

تأثیر غرقابی بر فیزیولوژی و بیان ژن آکواپورین یک (PIP1) در فلفل

Effect of Flooding on Physiology and Expression of Aquaporin 1 (PIP1) Gene in Pepper

زینب معصومی، مريم حقيقی*

گروه باگبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده مسئول : پست الکترونیک: (mhaghghi@cc.iut.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۹/۱/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۸

چکیده

تنش غرقابی باعث کمبود اکسیژن و اختلال در فعالیت ریشه می‌شود که بخشی از این اختلال به اثرات احتمالی آکواپورین‌ها مربوط است. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای شامل گیاه تحت تنش غرقابی دارای آکواپورین فعال و گیاه تحت تنش غرقابی که فعالیت آکواپورین آن متوقف شده بود و گیاه شاهد بدون تنش در دو زمان کوتاه مدت ۴۸ ساعت و بلندمدت ۱۰ روز انجام شد. با از بین رفتن فعالیت آکواپورین وزن تر و خشک شاخصاره و ریشه کاهش یافت و مدت زمان تنش اثری بر آن نداشت. پتانسیل آب برگ و ریشه در تنش غرقابی بدون آکواپورین منفی‌تر از حالت غرقابی و شاهد بود و پتانسیل آب ریشه در تنش غرقابی بلندمدت منفی‌تر از تنش کوتاه مدت آن بود. محتوای اسیدآبسیزیک در تنش غرقابی افزایش یافت به طوری که در حضور آکواپورین در مدت طولانی باعث افزایش اسیدآبسیزیک و در عدم حضور آکواپورین در مدت کوتاه افزایش یافت. بیان ژن آکواپورین ریشه و برگ در تنش غرقابی و عدم حضور آکواپورین در بلند مدت افزایش و در کوتاه مدت کاهش یافت. به طور کلی شاخص آنتی‌اسید آکسیدان بیشتر تحت تاثیر مدت زمان تنش غرقابی گرفت. میزان پتانسیل و اسیدآبسیزیک گیاه در عدم حضور آکواپورین افزایش یافت تا باستن روزنہ محتوای آب گیاه را حفظ کند از طرفی کاروتوئینید به عنوان پیش‌ساز تولید اسیدآبسیزیک نیز افزایش یافت. به طور کلی به نظر می‌رسد حضور آکواپورین‌های ریشه در حفظ تعادل آب در فلفل در شرایط غرقابی نقش مهمی ایفا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آبسیزیک اسید، بیان ژن PIP، پتانسیل آب، روابط آبی، وضعیت روزنہ.

مقدمه

تنش غرقابی زمانی رخ می‌دهد که بستر رشدی گیاه برای یک دوره طولانی مدت آبیاری شود و یا گیاه در معرض آبیاری بیش از حد قرار گیرد که با وجود لایه‌های غیرقابل نفوذ و نبود زهکش مناسب در بستر موجب خسارت به گیاهان می‌گردد (Ashraf, 2003). این تنش از طریق ممانعت تهویه مناسب در گیاهان بسیاری از فعالیت‌های یاخته‌ای را مختل می‌کند در نتیجه بر رشد گیاهان تاثیر منفی می‌گذارد. کمبود اکسیژن در شرایط تنش غرقابی در گیاهان، باعث تهویه نامناسب خاک، تنفس کم و یا حتی عدم تنفس ریشه گیاهان می‌شود. از آنجایی که اکسیژن گیرنده نهایی الکترون در تنفس هوایی است، کمبود آن در این نوع تنش باعث بلوکه شدن انتقال الکترون و چرخه کربس می‌گردد که پیامدهای جبران ناپذیر را برای گیاه در پی خواهد داشت. یکی از مخرب‌ترین اثرات بلوکه شدن زنجیر انتقال الکترون در شرایط غرقاب، تولید گونه‌های فعال اکسیژن است که به طیف وسیعی از ماکرومولکول‌ها و غشاها یاخته‌ای آسیب می‌زنند. آسیب‌های دیگری که در اثر تنش غرقابی در گیاه ایجاد می‌شود شامل آسیب به فرآیند فتوسنترزی، روابط آبی، کاهش رشد ریشه و اندام هوایی، تداخل در تغذیه و تعادل هورمون‌ها می‌باشد (Kafi and Mahdavi Damghani, 2001). تنش غرقابی سبب اختلال در وظایف ریشه می‌شود که یکی از مهمترین آن‌ها کاهش اکسیژن در بستر و عدم دسترسی ریشه گیاه به اکسیژن کافی برای رشد است (Ashraf, 2003).

کمبود اکسیژن سبب ایجاد شرایط بی هوایی (فرایند تخمیر) و تولید اتانول و متابولیت‌های سمی می‌شود با اینباشه شدن اتانول و استالدئید رشد گیاه را از طرق مختلف مختل می‌کند مثلاً در اثر آسیب به ریشه قابلیت جذب و انتقال عناصر غذایی به اندام‌های هوایی محدود می‌شود و همچنین با کاهش تولید کلروفیل یا تجزیه آن شدت فتوسنتز کاهش یافته و منجر به کمبود کربوهیدرات‌ها در گیاه می‌گردد (Araya *et al.*, 2010). میزان کلروفیل فلورسانس نشان دهنده ظرفیت انتقال الکترون PSII است که در اثر تخریب سیستم فتوسنتزی و دگرگونی در تغییر رنگدانه‌های فتوسیستم II کاهش می‌یابد همچنین آنزیم‌های تجزیه کننده کلروفیلاز، موجب تجزیه شدن رنگدانه‌های فتوسنتزی فعال همچون کلروفیل، کاروتونئید می‌شود که با وجود تنفس غرقابی در گیاه تغییرات ذکر شده گزارش شده است (Araya *et al.*, 2010). در پژوهشی بر روی فلفل دلمه مشاهده شد که تنفس غرقابی در فرایندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیابی را در گیاهان تغییر می‌دهد، در برگ‌های گیاه فلفل تحت تنفس غرقابی، محتوای پروتئین کاهش یافت ولی محتوای پروتئین ریشه در گیاهان تحت تیمار افزایش نشان داد.

هورمون‌ها نقش بسیار مهمی در پیام رسانی یاخته‌ی بویژه در شرایط تنفس دارند. اسیدآبسیزیک یکی از مهمترین هورمون‌های گیاهی است که برای اعمال تنفس آبی برای کاهش تعرق و حفظ آب تولید می‌شود و به عنوان یک واسطه موجب کاهش حساسیت گیاه به تنفس می‌گردد (Bienert *et al.*, 2011). با افزایش هورمون اسیدآبسیزیک در یاخته‌های نگهبان روزنه، روزنه‌ها بسته می‌شوند و بدین صورت آب درون یاخته‌ای حفظ می‌شود (Bienert *et al.*, 2011). علاوه براین، پروتئین‌های اکواپورین نقش حیاتی در تنظیم دقیق حرکات آب از بخش‌های مختلف غشاء در یاخته می‌باشند که در چهار گروه تقسیم بندی می‌شوند که عبارتند از: پروتئین‌های ذاتی غشاء پلاسمای (PIPs)، پروتئین‌های درونی تونوپلاست (TIPs)، پروتئین‌های غشایی شبیه نودولین ۲۶ (NIPs) و پروتئین‌های بازی کوچک (SIPs) که براساس توالی DNA در زیر گروه‌های کوچکتری قرار می‌گیرند. پروتئین‌های ذاتی غشاء پلاسمای گیاهی را براساس توالی‌ها و فعالیت کanal آب به دو دسته PIP1 و PIP2 تقسیم می‌کنند (Bienert *et al.*, 2011).

از آنجایی که نقش آکواپورین‌ها در انتقال آب در شرایط غرقابی در گیاه مشخص نیست و بیشتر تحقیقات به نقش آن‌ها در تنفس خشکی معطوف شده است لذا هدف از این پژوهش بررسی فعالیت و میزان نقش آکواپورین‌های ریشه در گیاه فلفل دلمه‌ای و پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه، حرکت آب و تغییرات بیان ژن در اثر اعمال تنفس غرقابی می‌باشد.

مواد و روش

کشت گیاه و شرایط اعمال تنفس غرقابی

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی روی گیاه فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum L.*) رقم بی‌اس ۳۰۱ در شرایط متوسط دمای روزانه/شبانه $18/25 \pm 2$ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰ درصد در بهار در گلخانه‌های تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. تیمارها شامل عامل اول: گیاه تحت تنفس غرقابی دارای آکواپورین فعال (D_{aq}) و گیاه تحت تنفس غرقابی که فعالیت آکواپورین آن متوقف شده بود (D_{aq}-) و گیاه شاهد بدون تنفس غرقابی بود. فعالیت آکواپورین با اعمال نیترات‌جیوه به مدت ۶ ساعت در محیط ریشه متوقف شد. ابتدا بذرهای فلفل دلمه‌ای در سینی نشا حاوی بستر پرلایت و ورمی کولایت با نسبت حجمی ۱ به ۲ کشت شدند. هنگامی که برگ حقیقی نهال‌ها ظاهر شد، با شستشوی کامل ریشه به کمک آب مقطر به ظروف پلاستیکی سیاه رنگ با قطر ۱۶ و ارتفاع ۱۳ سانتی‌متر و حجم ۱ لیتر حاوی محلول غذایی Johnson انتقال یافتند (جدول ۱) و در شاهد هر ۱۵ دقیقه، به مدت ۵ دقیقه هوادهی گردید. برای اعمال تنفس غرقابی، در ابتدا برای حذف اکسیژن محلول، محلول غذایی به مدت یک هفته در ظروف کاملاً بسته و بدون اکسیژن نگهداری گردید. سپس گیاهچه ها ۴ تا ۶ برگی به ظروف منتقل شدند. سطح ظروف در محل طوقه کاملاً پوشانده شد و در محیط کشت هیدروپونیک بدون هوادهی قرار گرفتند. از آنجایی که مدت زمان اعمال تنفس بر پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه بسیار موقتاً است تنفس غرقابی در دو زمان کوتاه مدت ۴۸ ساعت و بلندمدت ۱۰ روز (عامل دوم) اعمال گردید. در غرقابی-کوتاه مدت گیاه به یکباره در معرض تنفس غرقابی قرار گرفت و پس از دو روز، نمونه گیری برای اندازه‌گیری شاخص‌های مربوطه انجام شد. به منظور

تنش غرقابی-بلندمدت، گیاه به تدریج طی سه روز با کاهش هوادهی محلول غذایی در شرایط تنش قرار گرفت و به مدت ۱۰ روز در شرایط تنش حفظ شد (Young Jang *et al.*, 2004).

