سیتوپلاسم خود را در حد پائین نگه می‌دارند (۱۹).

از آنجا که تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز، کاهش میزان پروتئین، کلروفیل و انباشت یون‌های سدیم و پتاسیم در گیاهان مختلف می‌شود، هدف این پژوهش، بررسی اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز، میزان پروتئین و یون‌های سدیم و پتاسیم در دو رقم حساس و متحمل به شوری در گیاه جو بود. در پژوهش‌های گذشته نشان داده شده که پاسخ ارقام متحمل و حساس، به تنش شوری متفاوت است. با این

بر اساس تفاوت میزان جذب تک نوکلئوتیدهای آزاد شده در محلول در اثر فعالیت نوکلئاز، در مدت زمان تیمار شاهد و ۲۰ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، در طول موج ۲۶۰ نانومتر به صرت زیر اندازه گیری شد.

$$\text{Unit} = \Delta A_{260} / \text{mg of protein} / 20$$

ΔA_{260} تفاوت جذب در ۲۶۰ نانومتر بین زمان های صفر و ۲۰ دقیقه است.

آشکار سازی آنزیم‌های نوکلئاز روی ژل نیترو PAGED

جهت آشکار سازی آنزیم‌های SSPN از تکنیک ژل نیترو (۲۱)، استفاده شد که در آن خاصیت واسرشت کنندگی و احیا کنندگی از سیستم الکتروفورز، حذف شده بود. آشکار سازی این آنزیم‌ها در روی ژل نیترو PAGE ۱۲/۵ درصد در حضور ۱ میلی‌مولار از هریک کاتیون‌های دو ظرفیتی Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} بافر سیترات و در دو pH ۷ و ۵/۶، به‌طور جداگانه و قرار دادن ۲۰ میکروگرم از DNA تک رشته شده تیموس گاوی (سیگما)، به‌عنوان سوبسترا، در ژل و رنگ آمیزی اختصاصی توسط تولیدین بلو ۲ درصد (w/v)، انجام شد. الکتروفورز در دمای اتاق و با ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام و ۱۰ تا ۱۵ دقیقه پس از خروج خط آبی برموفنل بلو از انتهای ژل، الکتروفورز قطع شد.

اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم: جهت اندازه‌گیری محتوای سدیم و پتاسیم مقدار ۰/۱ گرم از برگ جدا شده با آب مقطر شستشو داده شد (۲۲). نمونه‌ها سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌های خشک شده آسیاب و از هر نمونه آسیاب شده به مقدار ۰/۳۰ گرم با ترازوی دقیق توزین شد. نمونه پودر شده با ۱۰ میلی‌لیتر اسید استیک (v/v) ۱۰ درصد به صورت محلول درآورده شد و به لوله‌های درب دار ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگه داری شدند، سپس به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. عصاره حاصله صاف و حجم آن با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای اندازه گیری میزان سدیم و پتاسیم از روش فلیم فوتومتری استفاده شد. برای این منظور ابتدا محلول‌های استاندارد سدیم و پتاسیم از نمک های NaCl و KCl تهیه و توسط دستگاه فلیم فوتومتر اندازه‌گیری گردید و بر این اساس منحنی استاندارد به‌دست آمد.

سنجش پروتئین کل: جهت انجام این سنجش از روش بردفورد (۲۳) استفاده شد. برای تهیه عصاره به ازای هر ۱ گرم نمونه برگی ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج با ترکیب زیر استفاده شد:

پیش فرض، تفاوت بین این دو رقم در صفات مذکور، مورد بررسی این پژوهش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای اجرای این پژوهش، از یک رقم متحمل (صحرا) و یک رقم حساس (ریحان) جو استفاده گردید. بذرها به صورت هیدروپونیک با محلول تغذیه هوگلند در اوایل پاییز در گلخانه دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) کشت گردیدند. تعداد ۳۰ عدد بذر جوانه زده در گلدان‌های ساخته شده از لوله‌های پلیکا، به طول نیم متر و عمق ۱۰ سانتی‌متر در ماسه قرار داده شدند. بذرها در غلظت‌های صفر و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم با سه تکرار کشت شدند. نمونه برداری ۴۵ روز پس از اعمال تنش شوری انجام شد. مخلوط واکنش شامل مواد زیر بود:

۳۰ میکرولیتر بافر سیترات با ۵۰۰ میلی‌مولار با pH ۵/۷ و ۷.

۳۰ میکرولیتر از محلول یک میلی‌مولار کاتیون‌های دو ظرفیتی Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}

۳۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد DNA تیموس گاوی تک رشته‌ای شده.

۳۰ میکرولیتر از محلول آلبومین سرم گاوی ۱ درصد (w/v).

۳۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی.

