

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، مریم حقیقی*

گروه باغبانی، 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 شاخساره 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 آنتی‌اکسیدان بیشتر تحت تاثیر مدت زمان تنش قرار گرفت. میزان پتاسیم و اسیدآبسیزیک گیاه در عدم حضور آکواپورین افزایش یافت تا با بستن روزنه محتوای آب گیاه را حفظ کند از طرفی کاروتنوئید 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 روزنه.

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 هوازی 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 غشاهای یاخته‌ای آسیب می‌زنند. آسیب‌های دیگری که در اثر تنش غرقابی در گیاه ایجاد می‌شود شامل آسیب به فرآیند فتوسنتزی، 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 هوازی (فرایند تخمیر) و تولید اتانول و متابولیت‌های سمی می‌شود با انباشته 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، کاروتنوئید می‌شود که با وجود تنش غرقابی در گیاه تغییرات ذکر شده گزارش شده است (Araya et al., 2010). در پژوهشی بر روی فلفل دلمه مشاهده شد که تنش غرقابی بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی را در گیاهان تغییر می‌دهد، در برگ‌های گیاه فلفل تحت تنش 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 تنش دارند. اسیدآبسیزیک یکی از مهمترین هورمون‌های گیاهی است که بر اثر اعمال تنش آبی برای کاهش تعرق و حفظ آب تولید می‌شود و به عنوان یک واسطه موجب کاهش حساسیت گیاه به تنش 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 بر این، پروتئین‌های اکوپورین 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 غشای پلاسما (PIPs)، پروتئین‌های درونی تونوپلاست (TIPs)، پروتئین‌های غشایی شبه نودولین ۲۶ (NIPs) و پروتئین‌های بازی کوچک (SIPs) که براساس توالی DNA در زیر گروه‌های کوچکتری قرار می‌گیرند. پروتئین‌های ذاتی غشای پلاسما گیاهی را براساس توالی‌ها و فعالیت کانال آب به دو دسته *PIP1* و *PIP2* تقسیم می‌کنند (Bienert et al., 2011).

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

مواد و روش

کشت گیاه و شرایط اعمال تنش غرقابی

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی روی گیاه فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum* L.) رقم پی‌اس ۳۰۱^۱ در شرایط متوسط دمای روزانه/شبانه 25 ± 18 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 تنش غرقابی دارای اکوپورین فعال (D_{aq}) و گیاه تحت تنش غرقابی که فعالیت اکوپورین آن متوقف شده بود (D_{-aq}) و گیاه شاهد بدون تنش غرقابی بود. فعالیت اکوپورین با اعمال نیترا ت جیوه به مدت ۶ ساعت در محیط ریشه متوقف شد. ابتدا بذرها فلفل دلمه‌ای در سینی نشا حاوی بستر پرلایت و ورمی‌کولایت 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 تنش غرقابی، در ابتدا برای حذف اکسیژن محلول، محلول غذایی به مدت یک هفته در ظروف کاملاً بسته و بدون اکسیژن نگهداری گردید. سپس گیاهچه‌ها ۴ تا ۶ برگ 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 تنش بر پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه بسیار موثر است تنش 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 تنش 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.

غلظت نهایی	عنصر	میلی‌لیتر استوک در لیتر محلول نهایی	غلظت استوک	غلظت استوک	وزن مولکولی	ترکیب
Final conc. ppm	Element	ml stock per liter final sol.	Stock conc. (g l ⁻¹)	Stock conc. (M)	M.W	Compound
224	N	6.0	101.10	1.0	101.10	نیتрат پتاسیم KNO ₃
235	K	4.0	236.16	1.0	236.16	نیترات کلسیم ۴ آبه Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O
160	Ca	2.0	115.08	1.0	115.08	آمونیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات NH ₄ H ₂ PO ₄
62	P	1.0	246.49	1.0	246.49	سولفات منیزیم ۷ آبه MgSO ₄ .7H ₂ O
32	S			(mM)		
24	Mg	1.0	3.72	50	74.55	کلرید پتاسیم KCl
1.77	Cl	1.0	1.54	25	61.84	اسیدبوریک H ₃ BO ₃
0.27	B	1.0	0.33	2.0	169.01	سولفات منگنز تک آبه MnSO ₄ .H ₂ O
0.11	Mn	1.0	0.57	2.0	287.55	سولفات روی ۷ آبه ZnSO ₄ .7H ₂ O
0.13	Zn	1.0	0.12	0.5	249.71	سولفات مس ۵ آبه CuSO ₄ .5H ₂ O
0.03	Cu	1.0	0.081	0.5	161.97	اسید مولیبدات H ₂ MoO ₄
0.05	Mo	1.0	21.53	50	346.08	کلات آهن Fe-EDTA
2.80	Fe					