جدول ۱- ترکیبات عناصر غذایی در محلول غذایی جانسون.

Table 1. Mineral compounds in Johnson's nutrient solution.

ترکیب Compound	وزن مولکولی M.W	غلظت استوک Stock conc. (M)	غلظت استوک Stock conc. (g l ⁻¹)	غلظت استوک در لیتر محلول نهایی ml stock per liter final sol.	عنصر Element	غلظت نهایی Final conc. ppm
نیترات پتاسیم <chem>KNO3</chem>	101.10	1.0	101.10	6.0	N	224
نیترات کلسیم ۴ آبه <chem>Ca(NO3)2.4H2O</chem>	236.16	1.0	236.16	4.0	K	235
آمونیوم دی‌هیدروژن‌فسفات <chem>NH4H2PO4</chem>	115.08	1.0	115.08	2.0	Ca	160
سولفات‌منیزیم ۷ آبه <chem>MgSO4.7H2O</chem>	246.49	1.0	246.49	1.0	P	62
کلرید‌پتاسیم <chem>KCl</chem>	74.55	(mM) 50	3.72	1.0	S Mg Cl	32 24 1.77
اسیدبوریک <chem>H3BO3</chem>	61.84	25	1.54	1.0	B	0.27
سولفات‌منگنز تک آبه <chem>MnSO4.H2O</chem>	169.01	2.0	0.33	1.0	Mn	0.11
سولفات روی ۷ آبه <chem>ZnSO4.7H2O</chem>	287.55	2.0	0.57	1.0	Zn	0.13
سولفات مس ۵ آبه <chem>CuSO4.5H2O</chem>	249.71	0.5	0.12	1.0	Cu	0.03
اسید مولیبدات <chem>H2MoO4</chem>	161.97	0.5	0.081	1.0	Mo	0.05
کلات آهن <chem>Fe-EDTA</chem>	346.08	50	21.53	1.0	Fe	2.80

برای توقف فعالیت آکواپورین‌ها از روش ثابت شده Jyostna و همکاران استفاده شد به این شکل که نیترات‌نقره به میزان ۵۰ میلی‌مolar به محلول غذایی اضافه گردید (Jyostna *et al.*, 2012).

اندازه گیری شاخص‌های مورفووفیزیولوژیک

طبق نظر Alexandersson مبنی بر تأثیر زمان بر فعالیت آکواپورین‌ها و پاسخ ابتدایی گیاه در این شرایط بلافارسله پس از اتمام زمان تنش غرقابی، نمونه گیری برای اندازه گیری شاخص‌های مختلف انجام شد (Alexandersson *et al.*, 2010). پس از خارج کردن گیاهان از ظروف پلاستیکی، ریشه‌ها با آب مقطر شسته و به کمک چاقوی تیز اندام هوایی و ریشه از هم جدا گردید. سپس توسط ترازوی دیجیتال وزن تر توزین شد. سپس شاخص‌های در پاکت‌های کاغذی قرار گرفتند و به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سلسیوس خشک و سپس با ترازوی دیجیتال توزین شدند. به منظور اندازه گیری کارآیی کوانتمی فتوسیستم II (Fv/Fm)، به مدت ۲۰ دقیقه برگ گره‌های میانی به وسیله گیره‌های مخصوص در تاریکی قرار داده شدند و پس از آن Fv/Fm با استفاده از دستگاه فلورسانس‌سنچ (مدل ۲۲۲RS، انگلستان) اندازه گیری شد. سبزینگی برگ از برگ‌های بالغ انتهای بوته به صورت از هر گیاه سه قرائت بر روی سه برگ مجزا (در مجموع ۹ قرائت در هر تکرار) توسط دستگاه کلروفیل‌سنچ (مدل CL-01 ساخت انگلستان) انجام و سپس میانگین آن ثبت شد. کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتینوئید، توسط حلal استون ۱۰۰٪ رنگیزه‌های فتوسنتزی استخراج گردید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UV-600A میزان جذب

نور در سه طول موج ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر به ترتیب برای کلروفیل a، کلروفیل b و در انتهای کاروتینوئید طبق فرمول زیر خوانش شد (Arnon, 1967).

$$\text{Carotenoids} = 100 \cdot (A_{470} - 3/27 \cdot \text{mg Chl. a}) - 104 \cdot (\text{mg Chl. b}) / 227$$

پتانسیل آب ریشه و برگ، در زمان بیشینه دمای هوا از برگ‌های میانی بوته و ریشه به همراه طوفه و توسط دستگاه بمب فشار یا محفظه فشاری (SKPM1405, GBR) اندازه‌گیری شد (Turner, 1988). برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ دیسک‌های برگی که از برگ سوم سه گیاه جدا و توزین شدند و وزن تر آن‌ها (FW) به دست آمد. پس از آن بلافلصله دیسک‌های برگی در آب مقطر در پتربی دیش به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. وزن اشباع دیسک‌های برگی (TW) با گرفتن آب سطحی و سپس توزین آن‌ها بدست آمد. پس از قرار دادن دیسک‌های برگی در آون ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت وزن خشک دیسک‌های برگی (DW) بدست آمد. در پایان محتوای نسبی آب برگ از رابطه زیر محاسبه گردید (Martinez *et al.*, 2004).

$$\text{Relative water content} = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$$

میزان نشتیونی دیسک برگی تهیه و سه بار با آب دیونیزه شستشو شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت میزان هدایت الکتریکی محلول توسط EC متر اندازه‌گیری شد (EC₁), بعد از آن نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس در اتوکلاو قرار داده شد و بعد از سرد شدن مجدداً EC محلول اندازه گرفته شد (EC₂). سپس با استفاده از رابطه زیر میزان نشتیونی به دست آمد (Lutts *et al.*, 1996).

$$EL = (EC_1 / EC_2) \times 100$$

وضعیت روزنه اپیدرم برگ با میکروسکوپ نوری (مدل HP-PI120-آلمان) با بزرگنمایی X۴۰ و عکسبرداری آن با دوربین متصل به میکروسکوپ (مدل Canon-DS126271 ژاپن) انجام شد.

سنجد پرولین و پتاسیم

برای اندازه‌گیری پروتئین از روش Bradford استفاده شد پس تهیه نمونه‌ها، میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانش شد و براساس مقایسه با منحنی استاندارد، غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (Bradford, 1976). برای تهیه محلول‌های پرولین استاندارد از پرولین خالص استفاده گردید. برای کالبیره کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر از غلظت‌های مختلف پرولین و از تولوئن خالص به عنوان شاهد استفاده شد و منحنی استاندارد رسم گردید. میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر پس از تهیه نمونه‌ها انجام شد و غلظت پرولین نمونه‌ها بر حسب میکرومول در گرم وزن تر نمونه محاسبه و بیان گردید (Bates *et al.*, 1973). میزان غلظت عنصر پتاسیم از نمونه‌های گیاهی خشک استفاده و در مدت ۲۴ ساعت در کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس خاکستر شدند. برای هضم نمونه‌ها از اسید کلریدریک دو مولار استفاده شد و در نهایت حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه فلیم فوتومتر (JENWAY, PFP-7) اندازه‌گیری شد (Hamada and El-Enany, 1994). میزان ترکیبات فنولیک از روش Singleton & Rossi با دستگاه اسپکتروفوتومتری با طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از شکل استاندارد میزان فنول نمونه به دست آمد (Singleton and Rossi, 1965).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

به منظور اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی به شیوه (DPPH) (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) در طول موج ۵۱۷ نانومتر از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UV-600A) ساخت کشور انگلستان) استفاده شد (Yu *et al.*, 2010). برای اندازه‌گیری محتوای آبسیزیک اسید یک گرم بافت برگ تازه، با متابول ۸۰٪ و ۱٪ گرم پلی وینیل پیرولیدون در دمای چهار درجه سلسیوس کاملاً یکنواخت و در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی جدا شد و pH آن به ۸ رسانده شد. متابول توسط خلا تبخیر و بر باقی‌مانده محلول مقدار ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه و حل گردید. این عمل دو بار دیگر تکرار شد. در انتهای به آن اتیل استات اضافه گردید و مجدداً تبخیر در خلع صورت گرفت. بررسوب باقی‌مانده یک میلی‌لیتر محلول حاوی سه درصد متابول و ۱٪ مول اسید استیک اضافه و حل گردید. سپس از صافی ۴۵٪ میلی‌متر عبور داده شد و به ستون فاز معکوس (Diamonsic, ۱۹۷۰)

C₁₈, 5µm به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر در دستگاه HPLC (Unicam-Crystal-200, UK) تزریق شد. فاز متخرک گرادیان متابول اسید استیک (۳-۹٪) با سرعت چهار میلی‌لیتر در دقیقه به همراه دتکتور استفاده شد. از استاندارد اسید آبیزیک با خلوص ۹۷/۹٪ ساخت شرکت Sigma استفاده شد تا پیک خروجی با کالیبراسیون برای سنجش نمونه‌ی استخراجی مورد استفاده قرار گرفت. براساس سطح زیر منحنی و موفقیت آن در پیک‌های خروجی مقدار نمونه مجھول استخراجی تعیین شد (Flexas *et al.*, 2006).