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نوکلئاز ترجیح دهنده توالی‌های تک رشته‌ای (Single strand preferring, SSPN nuclease) از روش بلنک و مک کیوئین (۲۰)، استفاده شد. این واکنش به صورت دوتایی انجام شد. به این صورت که تمام مواد واکنش کننده با غلظت و حجم مساوی در دو میکروتیوب ریخته شدند. سپس حجم نهایی محلول واکنش با استفاده از آب مقطر استریل به ۳۰۰ میکرولیتر رسانده شد. در تیوب اول، بلافاصله با افزودن ۱ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ۳/۴ درصد (v/v) به محلول واکنش، فعالیت آنزیمی متوقف شد و پس از ۵ دقیقه نگه‌داری روی یخ، نمونه بمدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ گردید. در تیوب دوم، واکنش آنزیمی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ گردید.

مقدار ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی هر یک از دو تیوب، به داخل یک سل کوارتز ۱ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس میزان فعالیت آنزیم،

$$Ct \text{ (mg/ml)} = (20/2 \times A_{645}) + (8/02 \times A_{663})$$

محاسبات آماری و رسم نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزارهای SAS و Excel انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و LSD در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد استفاده شد.

نتایج

فعالیت آنزیم‌های نوکلئازی SSPN، اندازه‌گیری شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر، با افزایش تنش شوری از غلظت صفر میلی مولار NaCl به ۱۲۰ میلی‌مولار به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) افزایش نشان داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در حضور یون Ca^{2+} و $pH = 7$ و غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl و کمترین میزان فعالیت آنزیمی در حضور یون Cu^{2+} در $pH = 5/6$ و غلظت صفر میلی‌مولار NaCl بود. EDTA نیز باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های SSPN شد (شکل ۱).

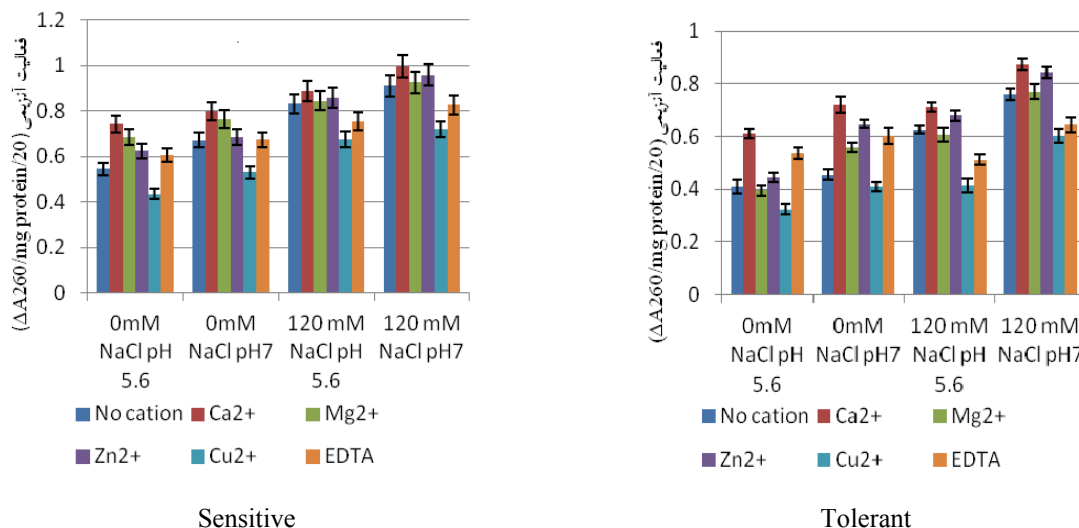
بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری کلروفیل نیز نشان داد که در اثر تنش شوری میزان کلروفیل کل در هر دو رقم متحمل و حساس به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافت، اما میزان کاهش در رقم حساس بیشتر بود (شکل ۲). تنش شوری باعث کاهش در کلروفیل b در هر دو رقم حساس و متحمل نیز شد اما این کاهش در هیچ‌یک از دو رقم معنی دار نبود.

اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم نشان داد که با افزایش تنش شوری به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) غلظت یون سدیم در رقم حساس نسبت به رقم متحمل افزایش بیشتری نشان داد (شکل ۳). میزان پتاسیم نیز با افزایش تنش شوری در هر دو رقم متحمل و حساس، کاهش یافت. رقم متحمل به دلیل داشتن پتاسیم بالا و کمتر بودن نسبت سدیم به پتاسیم (Na^+/K^+) نسبت به رقم حساس، از رشد بهتری برخوردار بود. این نسبت در بافت گیاه به‌عنوان شاخص سمیت سدیم به‌کار می‌رود زیرا پژوهشگران معتقدند که حضور سدیم باعث اختلال در فعالیت آنزیم‌های وابسته به پتاسیم می‌شود. احتمالاً سازوکار تحمل شوری در ارقام متحمل و حساس به دلیل حفظ نسبت Na^+/K^+ در بافت‌های گیاهی است. تحت تنش شوری میزان پروتئین کل در هر دو رقم حساس و متحمل کاهش یافت. رقم متحمل نسبت به رقم حساس کاهش کمتری در مقدار پروتئین داشت (شکل ۴).