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

اندازه‌گیری شاخص‌های مورفوفیزیولوژیک

طبق نظر Alexandersson مبنی بر تأثیر زمان بر فعالیت آکواپورین‌ها و پاسخ ابتدایی گیاه در این شرایط بلافاصله پس از اتمام زمان تنش غرقابی، نمونه‌گیری برای اندازه‌گیری 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 ترازویی دیجیتالی وزن تر توزین شد. سپس شاخساره و ریشه به طور جداگانه در پاکت‌های کاغذی قرار گرفتند و به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سلسیوس خشک و سپس با ترازوی دیجیتالی توزین شدند. به منظور اندازه‌گیری کارایی کوانتومی 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 فلورسانس‌سنج (مدل RS۲۳۲، انگلستان) اندازه‌گیری شد. سبزی‌نگی برگ از برگ‌های بالغ انتهای بوته به صورت از هر گیاه سه قرائت بر روی سه برگ مجزا (درمجموع ۹ قرائت در هر تکرار) توسط دستگاه کلروفیل‌سنج (مدل CL-01 ساخت انگلستان) انجام و سپس میانگین آن ثبت شد. کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید، توسط حلال استون ۱۰۰٪ رنگیزه‌های فتوسنتزی استخراج گردید و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل UV-600A میزان جذب

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

$$\text{Carotenoids} = 100(A_{470}) - 3/27(\text{mg Chl. a}) - 10/4(\text{mg Chl. b})/227$$

پتانسیل آب ریشه و برگ، در زمان بیشینه دمای هوا از برگ‌های میانی بوته و ریشه به همراه طوقه 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 بلافاصله دیسک‌های برگی در آب مقطر در پتری 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 سلیسیوس 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 نشت یونی دیسک برگی تهیه و سه بار با آب دیونیزه شستشو شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۵ درجه سلیسیوس) قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت میزان هدایت الکتریکی محلول توسط EC متر اندازه‌گیری شد (EC_1)، بعد از آن نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۱۲۰ درجه سلیسیوس در اتوکلاو قرار داده شد و بعد از سرد شدن مجدداً EC محلول اندازه گرفته شد (EC_2). سپس با استفاده از رابطه زیر میزان نشت یونی 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 $\times 40$ و عکسبرداری آن با دوربین متصل به میکروسکوپ (مدل Canon-DS126271 ژاپن) انجام شد.

سنجش 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 برحسب میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد (Bradford, 1976). برای تهیه محلول‌های پرولین استاندارد از پرولین خالص استفاده گردید. برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر 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 اسپکتروفتومتر پس از تهیه نمونه‌ها انجام شد و غلظت پرولین نمونه‌ها برحسب 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 سلیسیوس خاکستر شدند. برای هضم نمونه‌ها از اسیدکلریدریک دو مولار استفاده شد و در نهایت حجم ۵۰ میلی لیتر رسانیده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر (JENWAY, PFP-7) اندازه‌گیری شد (Hamada and El-Enany, 1994). میزان ترکیبات فنولیک از روش Singleton & Rossi با دستگاه اسپکتروفتومتری 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 اسپکتروفتومتر (مدل UV-600A ساخت کشور انگلستان) استفاده شد (Yu et al., 2010). برای اندازه‌گیری محتوای آبسزیک اسید یک گرم بافت برگ تازه، با متانول ۸۰٪ و ۰/۱ گرم پلی وینیل پیرولیدون در دمای چهار درجه سلیسیوس کاملاً یکنواخت و در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی جدا شد و pH آن به ۸ رسانده شد. متانول توسط خلا تبخیر و بر باقی مانده محلول مقدار ۵ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه و حل گردید. این عمل دو بار دیگر تکرار شد. در انتها به آن اتیل استات اضافه گردید و مجدداً تبخیر در خلع صورت گرفت. بر رسوب باقی مانده یک میلی لیتر محلول حاوی سه درصد متانول و ۰/۱ مول اسید استیک اضافه و حل گردید. سپس از صافی ۰/۴۵ میلی متر عبور داده شد و به ستون فاز معکوس (Diamonsic) و

C₁₈, 5µm به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر در دستگاه HPLC (Unicam-Crystal-200, UK) تزریق شد. فاز متحرک گرادیان متانول اسید استیک (۳-۹۷٪) با سرعت چهار میلی‌لیتر در دقیقه به همراه دتکتور استفاده شد. از استاندارد اسید آبسزیک با خلوص ۹۹/۹۷٪ ساخت شرکت Sigma استفاده شد تا پیک خروجی با کالبراسیون برای سنجش نمونه‌ی استخراجی مورد استفاده قرار گرفت. براساس سطح زیر منحنی و موفقیت آن در پیک‌های خروجی مقدار نمونه مجهول استخراجی تعیین شد (Flexas et al., 2006).