بررسی بیان ژن آکواپورین یک (PIP1)

در پایان آزمایش نمونه‌هایی از قسمت ریشه و برگ (سه تکرار) تهیه گردید و در ازت مایع در یخچال -۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای بررسی بیان ژن آکواپورین، استخراج RNA از نمونه‌های نگهداری شده ریشه و برگ در دمای -۸۰ درجه سلسیوس طبق دستورالعمل کیت ایرایزوول (Iraizol, RNA Biotech Co, Iran) انجام شد. سپس با الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگاروز (۱٪) و نیز ارزیابی با کمک دستگاه نانو دراپ Picodrop P200 (Alpha Biotech Ltd., Glasgow, UK) به تعیین کیفیت و کمیت RNA پرداخته شد. برای ساخت رشتہ cDNA، ۱ میکروگرم RNA کل استخراج شده با استفاده از Revert Aid M-Mulv Reverse Transcriptas (Thermo Scientific, USA)، سنتز شد. بررسی بیان ژن آکواپورین (1) با استفاده از Real time PCR accession number: JX402929.1 (PIP1) انجام شد. طراحی آغازگرها با نرم افزار 7.Oligo. انجام شد (جدول ۲). این جدول دارای توالی آغازگرها، شماره دسترسی ژن، طول pcr product، دمای اتصال در pcr. به منظور نرمال سازی بیان این ژن، از ژن اکتین (accesion number: GQ339766.1) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. در یک مخلوط واکنش ۱۰ میلی لیتر PCR، حاوی ۵ میکرولیتر SYBR Green (Gent Bio. PRK) ۱/۸ میکرولیتر آب DNase / RNase free، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۰/۲ واحد ROX انجام شد. شرایط دمایی شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ دور، ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه اعمال شد. بیان نسبی ژن آکواپورین یک (PIP1) با استفاده از روش دلتا C_T محاسبه شد (and Schmittgen, 2001).

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در Real time PCR

Table 2. Primers used in Real time PCR

نام پرایمر Primer name	دما اتصال Connection temperature	توالی پرایمرها Sequence of primers	اندازه باند (جفت باز) Band size (open pair)	شماره دسترسی ژن Gene access number
PIP1	55	F 5'-AGGGATTCTATGCAAGGACCA-3' R 5'-TGGTGGCCAAATGAACCAAG-3'	228	JX402929.1
Actin	55	F 5'-GTCCTCTCCAACCATCCAT -3' R 5'-TACTTTCTCTGTGGTGC -3'	231	GQ339766.1

واکاوی آماری

آزمایش فاکتوریل دو عامله بر پایه کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم افزار اکسل طبقه‌بندی و با برنامه آماری 8 Statestix آنالیز شدند و مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون LSD، در سطح احتمال ۵ درصد محاسبه شد.

نتایج و بحث

نتایج اصلی وجود آکواپورین بر شاخص‌های رشد نشان داد که در تنفس غرقابی میزان وزن تر شاخصاره در حضور و عدم فعالیت آکواپورین کاهش یافت در حالی که وزن خشک فقط در تنفس غرقابی با فعالیت آکواپورین کاهش یافت. وزن تر ریشه در عدم حضور آکواپورین و وزن خشک در تنفس غرقابی کاهش یافت. تنفس غرقابی بر شاخص سبزینگی و کلروفیل a و b تاثیر

معنی داری نداشت. تنفس بلندمدت موجب بیشترین میزان کلروفیل a و b شد و بر شاخص سبزینگی تاثیر معنی داری نداشت (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر تنفس غرقابی بر شاخص رشدی و فیزیولوژیک فلفل دلمهای در شرایط حضور و عدم حضور آکواپورین.

Table 3. The effect of flooding stress on the growth and physiological index of sweet pepper at presence and inactivity of aquaporine.

تیمار Treatment	وزن تراحتی Shoot fresh weight (g)	وزن خشک Shoot dry weight (g)	وزن خشک Root dry weight (g)	وزن ریشه Root fresh weight (g)	فلورسانس Chlorophyll fluorescence (Fv/Fm)	شاخص سبزینگی Chlorophyll index (SPAD)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg g ⁻¹ FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg g ⁻¹ FW)
شاهد Control	5.92 ^a	0.69 ^a	3.46 ^a	0.20 ^a	0.82 ^a	51.13 ^a	1.146 ^a	2.32 ^a
غرقابی Flooding	2.84 ^b	0.22 ^c	2.95 ^a	0.06 ^b	0.82 ^a	47.18 ^a	1.057 ^a	2.37 ^a
غرقابی بدون aq Flooding-aq	4.29 ^b	0.50 ^a	0.68 ^b	0.20 ^a	0.82 ^a	54.85 ^a	0.83 ^a	1.79 ^a
مدت زمان تنفس Duration of stress								
بلندمدت Long time	5.45 ^a	2.97 ^a	1.05 ^a	0.21 ^a	0.82 ^a	51.65 ^a	1.448 ^a	2.94 ^a
کوتاه مدت Short time	3.25 ^b	1.75 ^b	0.83 ^a	0.10 ^b	0.81 ^a	50.45 ^a	0.574 ^b	1.38 ^b

در هر ستون، میانگین هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

Means with same letters in each column are no significantly different at 5% level

عدم فعالیت آکواپورین باعث کاهش پتانسیل آب ریشه و ساقه (منفی تر) و تنفس غرقابی با حضور آکواپورین باعث افزایش آن شد و محتوای نسبی آب برگ در تنفس غرقابی افزایش اما در عدم حضور آکواپورین کاهش یافت. نشت یونی و پرولین تفاوت معنی داری نداشت اما میزان پروتئین کل در تنفس غرقابی و خصوصاً عدم حضور آکواپورین کاهش یافت. مدت زمان تنفس به جز پتانسیل آب ریشه که در تنفس ناگهانی کاهش یافت در سایر صفات اثر معنی داری نداشت (جدول ۴).

اثرات اصلی تنفس نشان داد غلظت پتانسیل در تیمار غرقابی عدم حضور آکواپورین کاهش و ظرفیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن آکواپورین برگ در آن افزایش یافت در حالی که محتوای اسید آبسیزیک و بیان ژن آکواپورین ریشه در تنفس غرقابی بدون فعالیت آکواپورین کاهش یافت. محتوای فنول و میزان کاروتونوئید برگ به ترتیب افزایش و کاهش در تنفس غرقابی در حضور و عدم حضور آکواپورین داشت. در تنفس کوتاه مدت میزان کاروتونوئید و محتوای اسید آبسیزیک برگ علاوه بر بیان ژن آکواپورین ریشه کاهش یافت (جدول ۵).

جدول ۴- تاثیر تنش غرقابی بر برخی صفات فیزیولوژیک فلفل دلمه‌ای در شرایط حضور و عدم فعالیت آکواپورین.

Table 4. The effect of flooding stress on some physiological traits of sweet pepper when the aquapurine is activated or inactivated.

پروولین Prolin ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$)	پروتئین کل Total protein ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$)	نشت یونی Electrolyte leakage (%)	محتوای نسبی آب Relative water content (%)	پتانسیل آب Root water potential (MPa)	پتانسیل آب برگ Leaf water potential (MPa)	پتانسیل آب تیمار Treatment
20.05 ^a	0.51 ^a	43.21 ^a	66.81 ^b	-4.83 ^c	-3.03 ^b	شاهد
19.78 ^a	1.32 ^b	34.16 ^a	83.32 ^a	-6.48 ^b	-4.25 ^b	Control غرقابی
19.80 ^a	0.50 ^c	32.73 ^a	63.65 ^b	-10.53 ^b	-21.00 ^a	Flooding غرقابی بدون aq-Flooding
مدت زمان تنش Duration of stress						
19.69 ^a	0.43 ^a	38.96 ^a	70.69 ^a	-9.46 ^a	-10.35 ^a	بلندمدت Long time
19.72 ^a	0.46 ^a	34.453 ^a	71.82 ^a	-5.10 ^b	-8.50 ^a	کوتاه مدت Short time

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Means with the same letters in each column are no significantly different at $P\text{-value} \leq 0.05$.

جدول ۵- تاثیر تنش غرقابی بر برخی شاخص‌های تنشی در فلفل دلمه‌ای در شرایط حضور و عدم فعالیت آکواپورین.

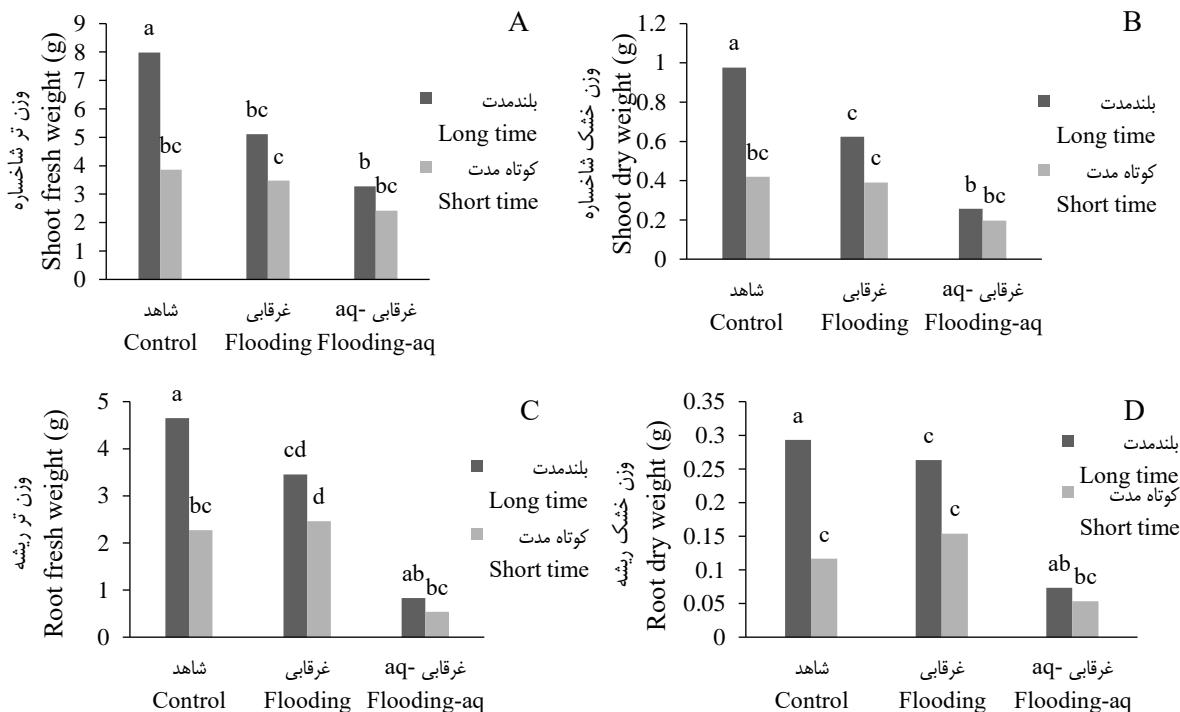
Table 5. The effect of flooding stress on some stress indexes in sweet pepper when the aquapurine is activated or inactivated.