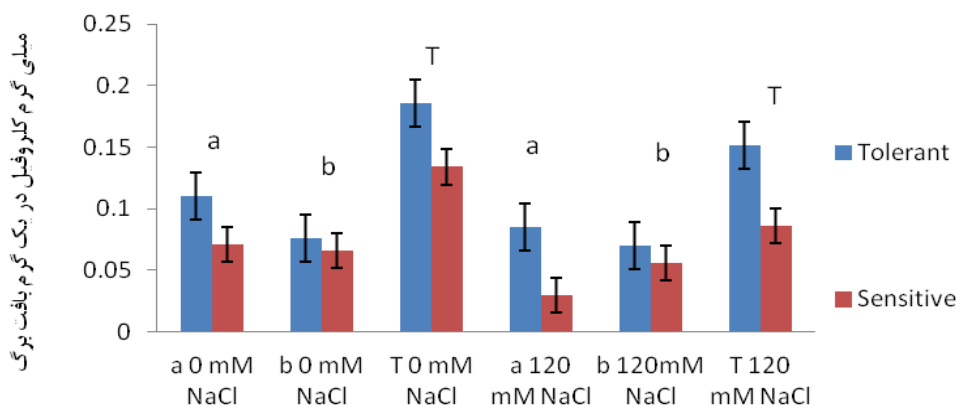
۰/۵ M Tris- HCl (pH ۷/۵)، ۰/۱۵ M NaCl، ۱ mM N-ethylmaleimide

قبل از انجام استخراج، هاون به‌مدت ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد و سپس هاون سرد روی یخ قرار داده شد. یک گرم بافت برگ که در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود همراه ازت مایع داخل هاون ریخته شد و با استفاده از دسته هاون، عمل پودر کردن بافت انجام شد. زمانی که تقریباً ۵۰ درصد بافت برگ به صورت پودر درآمد، ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج به آن اضافه شد و با ساییدن، بافت برگ به طور کامل به صورت پودر درآمد. عصاره به‌دست آمده در لوله مخصوص دستگاه سانتریفیوژ ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۴۰۰۰ rpm (سانتریفیوژ Beckman Allegra 64R) گردید. جهت سنجش میزان پروتئین، منحنی استاندارد رسم گردید. برای این کار از غلظت‌های مختلف پروتئین سرم گاوی (۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. این محلول‌های استاندارد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های فوق با یک میلی‌لیتر معرف بردفورد ۲۰ درصد مخلوط و به مدت چند دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس مخلوط واکنش در کیبوت شیشه‌ای ۱ میلی‌لیتری ریخته و میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید.

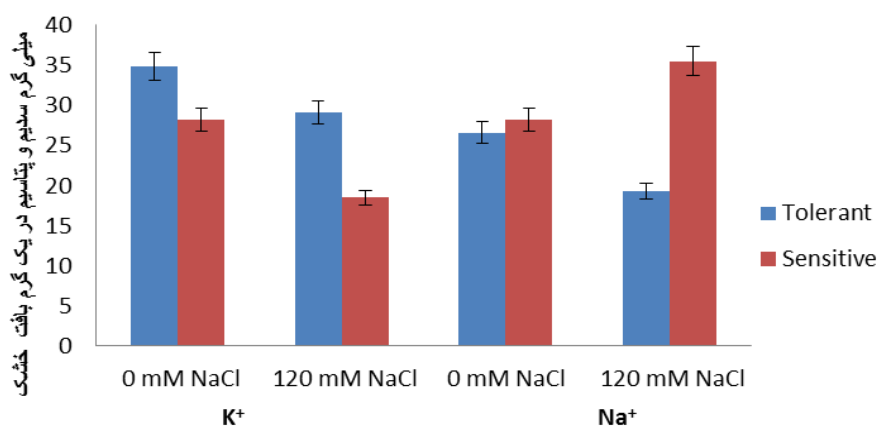
اندازه‌گیری مقدار کلروفیل: برای اندازه‌گیری کلروفیل از روش آرنون (۲۴) استفاده شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از بافت خرد شده برگ با ۸۰۰ میکرولیتر استون ۸۰ درصد، مخلوط و به آرامی ورتکس گردید. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm با میکروسانتریفیوژ، سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی برداشته و برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل استفاده گردید. قبل از شروع آزمایش دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر تنظیم و سپس با استون ۱۰۰ درصد صفر گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کلروفیل با ۹۰۰ میکرولیتر استون ۱۰۰ درصد مخلوط و داخل کیبوت شیشه‌ای ۱ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس میزان جذب آن در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد. با قرار دادن اعداد قرائت شده در فرمول زیر، مقادیر کلروفیل برگ بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.