بررسی بیان ژن آکوپورین 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 آکوپورین، استخراج RNA از نمونه‌های نگهداری شده ریشه و برگ در دمای ۸۰- درجه سلسیوس طبق دستورالعمل کیت ایرایزول (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 (Alpha Biotech Ltd., Glasgow, UK) Picodrop P200 به تعیین کیفیت و کمیت RNA پرداخته شد. برای ساخت رشته cDNA، ۱ میکروگرم RNA کل استخراج شده با استفاده از Revert Aid M-Mulv Reverse Transcriptas با توجه به دستورالعمل کیت (Thermo Scientific, USA)، سنتز شد. بررسی بیان ژن آکوپورین (PIP1, accession number: JX402929.1) با استفاده از Real time PCR انجام شد. طراحی آغازگرها با نرم افزار Oligo 7. انجام شد (جدول ۲). این جدول دارای توالی آغازگرها، شماره دسترسی ژن ها، طول pcr product دمای اتصال در pcr)، به منظور نرمال سازی بیان این ژن، از ژن اکتین (accession 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 آکوپورین یک (PIP1) با استفاده از روش دلتا C_T محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001).

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در Real time PCR

Table 2- Primers used in Real time PCR

نام پرایمر	دمای اتصال	توالی پرایمرها	اندازه باند (جفت باز)	شماره
Primer name	Connection temperature	Sequence of primers	Band size (open pair)	دسترس ژن Gene access number
PIP1	55	F 5'-AGGGATTTCATGCAAGGACCA-3' R 5'-TGGTGGCCAAATGAACCAAG-3'	228	JX402929.1
Actin	55	F 5'-GTCCTCTTCCAACCATCCAT -3' R 5'-TACTTTCTCTCTGGTGGTGC -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 Statestix 8 آنالیز شدند و مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون LSD، در سطح احتمال ۵ درصد محاسبه شد.

نتایج و بحث

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

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

جدول ۳- تاثیر تنش 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 aquapurine.

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

در هر ستون، میانگین‌هایی 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 (منفی‌تر) و تنش غرقابی با حضور آکواپورین باعث افزایش آن شد و محتوای نسبی آب برگ در تنش غرقابی افزایش اما در عدم حضور آکواپورین کاهش یافت. نشت یونی و پرولین تفاوت معنی داری نداشت اما میزان پروتئین کل در تنش غرقابی و خصوصا عدم حضور آکواپورین کاهش یافت. مدت زمان تنش به جز پتانسیل آب ریشه که در تنش ناگهانی کاهش یافت در سایر صفات اثر معنی داری نداشت (جدول ۴).

اثرات اصلی تنش نشان داد غلظت پتاسیم در تیمار غرقابی عدم حضور آکواپورین کاهش و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن آکواپورین برگ در آن افزایش یافت در حالی که محتوای اسیدآبسیزیک و بیان ژن آکواپورین ریشه در تنش غرقابی بدون فعالیت آکواپورین کاهش یافت. محتوای فنول و میزان کاروتنوئید برگ به ترتیب افزایش و کاهش در تنش غرقابی در حضور و عدم حضور آکواپورین داشت. در تنش کوتاه مدت میزان کاروتنوئید و محتوای اسیدآبسیزیک 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 aquaporin is activated or inactivated.

پروتئین کل Total protein (mg g ⁻¹ FW)	پروتئین Prolin (μmol g ⁻¹ FW)	نشت یونی Electrolyte leakage (%)	محتوای نسبی آب Relative water content (%)	پتانسیل آب ریشه Root water potential (MPa)	پتانسیل آب برگ Leaf water potential (MPa)	تیمار Treatment
20.05 ^a	0.51 ^a	43.21 ^a	66.81 ^b	-4.83 ^c	-3.03 ^b	شاهد Control
19.78 ^a	1.32 ^b	34.16 ^a	83.32 ^a	-6.48 ^b	-4.25 ^b	غرقابی Flooding
19.80 ^a	0.50 ^c	32.73 ^a	63.65 ^b	-10.53 ^b	-21.00 ^a	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.