بيان ڙن آکواپورین Rishه PIP1 expression in roots	بيان ڙن آکواپورین برگ ABA ($\text{mg g}^{-1}\text{gr}$ Fw)	محتوای اسید‌آسیزیک Carotenoid ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$)	ظرفیت آنتی اکسیدانی Total Antioxid ant (%)	محتوای فنول Phenol (mg g^{-1} FW)	غله‌لت پتانسیم Potassium ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$)	تیمار Treatment
1.25 ^c	1.07 ^a	15.93 ^c	23.27 ^a	57.43 ^b	24.04 ^b	شاهد Control
3.64 ^a	0.51 ^b	38.37 ^a	19.24 ^b	56.13 ^b	31.28 ^a	غرقابی Flooding
2.42 ^b	0.95 ^a	36.27 ^b	17.94 ^b	60.26 ^a	35.50 ^a	غرقابی بدون aq-Flooding
مدت زمان تنش Duration of stress						
3.18 ^a	0.96 ^a	32.40 ^a	23.99 ^a	59.90 ^a	16.68 ^a	بلندمدت Long time
1.68 ^b	0.73 ^a	27.98 ^b	16.32 ^b	55.99 ^a	23.20 ^a	کوتاه مدت Short time

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Means with common letters in each column are no significantly different at $P\text{-value} \leq 0.05$.

برهمکنش تنش غرقابی و مدت زمان اعمال تنش نشان داد که با از غیرفعال شدن آکواپورین وزن تر و خشک شاخصاره و ریشه کاهش یافت و مدت زمان تنش اثری بر آن نداشت (شکل ۱ الف-د). قابل توجه است که شاهد تنش کوتاه مدت نسبت به بلند مدت به دلیل زمان کمتر رشد دارای وزن تر و خشک شاخصاره و ریشه کمتری نسبت به شاهد طولانی مدت دارد و این تفاوت به دلیل مدت زمان رشد گیاه است (شکل ۱ الف-د).

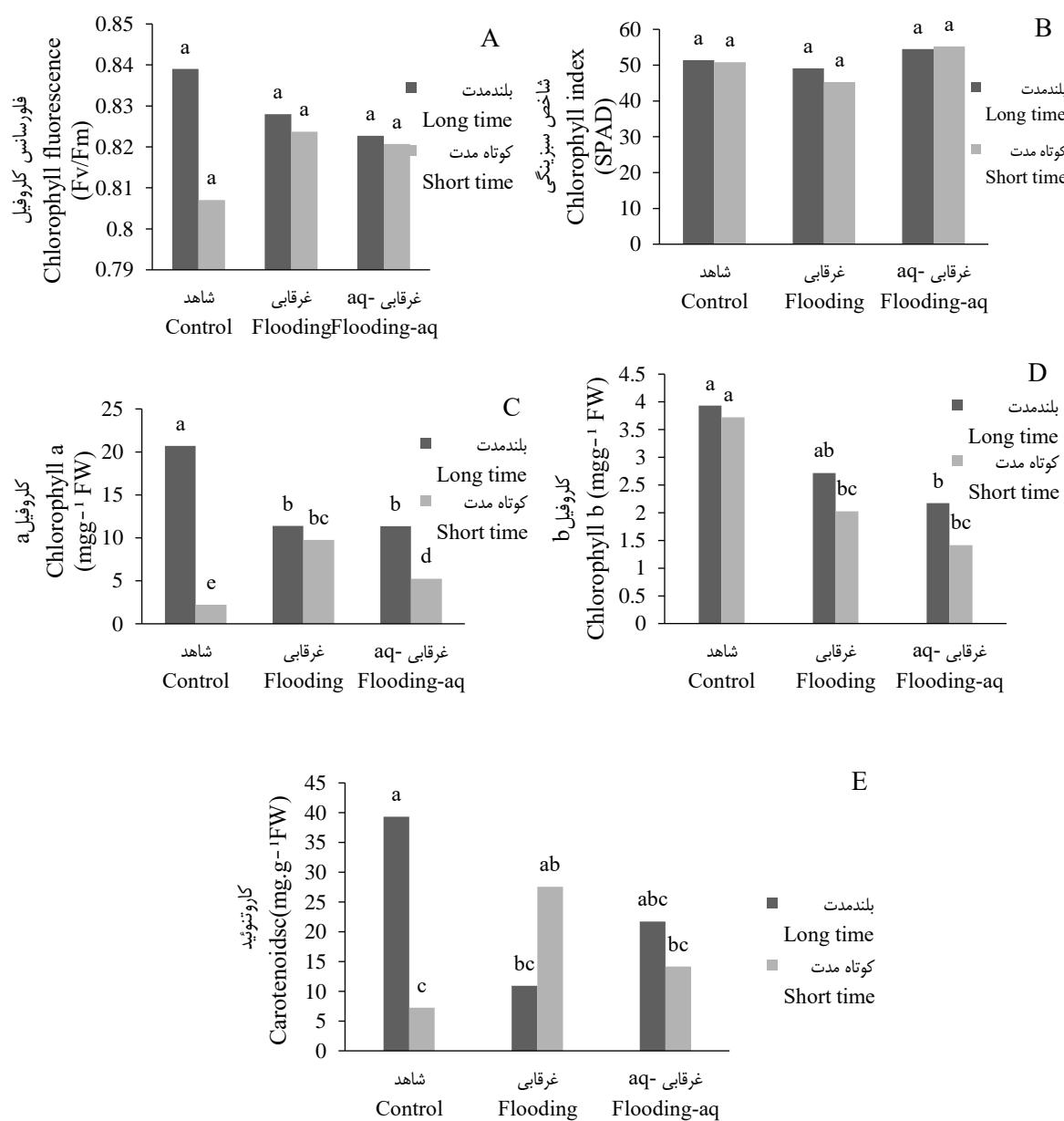


شکل ۱- برهمکنش تنش غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکواپورین ریشه به صورت کوتاه مدت و بلندمدت بر میزان وزن تر شاخصاره (A)، وزن خشک شاخصاره (B)، وزن تر ریشه (C)، وزن خشک ریشه (D) فلفل دلمه‌ای. در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig. 1. Effect of flooding stress when the aquapurine is activated or inactivated in short time and long time on the shoot fresh weight (A), shoot dry weight (B), root fresh weight(C), and root dry weight (D) of sweet peppers. Means with common letters in each column are no significantly different at $P\text{-value} \leq 0.05$.

طبق نتایج حاصل از اثر تنش اعمال شده میزان وزن تر شاخصاره به دلیل کاهش آب جهت انتقال مواد غذایی به اندام هواخورد یافت. همچنین در وزن تر و خشک ریشه در تنش خشکی طی هر دو زمان به دلیل تلاش بیشتر گیاه برای جذب آب بیشتر میزان رشد ریشه را افزایش داد اما در تنش غرقابی به دلیل قرار گرفتن ریشه در شرایط بی‌هوایی میزان رشد ریشه کاهش یافت و این کاهش تدریجی در جهت حفظ آب بیشتر برای مقابله با تنش مشاهده شد اما به دلیل اعمال تنش ناگهانی بر گیاه در کوتاه مدت گیاه توانایی رشد بیشتر ریشه را نشان نداد. کاهش ویژگی وزن خشک ریشه در شرایط تنش می‌تواند به این دلیل باشد که کمبود آب در گیاه سبب کاهش پتانسیل اسمزی محلول غذایی می‌شود و بنابراین یاخته‌های ریشه نمی‌توانند آب موردنیاز برای رشد گیاه را جذب کنند؛ بنابراین در گیاه جذب برخی عنصرهای غذایی محلول در آب محدود و درنتیجه رشد و نمو گیاه و وزن خشک کل به دلیل نقص در سوخت و ساز گیاه کم می‌شود. روند عمومی که گیاهان در شرایط تنش خشکی با آن روبرو هستند کاهش تولید وزن تر و خشک گیاه است (Farooq *et al.*, 2009). راندمان تولید گیاه تحت تنش خشکی شدیداً به فرآیندهای دسته‌بندی مواد و توزیع موقعی بیوماس (زیست توده) مرتبط می‌شود (Urban *et al.*, 2017).

برهمکنش تیمارها تاثیری بر شاخص سبزینگی و فلورسانس کلروفیل نداشت و کلروفیل b را در دو زمان اعمال تنش و حضور و عدم حضور آکواپورین کاهش داد. کارتوئید در تنش غرقابی در حضور آکواپورین در تنش کوتاه مدت افزایش و در شاهد کاهش یافت. کلروفیل a در شاهد و تنش غرقابی بدون حضور آکواپورین در تنش کوتاه مدت کاهش یافت (شکل ۲).