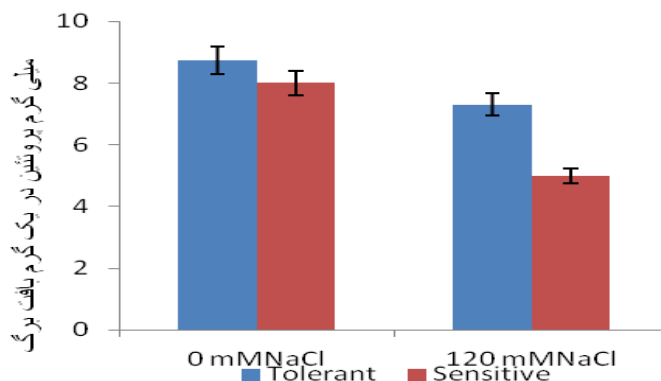
شکل ۱: اثر متقابل تنش شوری و کاتیون‌ها بر فعالیت آنزیم‌های SSPN در دو ژنوتیپ متحمل و حساس جو.



شکل ۲: تغییرات میزان کلروفیل در دو رقم متحمل و حساس جو و تنش صفر و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl در محور افقی، a کلروفیل a، b کلروفیل b و T: کلروفیل کل است.



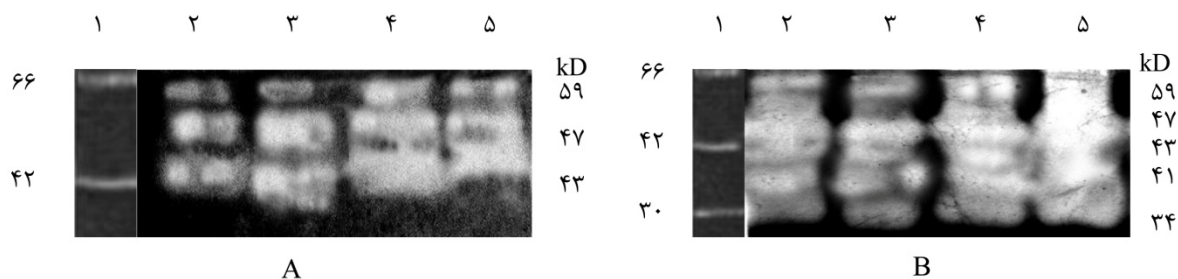
شکل ۳: تغییرات میزان نسبت سدیم به پتاسیم در غلظت صفر و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl، ۴۵ روز پس از اعمال تنش، در دو رقم متحمل (صحرا) و حساس (ریحان).



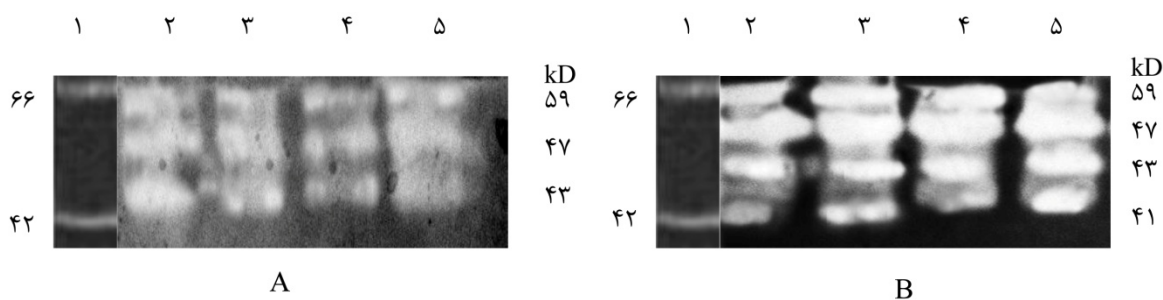
شکل ۴: تغییرات مقدار پروتئین در دو رقم متحمل و حساس جو در غلظت صفر و تنش شوری ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl، ۴۵ روز پس از اعمال تنش.

۵۹ و ۴۷ kD و در pH=۷ آنزیم‌های ۴۳، ۴۷، ۵۹ و ۴۱ kD ظاهر شدند. اما در ژنوتیپ حساس، در غلظت صفر NaCl، آنزیم ۴۱ kD مشاهده نشد. یعنی در ژنوتیپ حساس این آنزیم در اثر تنش شوری فعال شده است (شکل ۷A و B). بررسی باندهای حاصل از ژل native-PAGE در حضور یون Cu^{2+} نیز در ۵/۶ pH=۷ دو آنزیم ۵۹ و ۴۷ kD و در pH=۷ یک آنزیم ۴۳ kD را نیز نشان داد. در مقایسه با دیگر یون‌ها از فعالیت آنزیمی به شدت کاسته شد که با نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری مطابقت داشت (شکل ۸).