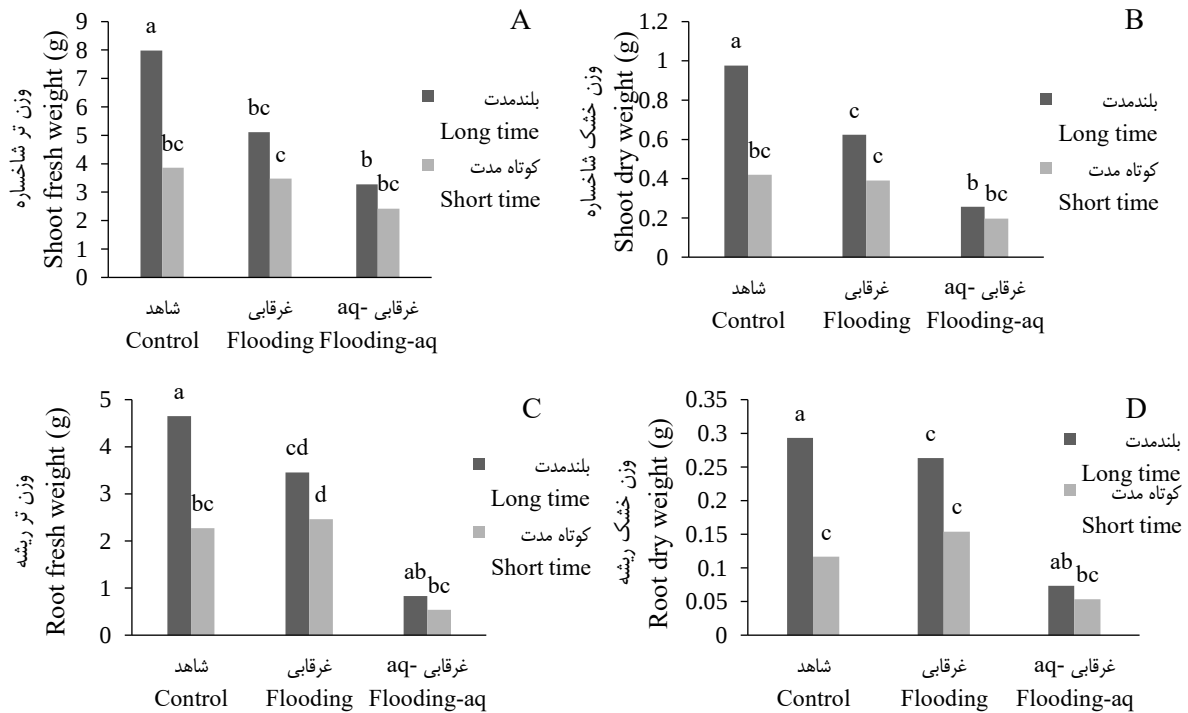
Table ۵. The effect of flooding stress on some stress indexes in sweet pepper when the aquaporin is activated or inactivated.

بیان ژن آکواپورین ریشه PIP1 expression in roots	بیان ژن آکواپورین برگ PIP1 expression in leaves	محتوای اسیدآبسیزیک ABA (mg ⁻¹ gr Fw)	کاروتنوئید Carotenoid (mg g ⁻¹ FW)	ظرفیت آنتی اکسیدانی Total Antioxid ant (%)	محتوای فنول Phenol (mg g ⁻¹ FW)	غلظت پتاسیم Potassium (mg g ⁻¹ DW)	تیمار Treatment
1.25 ^c	1.07 ^a	15.93 ^c	23.27 ^a	57.43 ^b	24.04 ^b	29.65 ^a	شاهد Control
3.64 ^a	0.51 ^b	38.37 ^a	19.24 ^b	56.13 ^b	31.28 ^a	28.09 ^{ab}	غرقابی Flooding
2.42 ^b	0.95 ^a	36.27 ^b	17.94 ^b	60.26 ^a	35.50 ^a	25.36 ^{ab}	غرقابی بدون aq-Flooding
مدت زمان تنش Duration of stress							بلندمدت Long time کوتاه مدت Short time
3.18 ^a	0.96 ^a	32.40 ^a	23.99 ^a	59.90 ^a	16.68 ^a	25.07 ^a	
1.68 ^b	0.73 ^a	27.98 ^b	16.32 ^b	55.99 ^a	23.20 ^a	30.33 ^a	

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 آکوپورین وزن تر و خشک شاخساره 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 شاخساره و ریشه کمتری نسبت به شاهد طولانی مدت دارد و این تفاوت به دلیل مدت زمان رشد گیاه است (شکل ۱ الف-د).