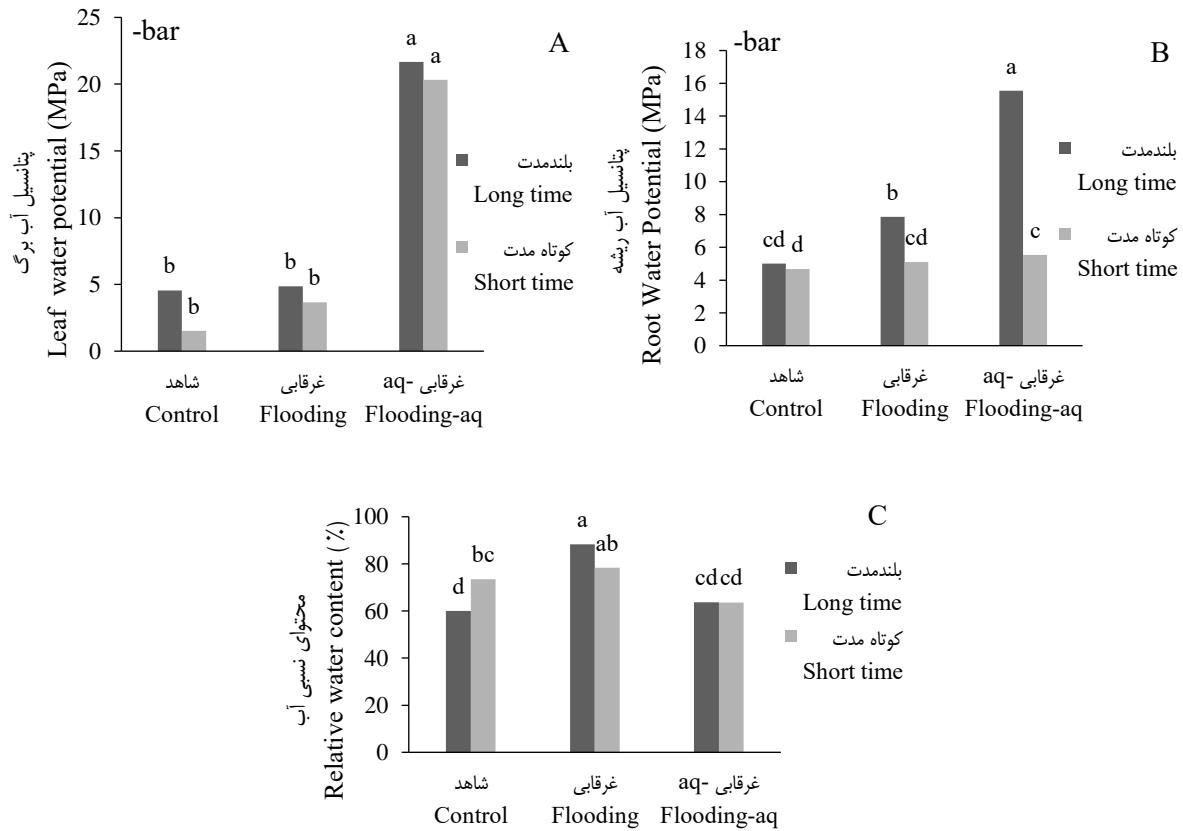
شکل ۲- برهمکنش تنش غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکواپورین ریشه به صورت کوتاه مدت و بلندمدت بر میزان فلورسانس کلروفیل (A)، شاخص سبزینگی (B)، کلروفیل a (C)، کلروفیل b (D) و کارتوئید (E) فلفل دلمه‌ای. در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دارند.

Fig. 2. Effect of flooding stress when the aquaporine is activated or inactivated in short time and long time on chlorophyll fluorescence (A), chlorophyll index (B), chlorophyll a (C), chlorophyll b (D), and carotenoids (E) of sweet peppers. Means with common letters in each column are no significantly different at $P\text{-value} \leq 0.05$.

یکی از دلایل کاهش فتوسنترز، عدم انتقال مواد فتوسنترزی است که تحت تاثیر تنش خشکی قرار گرفته و موجب اشباع شدن برگ‌ها از این مواد می‌شود و فتوسنترز را محدود می‌کند. تنش خشکی ضمن کاهش سطح برگ، پیری آن‌ها را هم تسريع نموده

و بدین وسیله می‌تواند میزان رشد را بیشتر از آنچه به علت اثرات ناشی از کاهش فتوسنتر خالص تقلیل می‌یابد، کاهش دهد (Vaidya *et al.*, 2015). همچنین در تحقیقات انجام شده برروی آبیشن نشان داد که تنفس رطوبتی شدید باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی می‌شود (Alavi Samani *et al.*, 2013). ریشه‌ها اولین اندام گیاه هستند که اثرات تنفس غرقابی را تجربه می‌کنند و پس از آن اندام‌های هوایی تحت تأثیر تنفس قرار می‌گیرند (Dat *et al.*, 2004). کمبود اکسیژن هوا در خاک در شرایط غرقابی باعث عدم دسترسی گیاه به اکسیژن کافی برای رشد ریشه می‌شود بنابراین سیستم ریشه‌های دچار اختلال شده و گیاه نمی‌تواند آب را به خوبی جذب کند و در نتیجه باعث پzmردگی و کاهش نرخ فتوسنتر گیاه می‌شود. در حالت غرقابی اگرچه فقط ریشه گیاهان خشکی‌زی در معرض کمبود اکسیژن محیطی قرار می‌گیرند ولی به کل اندام‌های گیاه آسیب می‌رسد. از عوارض آن می‌توان به کاهش رشد ریشه و در نهایت کاهش رشد اندام هوایی، عملکرد و اجزای عملکردی اشاره نمود (Acosta *et al.*, 2005). در پژوهشی، Issarakraisila و همکاران گزارش کردند که تنفس غرقابی سطح برگ‌ها، تعداد برگ و وزن خشک کل اندام هوایی را در کلم معمولی کاهش داد (Issarakraisila and Turner, 2007).

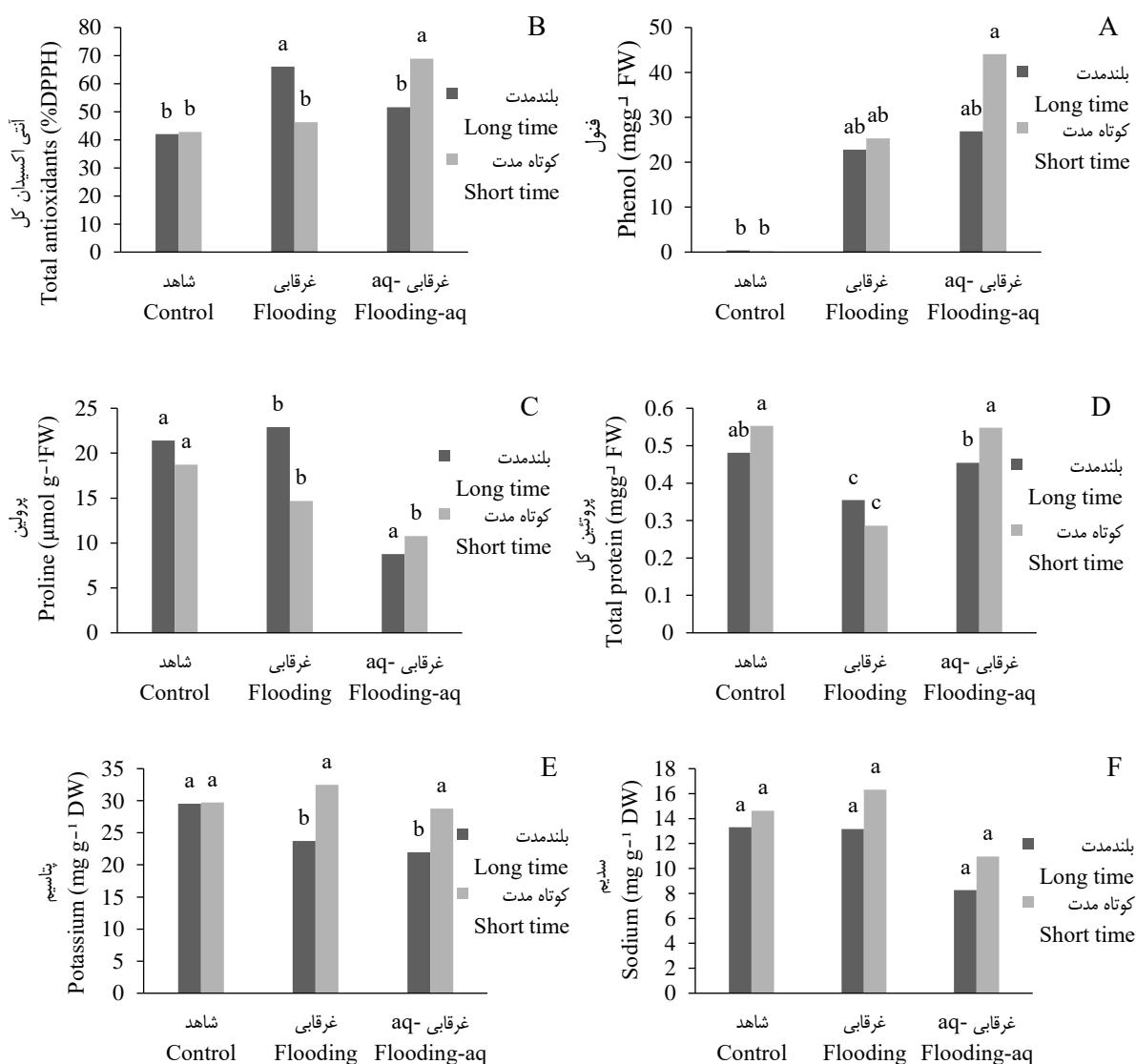
پتانسیل آب برگ و ریشه در تنفس غرقابی بدون آکواپورین منفی تر از حالت غرقابی و شاهد بود و فقط پتانسیل آب ریشه در تنفس غرقابی بلندمدت منفی تر از تنفس کوتاه مدت آن بود اما در تیمارهای دیگر این دو زمان اعمال تنفس تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل ۳ الف و ب). محتوای نسبی آب برگ در تنفس غرقابی در هر دو زمان اعمال تنفس پس از غرقابی و عدم فعالیت آکواپورین و شاهد بود (شکل ۳ پ)



شکل ۳- برهمکنش تنفس غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکواپورین ریشه به صورت کوتاه‌مدت و بلندمدت بر میزان پتانسیل آب برگ (A) و ریشه (B)، محتوای نسبی آب (C) فلفل دلمه‌ای. در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دارند.