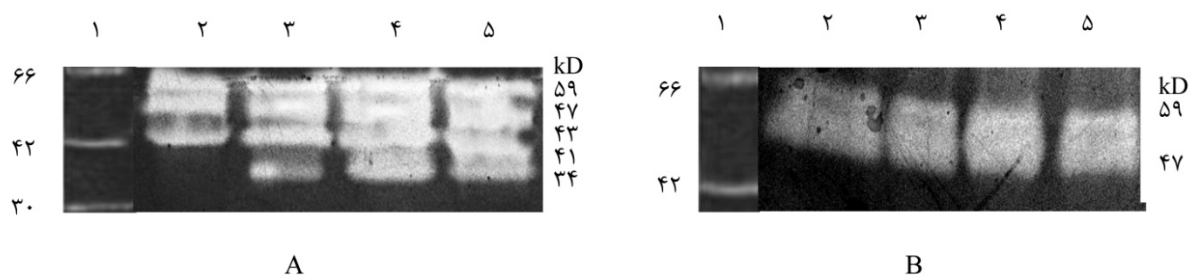
در آشکارسازی آنزیم‌های SSPN، روی ژل native-PAGE، پنج آنزیم آشکار شدند که در میان آن‌ها آنزیم‌های ۴۷، ۵۹ و ۴۳ kD در هر دو pH ۵/۶ و ۷ در حضور یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+} آشکار شدند، اما آنزیم‌های ۴۱ و ۳۴ kD تنها در pH=۷ آشکار شدند که این امر نشان می‌دهد که با افزایش pH بیان آنزیم‌های SSPN نیز افزایش می‌یابد (شکل‌های ۵ و ۶). از آنجا که هر سه آنزیم ۴۷، ۵۹ و ۴۳ kD تحت تاثیر همه یون‌ها آشکار شدند این احتمال می‌رود که این سه آنزیم، آیزوزایم یکدیگر باشند. در حضور Zn^{2+} و pH=۵/۶ دو آنزیم



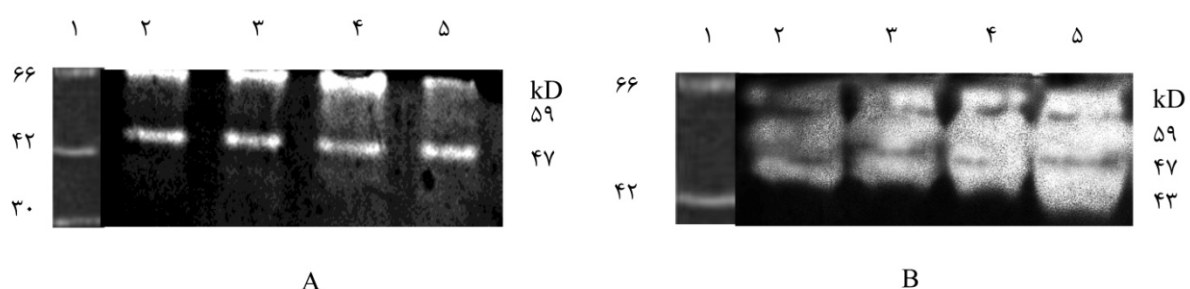
شکل ۵: آشکارسازی SSPN های وابسته به Ca^{2+} . نمونه ۱ نشان‌گر وزن ملکولی، نمونه‌های ۲ و ۳ ژنوتیپ حساس، ۴ و ۵ ژنوتیپ متحمل: به ترتیب در غلظت‌های صفر و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl. (A) ژل در بافر با pH=۵/۶ قرار داده شده و (B) ژل در بافر با pH=۷ قرار داده شده است.



شکل ۶: آشکارسازی SSPN های وابسته به Mg^{2+} . نمونه ۱ نشان‌گر وزن ملکولی، نمونه‌های ۲ و ۳ ژنوتیپ حساس، ۴ و ۵ ژنوتیپ متحمل: به ترتیب در غلظت‌های صفر و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl. (A) ژل در بافر با pH=۵/۶ قرار داده شده و (B) ژل در بافر با pH=۷ قرار داده شده است.



شکل ۷: آشکارسازی SSPN های وابسته به Zn^{2+} نمونه ۱ نشان گر وزن ملکولی، نمونه‌های ۲ و ۳ ژنوتیپ حساس، ۴ و ۵ ژنوتیپ متحمل: به ترتیب در غلظت‌های صفر و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl. (A) ژل در بافر با pH=۵/۶ قرار داده شده و (B) ژل در بافر با pH=۷ قرار داده شده است.



شکل ۸: آشکارسازی SSPN های وابسته به Cu^{2+} نمونه ۱ نشان گر وزن ملکولی، نمونه‌های ۲ و ۳ ژنوتیپ حساس، ۴ و ۵ ژنوتیپ متحمل: به ترتیب در غلظت‌های صفر و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl. (A) ژل در بافر با pH=۵/۶ قرار داده شده و (B) ژل در بافر با pH=۷ قرار داده شده است.