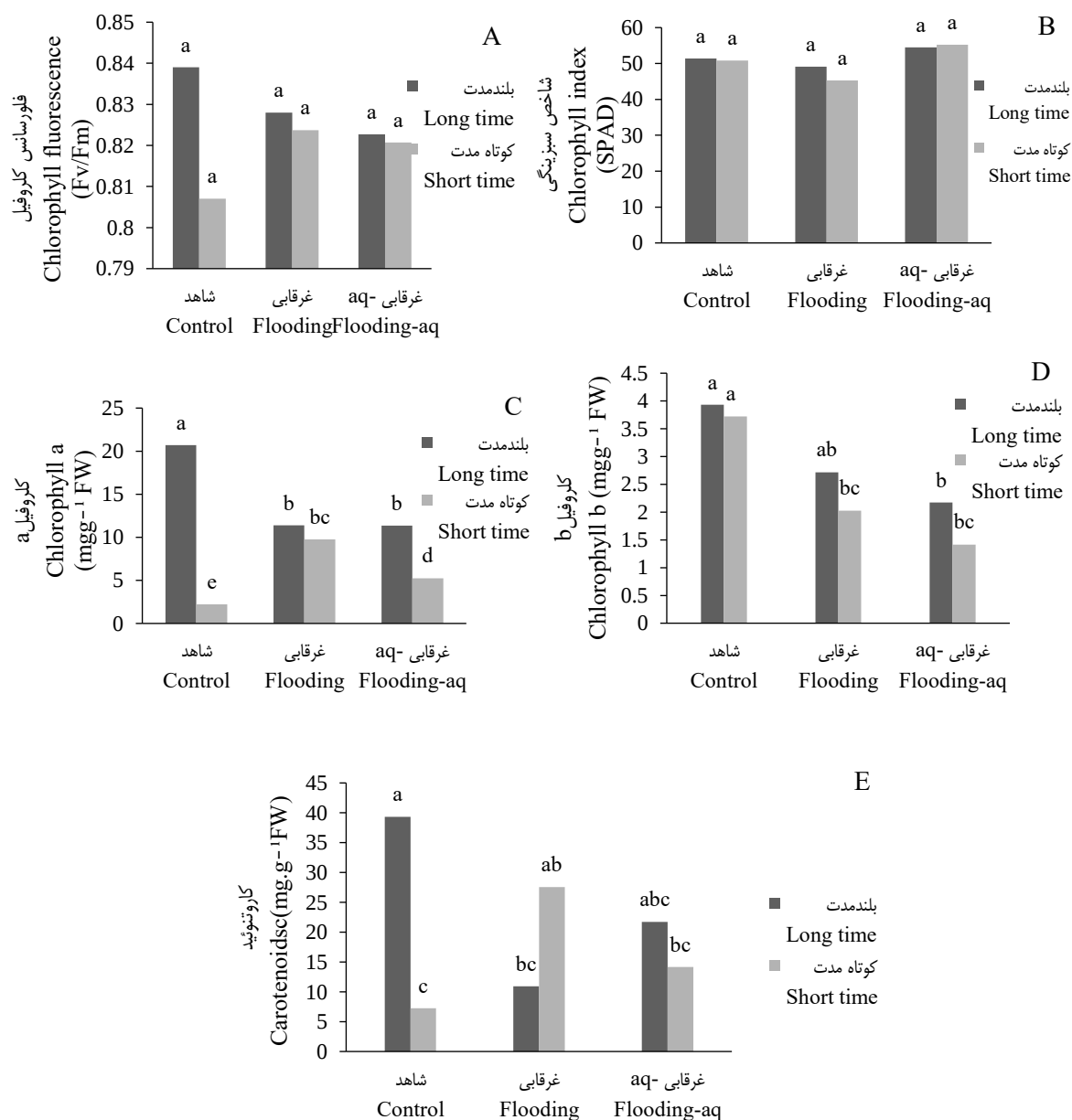


شکل ۱- برهمکنش تنش غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکوپورین ریشه به صورت کوتاه مدت و بلندمدت بر میزان وزن تر شاخساره (A)، وزن خشک شاخساره (B)، وزن تر ریشه (C)، وزن خشک ریشه (D) فلفل دلمه‌ای. در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig 1. Effect of flooding stress when the aquaporine 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 شاخساره به دلیل کاهش آب جهت انتقال مواد غذایی به اندام هوایی کاهش 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 عناصر غذایی محلول در آب محدود و در نتیجه 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 موقتی بیوماس (زیست توده) مرتبط می‌شود (Urban *et al.*, 2017).

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



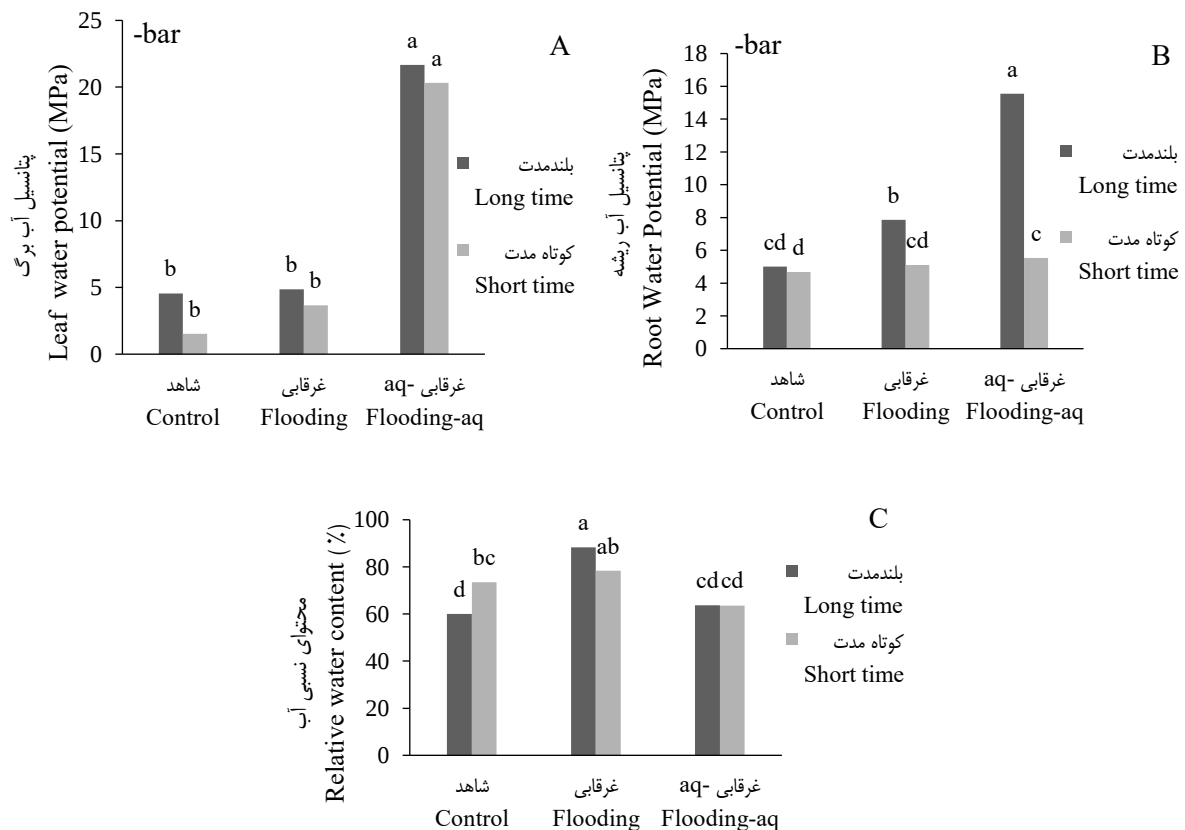
شکل ۲- برهمکنش تنش غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکوپورین ریشه به صورت کوتاه مدت و بلندمدت بر میزان فلورسانس کلروفیل (A)، شاخص سبزی‌نگی (B)، کلروفیل a (C)، کلروفیل b (D) و کارتنوئید (E) فلفل دلمه‌ای. در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig 2. Effect of flooding stress when the aquaporin 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 -value ≤ 0.05 .