Fig. 3 Effect of flooding stress at the presence and absence of root aquaporin activity in short time and long time on Leaf water potential (A), root water potential (B) and relative water content (C) sweet peppers. Means with common letters in each column are no significantly different at $P\text{-value} \leq 0.05$.

میزان پرولین در تنفس غرقابی و عدم حضور آکواپورین پس از تنفس غرقابی شاهد بود و در تنفس طولانی مدت بیش از کوتاه مدت در عدم حضور آکواپورین بود اما پروتئین تغییر معنی داری نشان نداد (شکل ۴). ظرفیت آنتی اکسیدانی و پتاسیم در بین تیمارها تفاوت معنی داری نداشت اما تحت تاثیر زمان تنفس قرار گرفت به طوری که ظرفیت آنتی اکسیدان با افزایش مدت زمان تنفس در تنفس غرقابی افزایش و در تنفس غرقابی بدون آکواپورین در مدت کوتاهی افزایش یافت اما میزان پتاسیم در مدت کوتاه تنفس افزایش معنی داری داشت. میزان فنول در تنفس غرقابی در حضور و عدم حضور آکواپورین افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود در شرایط ناگهانی تنفس بدون آکواپورین رسید (شکل ۴-۵).



شکل ۴- برهمکنش تنفس غرقابی در حضور و عدم حضور آکواپورین ریشه به صورت کوتاه مدت و بلند مدت بر فنول (A)، آنتی اکسیدان کل (B)، پرولین (C)، پروتئین کل (D)، پتاسیم (E)، سدیم (F) فلفل دلمه‌ای. در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دارند.

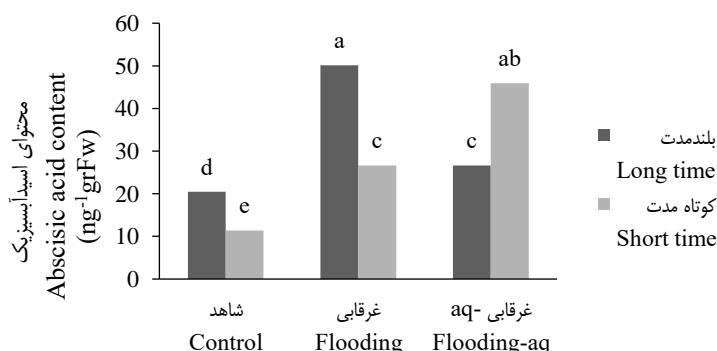
Fig. 4. Effect of flooding stress at the presence and absence of root aquaporin activity in short time and long time on phenol (A), total antioxidants (B), proline (C), total protein (D), potassium (E), sodium (F) sweet peppers. Means with common letters in each column are no significantly different at $P\text{-value} \leq 0.05$.

غرقاب شدن از طرق مختلف بر رشد و نمو گیاه تاثیرگذار است که عبارتند از: ۱) اثر بر قابلیت جذب و انتقال عناصر غذایی به اندام‌های هوایی، برای مثال کاهش قابلیت جذب نیتروژن برای گیاه در خاک به دلیل هدر رفتن آن از طریق فرآیند

نیترات‌زادایی و بروز کمبود نیتروژن در گیاه، ۲) تولید اتانول و متابولیت‌های سمی برای گیاه پس از غرقاب شدن بر اثر کمبود اکسیژن، در ریشه‌های گیاه متابولیسم بی‌هوازی (فرایند تخمیر) انجام می‌شود و سبب تشکیل و انباسته شدن اتانول و الکترات می‌گردد که به رشد گیاه آسیب می‌زند (Ashraf, 2003). در متابولیسم بی‌هوازی (فرایند تخمیر) انرژی کمتری تولید می‌شود که سبب مختل شدن وظایف یاخته‌های گیاه می‌گردد. کاهش تولید کلروفیل یا تجزیه آن سبب کاهش شدت فتوسنتز و بروز کمبود کربوهیدرات‌ها در گیاه می‌گردد که رشد گیاه را کم می‌کند و غرقاب شدن خاک از ساخت و انتقال هورمون‌های سیتوکینین و جیبریلین به اندام‌های هوایی جلوگیری می‌کند؛ در نتیجه رشد گیاه کاهش می‌یابد (Araya *et al.*, 2010).

کنترل ورود و خروج آب از عرض غشا بسیار حائز اهمیت است. با توجه به تنوع آکواپورین‌ها، کنترل عبور آب به شیوه‌های مختلفی صورت می‌گیرد که می‌توان آن‌ها در دو گروه جای داد: یکی تنظیم فعالیت آکواپورین‌ها (با تغییرات ساختاری و باز و بسته شده منفذ آن‌ها) و دیگری تنظیم تراکم آکواپورین‌ها در غشا (با تغییر در بیان زن و همچنین جابه‌جایی درون‌یاخته‌ای آن‌ها) معمولاً آکواپورین‌ها را کانال‌های همیشه باز در نظر می‌گیرند؛ اما انواعی از آکواپورین‌ها به ویژه در گیاهان و مخمر دارای دریچه هستند. مطالعاتی که در ارتباط با آکواپورین اسفناج (PIP2) صورت گرفته است، نشان می‌دهد که منفذ این آکواپورین در پاسخ به شرایط کم‌آبی یا غرقابی بسته می‌شود (Ishikawa *et al.*, 2005). تنظیم تراکم آکواپورین‌ها در غشای پلاسمایی که با جابه‌جایی درون‌یاخته‌ای و همچنین تغییر در بیان زن آن‌ها اتفاق می‌افتد، روش دیگری برای کنترل عبور آب از غشای یاخته‌هast. هنگامی که زنجیره پلی‌پپتیدی مونومر آکواپورین در شبکه آندوپلاسمی زیر ساخته می‌شود، همان‌جا شکل سه‌بعدی خود را به دست می‌آورد؛ سپس از کنار هم قرار گرفتن چهار مولکول آکواپورین، ساختاری تترامر تشکیل می‌شود (Jang *et al.*, 2004).

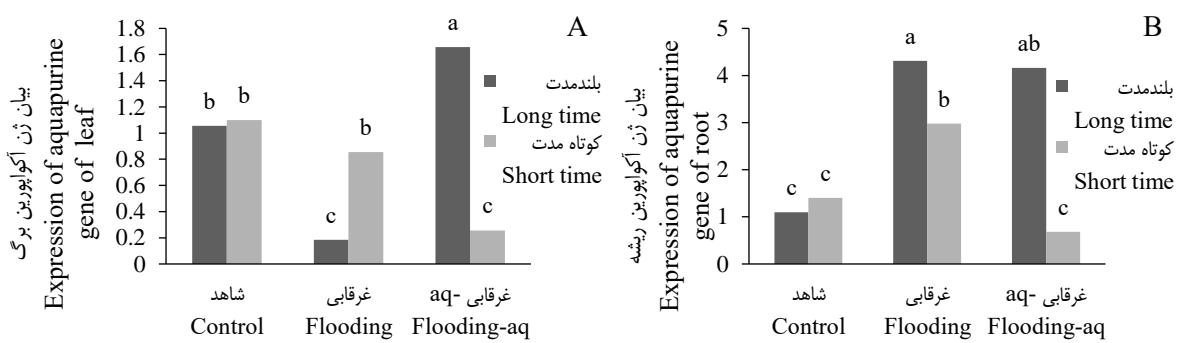
محتوای اسید‌آبسیزیک در تنفس غرقابی افزایش یافت و مدت زمان تنفس در شرایط تنفس در حضور و عدم حضور آکواپورین اثر بر عکس داشت بطوریکه در حضور آکواپورین در مدت طولانی باعث افزایش اسید‌آبسیزیک و در عدم حضور آکواپورین در مدت کوتاه افزایش یافت (شکل ۵).



شکل ۵- برهمکنش تنفس غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکواپورین ریشه به صورت کوتاه‌مدت و بلندمدت بر میزان آبسیزیک اسید برگ فلفل دلمه‌ای. در هر سوتون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig. 5. Effect of flooding stress at the presence and absence of root aquaporin activity in short time and long time on Abscisic acid content of sweet peppers. Means with common letters in each column are no significantly different at $P\text{-value} \leq 0.05$.

بیان زن آکواپورین ریشه و برگ در تنفس غرقابی و عدم حضور آکواپورین در بلند مدت افزایش و در کوتاه مدت کاهش یافت اما در تنفس غرقابی روند مشابهی نداشت یعنی بیان زن آکواپورین برگ در کوتاه مدت و در ریشه در بلند مدت بیشتر بود (شکل ۶).