از آنزیم‌های نوکلئاز مشابه که در گیاهان دیگر وجود دارد می‌توان آنزیم نوکلئاز گل اطلسی HNUC1 را نام برد، که گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۴۳ kD است و با خرد شدن DNA همبستگی دارد. این آنزیم هم DNA و هم RNA را تجزیه می‌کند. pH بهینه این آنزیم ۷/۵ است (۲۹). همچنین در گیاه جو آنزیم‌های نوکلئازی با وزن مولکولی ۳۶ و ۴۳ کیلو دالتونی تحت اثر تیمار تاریکی آشکار شدند (۲۵). در بررسی پیشین ما در روی گیاه گندم که به مدت ۴۵ روز تحت تنش شوری ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl رشد داده شده بودند، آنزیم‌هایی با وزن ۴۲ و ۳۳ کیلو دالتونی مشاهده شدند. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های SSPN در pH ۵/۵ نسبت به ۷ بالاتر بود (۲۶). بررسی چهارده نوکلئاز از اندام‌های گیاهی مختلف گل کلم نشان داد که که چهار نوکلئاز وابسته به کاتیون Zn^{2+} پنج آنزیم وابسته به Ca^{2+} ، دو آنزیم وابسته به Mg^{2+} و سه آنزیم نیز وابسته به هر دو کاتیون Mg^{2+} و Ca^{2+} بودند و فعالیتشان در حضور EDTA کاهش یافت. این نوکلئازها دارای وزن مولکولی ۱۸، ۲۰، ۲۳، ۲۶، ۳۶، ۳۸، ۴۰ و ۴۵ kD و در pH=۵/۵ و ۸ فعال بودند. نوکلئاز ۳۵ و ۳۳ kD در حضور یون Zn^{2+} و pH=۵/۵، نوکلئاز ۳۶ و ۴۰ kD در حضور کاتیون Ca^{2+} و pH ۸، نوکلئاز ۴۵

همچنین در بررسی نتایج حاصل از ژل نیز آنزیم‌های با وزن مولکولی ۴۲ و ۳۶ و ۵۶ کیلو دالتونی آشکار شدند. فعالیت این آنزیم‌ها در حضور EDTA کاهش یافت. با وجود تشابه در ویژگی‌های بیوشیمیایی، تفاوت‌های مشاهده شده در وزن مولکولی احتمالاً می‌تواند نتیجه تغییر در توالی پروتئینی باشد و یا اینکه نتیجه تفاوت در پردازش پس از ترجمه در بین گونه‌ها باشند.

بحث

افزایش فعالیت نوکلئازی با نتایج بدست آمده توسط سایر محققین در بررسی اثر تاریکی بر فعالیت آنزیم‌های نوکلئازی در گیاه جو (۲۵) و اثر شوری بر فعالیت نوکلئازها در گیاه گندم مطابقت داشت (۲۶). همچنین میزان فعالیت آنزیمی در حضور یون Zn^{2+} و Mg^{2+} در pH ۷ افزایش یافت. در نتایج مشابه نیز می‌توان به افزایش فعالیت نوکلئاز وابسته به Zn^{2+} در اثر پیری در کشت سوسپانسیون سلولی برنج (۲۷)، افزایش فعالیت نوکلئاز وابسته به Zn^{2+} در اثر پیری در گندم (۲۸) و افزایش فعالیت نوکلئاز وابسته به Zn^{2+} و Mg^{2+} در اثر تنش شوری در گندم (۲۶) اشاره کرد.

DNA در طی تنش‌های مثل شوری جلوگیری گردد. به این ترتیب احتمالاً بتوان بر تحمل گیاه نسبت به تنش شوری افزود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انجام شد که به این وسیله تشکر می‌گردد.

منابع

1. Breaker RR. Molecular biology: Making catalytic DNAs. Science. 2000; 290(5499): 2095-2096.
2. Sugiyama M, Ito J, Aoyagi S, Fukuda H. Endonucleases. Plant Molecular Biology. 2000; 44: 387-397.
3. Muramoto Y, Watanabe A, Nakamura T, Takabe T. Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. Gene. 1999; 234: 315-321.
4. Chang S, Callie DR. RNase activity decreases following a heat shock in wheat leaves correlates with its posttranslational modification. 1997; 113: 1253-1263.
5. ABO-Kassem EDM. Effects of salinity: calcium interaction in growth and nucleic acid metabolism in five species of Chenopodiaceae. Turk. J. Biol. 2007; 31: 25-134.
6. Lers A, Lomaniec E, Bard S, Khalchitski A. The characterization of LeNUCI, a nuclease associated with leaf senescence in tomato, Physiologia Plantarum. 2001; 112: 176-182.
7. Eneas GF, Carmen RF, Machado L. Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl- salinity and its activation during seed germination and seedling establishment. Plant Cell Rep. 2007; 10: 299-308.
8. Rubinstein B. Regulation of cell death in flower petals. Plant Mol. Biol. 44: 303-318.
9. Xu Y, Hanson MR. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. Plant Physiol. 2000; 122: 1323-33.
10. Sarit FB, Burd S, Sonogo L, Perl TR, et al. Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death. 2008; pp. 3247-3258.
11. Ashraf M, Harris PJC. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Sci. 2004; 166: 3-16.
12. Sarmadnia GH, Koocheki A. Physiological aspects of arid cultivation. Ferdowsi Mashhad University Publication, 1989; P: 59-62.