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

و بدین وسیله می‌تواند میزان رشد را بیشتر از آنچه به علت اثرات ناشی از کاهش فتوسنتز خالص تقلیل می‌یابد، کاهش دهد (Vaidya *et al.*, 2015). همچنین در تحقیقات انجام شده بر روی آویشن نشان داد که تنش رطوبتی شدید باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی می‌شود (Alavi Samani *et al.*, 2013). ریشه‌ها اولین اندام گیاه هستند که اثرات تنش غرقابی را تجربه می‌کنند و پس از آن اندام‌های هوایی تحت تأثیر تنش 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 ریشه‌ای دچار اختلال شده و گیاه نمی‌تواند آب را به خوبی جذب کند و در نتیجه باعث پژمردگی و کاهش نرخ فتوسنتز 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 تنش غرقابی سطح برگ‌ها، تعداد برگ و وزن خشک کل اندام هوایی را در کلم معمولی کاهش داد (Issarakraisila and Turner, 2007).

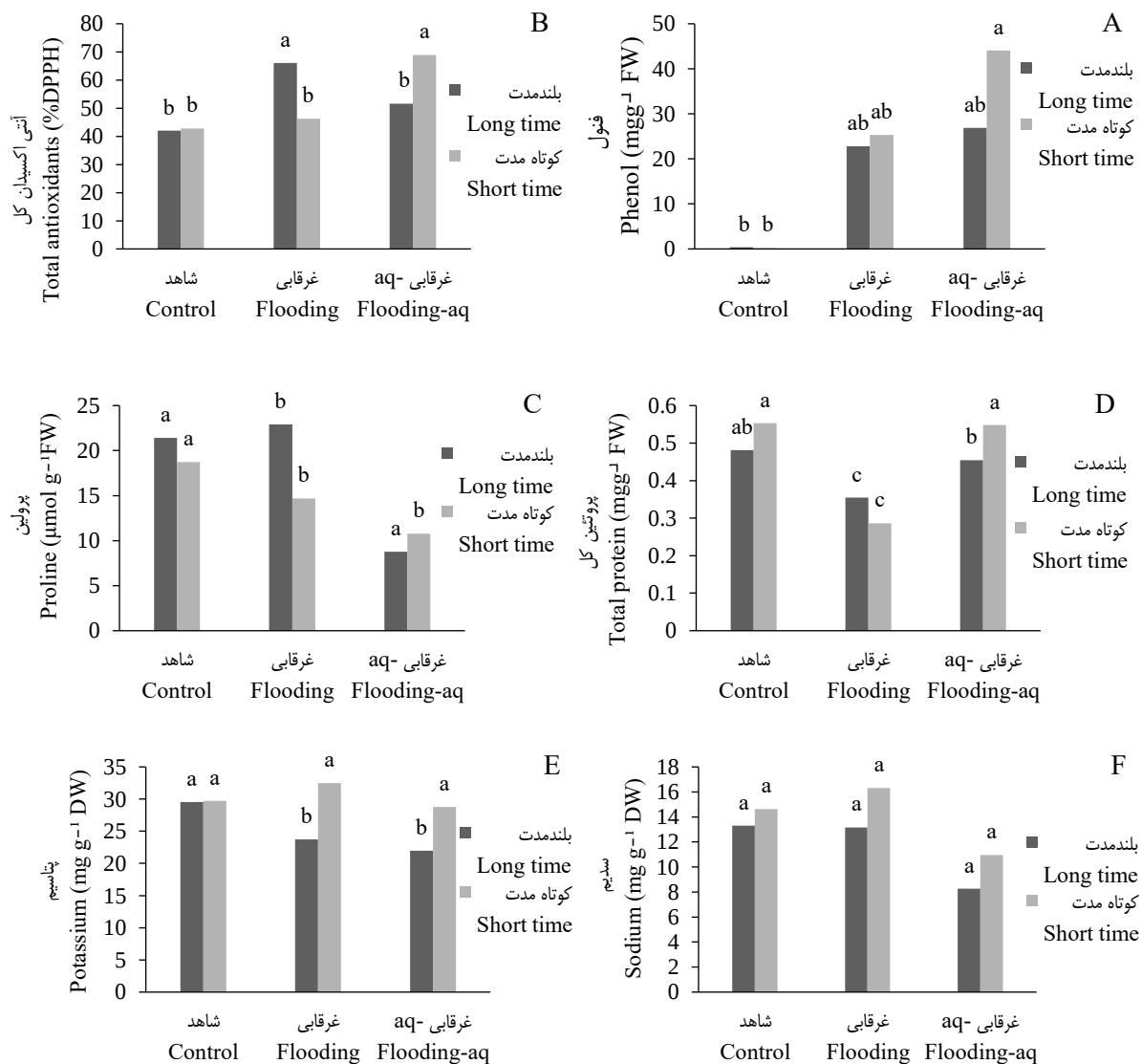
پتانسیل آب برگ و ریشه در تنش غرقابی بدون آکواپورین منفی‌تر از حالت غرقابی و شاهد بود و فقط پتانسیل آب ریشه در تنش غرقابی بلندمدت منفی‌تر از تنش کوتاه مدت آن بود اما در تیمارهای دیگر این دو زمان اعمال تنش تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل ۳ الف و ب). محتوای نسبی آب برگ در تنش غرقابی در هر دو زمان اعمال تنش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