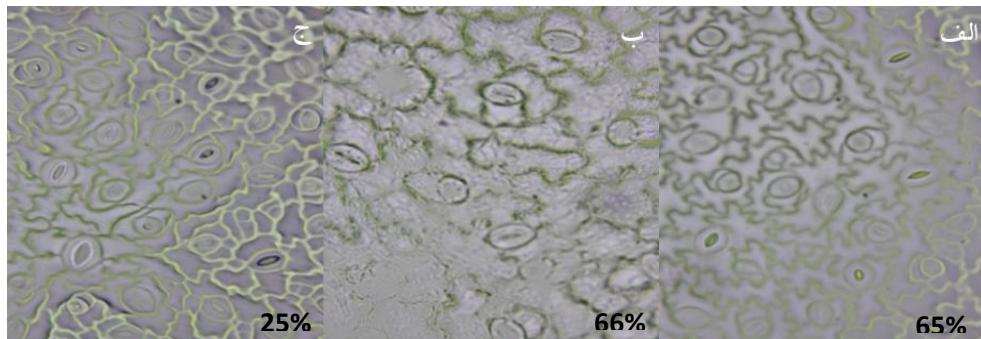


شکل ۶- برهمکنش تنش غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکواپورین ریشه به صورت کوتاه‌مدت و بلندمدت بیان ژن برگ (A) و ریشه (B) فلفل دلمه‌ای. در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig. 6. Effect of flooding stress at the presence and absence of root aquaporin activity in short time and long time on of aquaporin leaf gene (A) and root gene (B) sweet peppers. Means with common letters in each column are no significantly different at $P\text{-value} \leq 0.05$.

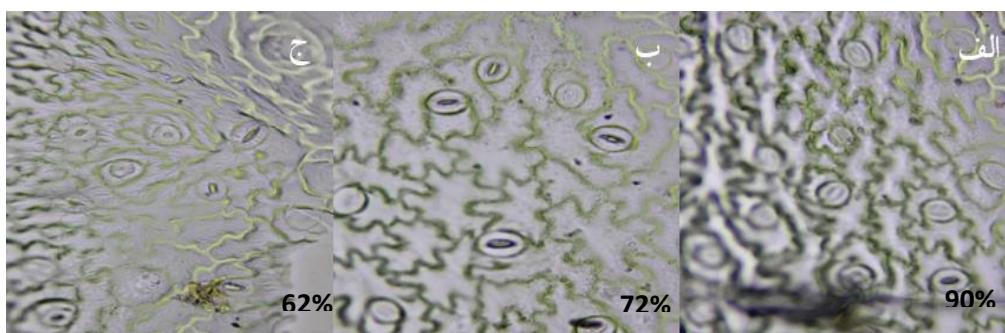
اسیدآبسیزیک به عنوان یک هورمون در سیگنالینگ تنش خشکی نقش مهمی در تنظیم محتوای و فعالیت چندین *PIP* دارد. با این حال، پیشنهاد شده است که پاسخگویی ژن *PIP* به تنش آب و اسیدآبسیزیک متفاوت است که نشان می‌دهد تنظیم ژن *PIP* شامل مسیرهای سیگنالینگ مستقل از اسیدآبسیزیک در طول کمبود آب می‌باشد. علاوه بر این، ارزیابی بیان *PIP*‌ها در شرایط خشکسالی شبیه سازی شده، با توجه به مدت زمان و شدت تنش در بین ایزوفرم‌ها، تغییری را در سطح رونویسی آن‌ها مشاهده شده است، در حالی که بیان برخی *PIP*‌ها به طور قابل توجهی افزایش یافته بود، در حالی که دیگر آکواپورین‌ها بدون تغییر یا تنظیم بودند. همچنین می‌تواند گیاه را به مقاومت در برابر آسیب ناشی از خشکسالی، اختلال تعادل اسمزی و مهار فرآیندهای فیزیولوژیک کمک کند. به عنوان مثال، خطوط ترانس ژنیک با بیان MaPIP1؛ به تنش‌های مرتبط با آب مقاوم هستند و با داشتن محتوای پرولین بالاتر در برگ‌ها و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید و آسیب‌های غشایی و بهبود تنظیم اسمزی مشخص می‌شوند. علی‌رغم این یافته‌ها، ارتباط بالقوه بین نقش آکواپورین‌ها در تنظیم وضعیت آب گیاه و بیان ژن‌های تنظیم آن‌ها مشخص نیست. بعضی از آکواپورین‌ها به طور سازنده بیان می‌شوند در حالی که بیان دیگران توسط محرك‌های مختلف مانند مرحله رشد، هورمون‌ها یا شرایط محیطی نامطلوب مانند خشکی و شوری تنظیم می‌شود. *PIP*‌های گیاهی بر اساس توالی‌ها و فعالیت کanal آب می‌توان به دو دسته عمده، *PIP1* و *PIP2* تقسیم کرد، پروتئین *PIP2* سطح بالایی از فعالیت کanal آب را در تحملک‌های *Xenopus* و حنجرهای مخمر نشان می‌دهد؛ در حالی که پروتئین *PIP1* اغلب دارای نفوذپذیری نسبتاً کم به آب است. تجزیه و تحلیل جهش‌های آرابیدوپسیس نشان داده است که AtPIP1,2 می‌تواند بخش قابل توجهی از حمل و نقل آب انتقال دهد. بررسی ژن‌های آکواپورین در آرابیدوپسیس نشان داد که رونویسی *PIP* تحت تنش خشکی در برگ معمولاً به صورت تدریجی تنظیم می‌شوند، به استثنای AtPIP1;4 و AtPIP2;5 که تنظیم شده است (Postaire *et al.*, 2010). اما بسیاری از آکواپورین‌ها سطح پایین‌تر رونویسی در برگ‌ها را نسبت به ارگان‌های دیگر نشان دادند. جالب توجه است، که ژن زیرخانواده CsNIP، در بافت خاصی نیست و نشان دهنده این نکته است که آن‌ها در حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی، مانند حمل و نقل مواد مغذی یا عنصر عمل می‌کنند. بیان متفاوت در همان زیرخانواده با داده‌های آرابیدوپسیس و سایر گیاهان موفق است (Nguyen *et al.*, 2013). کمبود آب ممکن است عوامل رونویسی و ترجمه آکواپورین را تحریک کند (Johanson *et al.*, 2001). تنش خشکی بر روی هدایت هیدرولیکی ریشه اثر منفی دارند انتقال آب یاخته به یاخته در پاسخ به تنش خشکی در ریشه‌ها به شدت کاهش یافته است، این پدیده نشان می‌دهد که کanal‌های آب نوع *PIP* می‌تواند به طور مستقیم درگیر شود. بنابراین، رونویسی NtPIP در ریشه گیاهان توتون و تنباقو تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد. پس از تنش کوتاه مدت میزان بیان ژن *PIP1* در ریشه گیاه تنباقو کاهش یافت (Mahdieh *et al.*, 2009). نتایج یافته‌ها یک فرضیه را ایجاد می‌کنند که At PIP1 می‌تواند نقش ویژه‌ای را برای جذب آب باقیمانده تحت تنش خشکی که با تنظیم اسمزی برای انتقال بسترهای خاص

مانند انتقال مولکول‌های مانند گلیسرول، قندها، اسیدهای آلی یا آب برای محافظت از گیاهان از خشکسالی بازی کند. *PIP* به هدایت مزو菲尔 و در نتیجه تأثیر بر میزان فتوستنتز و میزان انتقال دی‌اسیدکربن دارد. تجزیه و تحلیل ترانس ژنیک گیاهان تنباکو، برنج و آرابیدوپسیس در شرایط آب و هوایی، نشان می‌دهد که کاهش سطح بیان آکوپورین سبب سرکوب جذب دی‌اسیدکربن خالص شد، در حالی که بیان بیش از حد جذب را کاهش داد (Flexas *et al.*, 2006). ایزوفرم‌های خاص آکوپورین بسته به نوع، تنش و مدت زمان آن، تنظیمات بالا و پایین را نشان می‌دهد. در تنش طولانی مدت فعالیت بالاتر آکوپورین‌ها مشاهده شد که سبب جبران کمبود آب می‌شود (Bienert *et al.*, 2011). طی مطالعات انجام شده بر روی ۵ رقم گیاه آرابیدوپسیس، نشان داد ۱۳ ایزوفرم‌های ژن *PIP1* تحت تنش خشکی میزان بیان متفاوتی داشتند (Alexandersson *et al.*, 2010). تنش کوتاه مدت باعث اثر منفی بر وضعیت رشد و فتوستنتز گیاه می‌گذارد (Oliveira, 2004). ابتدا با کاهش قابل توجه میزان بیان ژن‌های آکوپورین در گیاه انگور، برنج و آرابیدوپسیس تحت تنش خشکی- طولانی مدت و متعاقب آن افزایش مقادیر بیان بعد از یک هفته در کمبود آب مشخص شد، تحت تنش خشکی ملايم در کوتاه مدت میزان بیان کاهش یافت در صورتی که تحت تنش خشکی قوی-کوتاه مدت میزان بیان افزایش داشته است. تغییرات بیان ژن در اثر تنش خشکی در برگ معنی‌دار شده است و در برخی موارد تحت تنش خشکی- طولانی مدت بیان ژن در برگ روند مخالف با بیان ریشه دارد. کاهش اولیه بیان آکوپورین‌ها در اثر تنش خشکی- طولانی مدت می‌تواند موجب کاهش انتقال و از دست رفتگی آب و هدایت روزنها شود که در حفظ آب گیاه موثر است. در تنش شدید زمانی که آب در دسترس گیاه به حداقل می‌رسد بیان بیشتر *PIP* موجب افزایش نفوذپذیری غشاء برای جذب و انتقال آب می‌شود (Johanson *et al.*, 2001; Young Jang *et al.*, 2004). میزان بیان آکوپورین‌ها تحت تاثیرنوع ایزوفرم و نوع تنش اعمال شده می‌باشد در صورتی که گیاه تحت تنش نباشد میزان بیان *PIP1*; در ریشه نسبت به برگ بیشتر است (Jang *et al.*, 2004). طی بررسی ارزیابی بیان ژن آکوپورین‌ها تحت تنش میزان بیان در برگ بیشتر از ریشه می‌باشد (Jang *et al.*, 2004). گیاهانی که تحت تنش خشکی متوسط در کوتاه مدت قرار می‌گیرند میزان بیان ژن در برگ افزایش می‌یابد که ممکن است به دلیل نقش اصلی ریشه برای انتقال آب باشد (Luu and Maurel, 2005). طی تنش غرقابی افزایش حریان آب در فضای آپولاستی می‌تواند باعث کاهش بیان آکوپورین‌ها و وابستگی حمل و نقل آب در ریشه شود و همچنین مزایای نفوذ پذیری انتخابی را به خطر اندازد (Visser and Voesenek, 2005). میزان تفاوت در بیان ژن تحت دو تنش زمانی کوتاه و بلند مدت می‌تواند این گونه تعبیر شود که اولاً مهار بیان می‌تواند به دلیل یک مکانسیم جلوگیری کننده از کاهش آب یاخته‌ای باشد، ثانیاً افزایش بیان می‌تواند به دلیل آماس یاخته پس از رخداد تجمع باشد. در نتایج بدست آمده در این پژوهش، مشاهده شد با اعمال تنش به گیاه، الگوی بیان ژن *PIP1* تغییر کرد. با بررسی میزان بیان ژن تحت تنش‌های اعمال شده درک تنش توسط گیاه و پاسخ آن می‌باشد. جالب توجه بر اینکه حتی الگوی کلی افزایش یا کاهش میزان بیان ژن نشان دهنده درک تنش توسط گیاه و پاسخ آن می‌باشد. جالب توجه بر اینکه حتی الگوی بیان ژن تحت تیمار زمانی کوتاه و بلند مدت متفاوت مشاهده شد که این مساله بیانگر تغییر روند مولکولی گیاه طی مدت زمان‌های متفاوت اعمال تنش و پاسخ به آن می‌باشد. میزان گشودگی روزنه در تنش غرقابی بلند مدت کمتر از کوتاه مدت و در شرایط عدم فعالیت آکوپورین کمتر بود بطوریکه درصد گشودگی روزنه در تنش غرقابی بلندمدت در شاهد، Daq به D-aq ترتیب ۶۵ و ۲۵ درصد در تنش غرقابی کوتاه مدت به ترتیب ۹۰ و ۷۲ درصد بود (شکل ۷ و ۸).