در حضور کاتیون Mg^{2+} و pH ۸ و نوکلئازهای ۴۵، ۴۰ و ۳۶kD در حضور کاتیون های Mg^{2+} و Ca^{2+} در pH ۸ در گل کلم آشکار شدند (۳۰). همچنین در بررسی فعالیت نوکلئازها طی پیری در گیاه گندم در حضور یون‌های Mg^{2+} ، Ca^{2+} ، Zn^{2+} و عامل کلات کننده EDTA (۳۱)، فعالیت این آنزیم‌ها با افزایش pH از ۵/۵ به ۷ در حضور هر سه یون افزایش یافت.

کاهش میزان کلروفیل با مشاهدات سایر محققین (۳۲) ملیگان و همکاران (۳۳)، مبنی بر اینکه تحت تنش‌های شوری و کمبود آب، میزان تولید گونه‌های اکسیژن فعال در گیاه افزایش یافته و این مولکول‌ها موجب تجزیه ماکرومولکول‌ها و مولکول‌هایی از قبیل کلروفیل می‌شوند مطابقت دارد. همچنین کاهش در محتوای کلروفیل می‌تواند به دلیل کاهش در محتوای پتاسیم باشد (۳۴). تجمع سدیم در سلول‌ها فتوسنتز را کاهش می‌دهد و در نتیجه انتقال قندها از برگ‌های بالغ به برگ‌های جوان و ریشه کاهش می‌یابد، چون سدیم به دلیل تحرک کم در برگ‌های بالغ و پیر جمع می‌شود (۳۵). از طرف دیگر غلظت بالای سدیم در آپوپلاست باعث ایجاد تنش اسمزی و آب‌گیری سلول‌ها می‌شود (۳۴). دفع و ممانعت از جذب سدیم در سطح سلولی دو روشی هستند که به گیاه اجازه می‌دهند در تنش شوری زنده بماند (۳۶). این نتایج با مشاهدات دیگر محققین در بررسی اثر شوری بر گیاه خیار مطابقت داشت (۳۷).

در نتایج سایر محققین نیز در لوبیا (۷) و گندم (۲۶) به کاهش مقدار پروتئین در اثر تنش شوری اشاره شده است. کاهش میزان پروتئین در گیاه گوجه فرنگی نیز طی تنش شوری گزارش شده است. Doganlar و همکاران (۳۸) اعلام کردند که با قرار دادن گیاه گوجه فرنگی در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl مقدار پروتئین کاهش یافت. این کاهش در ارقام مختلف با هم تفاوت نشان داد (۳۸). کاهش میزان پروتئین و کلروفیل a در گیاهان گندم مقاوم به شوری بیشتر از گیاهان حساس مشهود بود (۳۹).

نتیجه گیری

از آنجا که نوکلئازها یکی از آنزیم‌های فعال شده در طی تنش‌های محیطی از جمله شوری هستند و نتایج این آزمایش آن را نشان داد و این که گیاه جو یک گیاه متحمل به شوری شناخته می‌شود، می‌توان با شناسایی ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها اقدام به کاهش فعالیت آن‌ها نمود تا از شکسته شدن