شکل ۳- برهمکنش تنش 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 معنی‌دار ندارند.

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 تنش غرقابی و عدم حضور آکوپورین پس از تنش غرقابی غرقابی و شاهد بود و در تنش طولانی مدت بیش از کوتاه مدت در عدم حضور آکوپورین بود اما پروتئین تغییر معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پتاسیم در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت اما تحت تاثیر زمان تنش قرار گرفت به طوری که ظرفیت آنتی‌اکسیدان با افزایش مدت زمان تنش در تنش غرقابی افزایش و در تنش غرقابی بدون آکوپورین در مدت کوتاهی افزایش یافت اما میزان پتاسیم در مدت کوتاه تنش افزایش معنی‌داری داشت. میزان فنول در تنش غرقابی در حضور و عدم حضور آکوپورین افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود در شرایط ناگهانی تنش بدون آکوپورین رسید (شکل ۴-د).



شکل ۴- برهمکنش تنش غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکوپورین ریشه به صورت کوتاه‌مدت و بلندمدت بر فنول (A)، آنتی‌اکسیدان 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 معنی‌دار ندارند.

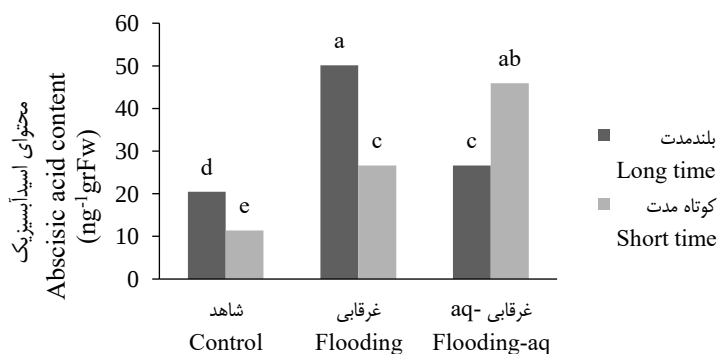
Fig 4. Effect of flooding stress at the presence and absence of root aquaporin activity in short time and long time on phenol (A), total antioxidants (B), proline (C), total protein (D), potassium (E), sodium (F) sweet peppers. Means with common letters in each column are no significantly different at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

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

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

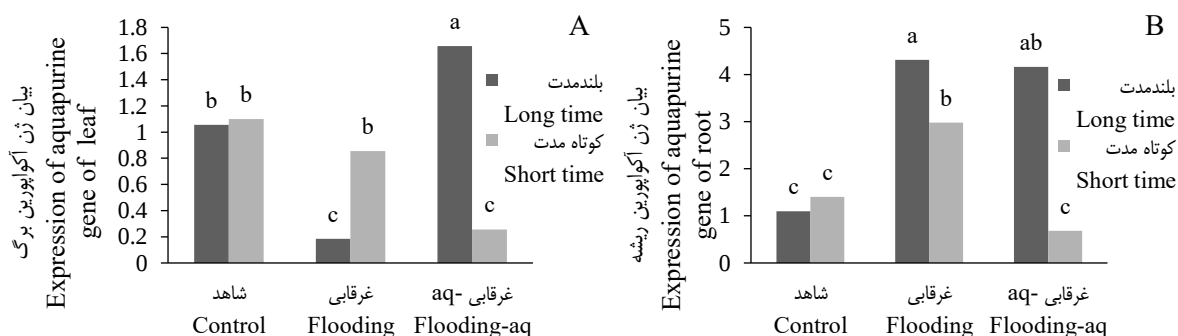
محتوای اسیدآبسیزیک در تنش غرقابی افزایش یافت و مدت زمان تنش در شرایط تنش در حضور و عدم حضور آکوپورین اثر بر عکس داشت بطوریکه در حضور آکوپورین در مدت طولانی باعث افزایش اسیدآبسیزیک و در عدم حضور آکوپورین در مدت کوتاه افزایش یافت (شکل ۵).