شکل ۷- اثر تنش غرقابی بلندمدت بر وضعیت باز بودن روزنه (الف) شاهد (ب) *D_{aq}* (ج) *D_{aq}*

Fig 7. The effect of long time flooding on opening of status a) Control b) *D-aq* c) *D-aq*



شکل ۸- اثر تنفس غرقابی کوتاه مدت بر وضعیت باز بودن روزنه (الف) شاهد (ب) D_{aq} (ج) D_{aq}

Fig 8. The effect of short time flooding on opening of status a) Control b) D_{aq} c) Daq.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد زمانی که فعالیت آکواپورین ریشه متوقف شد گیاه برای پتانسیل ریشه‌ای منفی تر به دلیل عدم امکان جذب آب بافت و به دنبال آن محتوای آب برگ نیز کاهش یافت و به دنبال آن فاکتورهای تنفس مانند پرولین و فنول افزایش یافت اما شاخص آنتی‌اسیدان بیشتر تحت تاثیر مدت زمان تنفس قرار گرفت. میزان پتانسیل و اسید‌آبسیزیک گیاه در شرایط تنفس خصوصاً عدم حضور آکواپورین افزایش یافت تا باستثنی روزنه محتوای آب گیاه را حفظ کند از طرفی کاروتوئینید به عنوان پیش‌ساز تولید اسید‌آبسیزیک نیز افزایش یافت. به طور کلی به نظر می‌رسد حضور آکواپورین‌های ریشه در حفظ تعادل آب در فلفل در شرایط غرقابی نقش مهمی ایفا می‌کند.

References

منابع

- Acosta, D., Alvarado, J., & Vargas, H. (2005). Monitoring ethylene and oxygen emission during water stress of *Populus Alba* leaves. *New Journal of Physics*, 30, 447-468.
- Alavi Samani, S. M., Ghasemi Pirbalouti, A., Ataei Kachouei M., & Hamed B. (2013). The influence of reduced irrigation on herbage, essential oil yield and quality of *Thymus vulgaris* and *Thymus daenensis*. *Journal of Herbal Drugs*, 3(4), 109-113.
- Alexandersson, E., Danielson, J. A., Rade, H., Moparthi, J., Fontes, V. K., Kjellbom M. P., & Johanson, U. (2010). Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *The Plant Journal*, 61(4), 650-660.
- Araya, T., Noguchi, K., & Terashima, I. (2010). Effect of nitrogen nutrition on the carbohydrate repression of photosynthesis in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Plant Research*, 123(3), 371-379.
- Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23(1), 112-124.
- Ashraf, M. (2003). Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of Blue panic grass (*Panicum antidotale* Retz.) under salinity or waterlogging. *Plant Science*, 165(1), 69-75.
- Bates, L., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Bienert, G.P., Bienert, M. D., Jahn, T. P., Boutry, M., & Chaumont. F. (2011). Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *The Plant Journal*, 66(2), 306–317.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Chaves, M. M., & Oliveira. M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 55(407), 2365-2384.
- Dat, J., Capelli, F. H., Bourgeade, P., & Badot. P. (2004). Sensing during plant flooding. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(4), 273-282.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 185-212.
- Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Hanson, D. T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H., & Kaldenhoff, R. (2006). Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. *The Plant Journal*, 48(3), 427-439.
- Hamada, A., & El-Enany, A. (1994). Effect of NaCl salinity on growth, pigment and mineral element contents, and gas exchange of broad bean and pea plants. *Plant Biology*, 36(1), 75-81.

- Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M. H., & Maeshima, M. (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters*, 579(25), 5814-5820.
- Issarakraisila, M. M., & Turner, Q. D. W. (2007). Photosynthetic and growth responses of juvenile Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) and Caisin (*Brassica rapa* subsp. *parachinensis*) to waterlogging and water deficit. *Horticultural Science*, 111(2), 107-113.
- Jang, J. K., Kim, D. G., Kim, Y. O., Kim, J. S., & Kang, H. (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 54(5), 713-725.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., & Sjovall, S. (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology*, 126(4), 1358-1369.
- Jyostna Devi, M., Sadok, W., & Sinclair, T. (2012). Transpiration response of de-rooted peanut plants to aquaporin inhibitors. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 167-172.
- Kafi, M., & Mahdavi Damghani, A. (2001). *Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants*. Ferdowsi University of Mashhad Publication. Mashhad.
- Livak, K. J., & 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.
- Lutts, S., Kinet, J., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398.
- Luu, D. T., & Maurel, C. (2005). Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell and Environment*, 28(1), 85-96.
- Mahdieh, M., Mostajeran, A., Tomoaki, H., Maki, K. (2009). Drought stress alters water relations and expression of PIP-Type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant and Cell Physiology*, 49(5), 801-813.
- Martinez, J. P., Lutts, S., Schanck, A., Bajji, M., & Kinet, J. M. (2004). Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the mediterranean shrub? *Atriplex halimus* L. *Journal of Plant Physiology*, 161(9), 1041-1051.
- Nguyen, M. X., Moon, S., & Jung, K. H. (2013). Genome wide expression analysis of rice aquaporin genes and development of a functional gene network mediated by aquaporin expression in roots. *Planta*, 238(4), 669-681.
- Postaire, O., Tournaireroux, C., Grondin, A., Boursiac, Y., & Morillon, R. (2010). A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 152(3), 1418-1430.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144.
- Turner, N. C. (1988). Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science*, 9(4), 289-308.
- Urban, L., Arrouf, J., & Bidel, L. (2017). Assessing the effects of water deficit on photosynthesis using parameters derived from measurements of leaf gas exchange and of chlorophyll a fluorescence. *Plant Science*, 17, 1-18.
- Vaidya, S., Vanaja, M., Jyothilakshmi, N., Sowmya, P., Anitha, Y., & Sathish, P. (2015). Variability in drought stress induced responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. *Biochemistry and Physiology*, 4(1), 1-5.
- Visser, E. J. W., & Voesenek, L. (2005). Acclimation to soil flooding sensing and signal-transduction. *Plant and Soil*, 274, 197-214.
- Young Jang, J., Kim, D. G., Kim, Y. O., Kim, J. S., & Kang, H. (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 54(5), 713-725.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1619-1624.

Effect of Flooding on Physiology and Expression of Aquaporin 1 (*PIP1*) Gene in Pepper

Zeinab Masoumi¹, Maryam Haghghi^{2*}

Department of Horticulture, College of Agriculture , Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
Corresponding Author, Email: (mhaghghi@cc.iut.ac.ir)

Flooding stress causes a lack of oxygen and impaired root activity, part of which is related to the possible effects of aquaporins. The factorial experiment was performed in a CRD design with treatments including the flooded plants with active aquaporin and the flooded plant with active aquaporin at two or 10 days after stress. With the loss of aquaporin activity, the fresh and dry weight of the shoots and roots decreased and the duration of the stress did not affect it. The potential of leaf and root water in aquaporin's-free flood stress was more negative than in flood and control, and the potential of root water under long-term flood stress was more negative than the short-term stress. The content of abscisic acid in flood stress increased so that in the presence of aquaporin for a long time it increased the abscisic acid and in the absence of aquaporin increased in a short time. Expression of the root and leaf aquaporin gene increased in flooding stress and the absence of aquaporin in the long term decreased in the short term. In general, the antioxidant index was more affected by the duration of stress. The amount of potassium and abscisic acid in the plant increased in the absence of aquaporin to maintain the water content of the plant by closing the stomata. On the other hand, carotenoids as a precursor to the production of abscisic acid increased. In general, the presence of root aquaporins seems to play an important role in maintaining water balance in pepper in flooded conditions.

Keywords: Abscisic acid, PIP gene expression, Water potential, Water relations, Stomata status.