13. Grive GE. Leaf and spikelet primordia protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol.* 1993; 183: 517-524.
14. Esmaeli M, Babaeian NA. Photosynthetic reactions and stomatal transfer in two wheat and two barley cultivars under salt stress. The proceedings of the sixth congress in agronomy and irrigation. Babolsar. 1999; PP: 273-284.
15. Zhu JK. Salt and drought signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2002; 53: 247-273.
16. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London. Second edition. 1995; P: 647.
17. Tester M, Davenport RJ. Na transport and Na tolerance in higher plants. *Ann Bot.* 2003; 91: 503-527.
18. Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 1995; 109(3): 735-742.
19. Bohnert HJ, Jensen RG. Metabolic engineering for increased salt tolerance the next step. *Aust. Plant Physiol.* 1996; 59: 661-667.
20. Blank A, McKeon TA. Single-strand-preferring nuclease activity in wheat leaves is increased in senescence and is negatively photoregulated. *PNAS USA.* 1989; 86(9): 3169-3173.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680-685.
22. Ghareyazi B, Fotokian MH. QTL mapping of genes affecting salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite markers. *Agr. J. Iran.* 2007; 4: 361-373.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
24. Arnon DI. Copper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 1949; 24: 1-15.
25. Wood M, Power JB, Davey MR, Lowe KC, et al. Factors affecting single strand-preferring nuclease activity during leaf aging and dark-induced senescence in barley. *Plant Sci.* 1998; 131: 149-159.
26. Hatami-Gigloo S, Ghareyazie B, Hosseini R, Ghorbani M. Effects of salt stress on single strand preferring genotype dependent nucleases (SSPN) activity in wheat seeds. *Adv Biores.* 2012; 3: 53-61.
27. Hosseini, R, Mulligan, BJ. Application of rice (*Oryza sativa* L.) suspension culture in studying senescence *in vitro*. I. Single strand preferring nuclease activity. *E. J. Biotech.* 2002; 5: 42-54.
28. Blank A, McKeon TA. Three RNases in senescent and nonsenescent wheat leaves: characterization by activity staining in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Plant Physiol.* 1991; 97: 1402-1408.
29. Rennick J, Langston SB. Increases in DNA fragmentation and induction of a senescence-specific nuclease are delayed during corolla senescence in ethylene-insensitive (*etr1-1*) transgenic petunias. *J. Exp. Bot.* 2005; 56: 15-23.
30. Leśniewicza K, Pieńkowskab J, Porębac E. Characterization of nucleases involved in seedling development of cauliflower. *Journal of Plant Physiology.* 2010; 167: 1093-1100.
31. Aleksandrushkina NI, Seredina AV, Vanyushin BF. Endonuclease activities in the coleoptile and the first leaf of developing etiolated wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.* 2009; 56(2): 154-163.
32. Gong H, Zhu X, Chen K, Wang S. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pot under drought. *Plant Science.* 2005; 169(2): 313-321.
33. Milligan A, Talber S, Gates M. Salinity level and salt priming effects on Amaranth and Teff plant growth. *Plant Physiol.* 2005; 124: 1-15.
34. Munns R. Physiological process limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 1993; 16: 15-24.
35. Feng Li, XL G, Zhang FS, Tian CY, et al. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza.* 2002; 12: 185-190.
36. Levitt J. Response of plants to environmental stress; chilling freezing and high temperature Stress, 1980, Vol. 2. Academic Press, New York. P: 607.
37. Tiwari JK, Anilabh D, Kumar MR, Pandey RN, et al. Effect of salt stress on cucumber: Na⁺-K⁺ ratio, osmolyte concentration, phenols and chlorophyll content. 2010; 1:12.
38. Dognalar ZB, Demir K, Basak H, Gul I. Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. *Afr. J. Biotech.* 2010; 5: 2956-2065.
39. Amirjani MR. Comparative study of relative tolerance of chlorophyll biosynthesis and ETR of two wheat (*Triticum aestivum*) varieties in response to salt stress. *J Cell Tissue.* 2011; 1:57-67.

Investigation on Changes in Single Stranded DNA Preferring Nuclease Activity, Protein and Chlorophyll Contents During Salt Stress in Two Sensitive and Tolerant Barley Cultivars (*Hordeum vulgare* L.)

Ashrafi Sh. M.Sc., Hosseini R. Ph.D.*, Garoosi Gh.A. Ph.D., Haddad R. Ph.D.,
Moradnejad M. M.Sc.

- Imam Khomeini International University, Faculty of Engineering, Agricultural Biotechnology Department

* Email corresponding author: raminh_2001@yahoo.com

Received: 15 May. 2012

Accepted: 14 May. 2013

Abstract

Aim: This research was conducted to investigate changes in single stranded DNA preferring nuclease (SSPN) activity, protein and chlorophyll contents in barley, under salt stress.

Material and Methods: Tolerant (Sahra) and sensitive (Rayhan) barley cultivars were used in a complete random plot with a factorial design, using 3 replicates at 0 and 120 mM NaCl concentrations. Nuclease activity on ssDNA was measured at pH 5.6 and 7.0 in the presence of 1 mM of one of the following divalent cations: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} and EDTA, by spectrophotometry and native-PAGE assays.

Results: The highest enzyme activity was observed in the presence of Ca^{2+} at 120 mM NaCl and pH 7.0 and the lowest enzyme activity was observed in the presence of Cu^{2+} at 0 mM NaCl and pH 5.6. EDTA inhibited SSPN activity. In the gel assay, 5 enzymes were revealed, amongst which 59, 47 and 43 kD enzyme at both pHs and 34 and 41 kD enzymes were revealed only at pH 7.0. Na^+ content, K^+/Na^+ ratio and chlorophyll and protein contents decreased significantly upon salt stress in both cultivars.

Conclusion: Salt stress caused an increase in the nuclease activity and a decrease in protein and chlorophyll contents in both cultivars. However, these changes were significantly lower in the tolerant cultivar, compared to the sensitive one.

Keywords: Salinity, Barley, Nuclease enzymes, K^+ , Na^+