شکل ۵- برهمکنش تنش غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکوپورین ریشه به‌صورت کوتاه‌مدت و بلندمدت بر میزان آبسیزیک اسید برگ فلفل دلمه‌ای. در هر ستون، 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 Abscissic acid content of sweet peppers. Means with common letters in each column are no significantly different at $P\text{-value} \leq 0.05$.

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

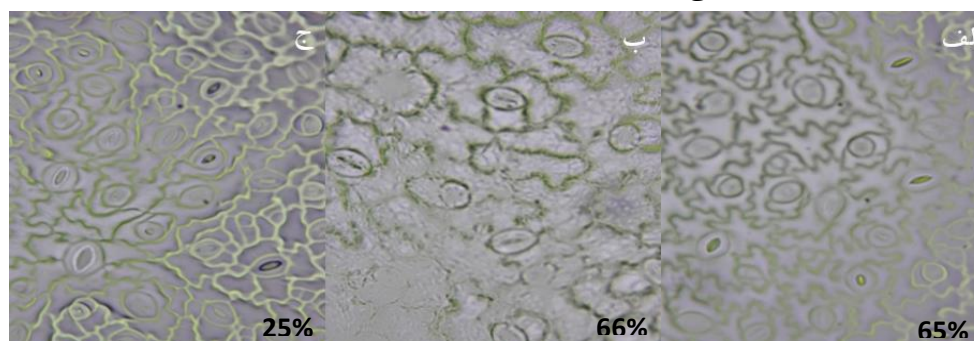


شکل ۶- برهمکنش تنش غرقابی در حضور و عدم فعالیت آکواپورین ریشه به صورت کوتاه مدت و بلندمدت بیان ژن برگ (A) و ریشه (B) فلفل دلمه‌ای. در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

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 $P\text{-value} \leq 0.05$.

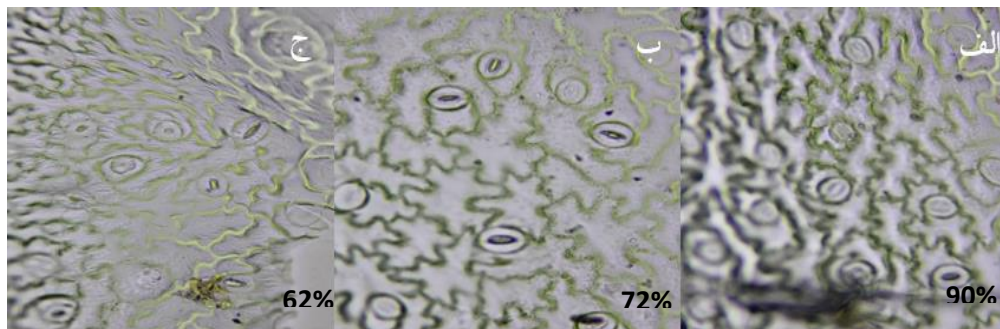
اسیدآبسیزیک به عنوان یک هورمون در سیگنالینگ تنش خشکی نقش مهمی در تنظیم محتوای و فعالیت چندین *PIP* دارد. با این حال، پیشنهاد شده است که پاسخگویی ژن *PIP* به تنش آب و اسیدآبسیزیک متفاوت است که نشان می‌دهد تنظیم ژن *PIP* شامل مسیرهای سیگنالینگ مستقل از اسیدآبسیزیک در طول کمبود آب می‌باشد. علاوه بر این، 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 محرک‌های مختلف مانند مرحله رشد، هورمون‌ها یا شرایط محیطی نامطلوب مانند خشکی و شوری تنظیم می‌شود. *PIP* های گیاهی بر اساس توالی‌ها و فعالیت کانال آب می‌توان به دو دسته عمده، *PIP1* و *PIP2* تقسیم کرد، پروتئین *PIP2* سطح بالایی از فعالیت کانال آب را در تخمک‌های *Xenopus* و حنجره‌های 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 سطوح پایین‌تر رونویسی در برگ‌ها را نسبت به ارگان‌های دیگر نشان دادند. جالب توجه است، که ژن زیرخانواده *CsSIP*، *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 موافق 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 کانال‌های آب نوع *PIP* می‌تواند به طور مستقیم درگیر شود. بنابراین، رونویسی *NtPIP* در ریشه گیاهان توتون و تنباکو تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد. پس از تنش کوتاه مدت میزان بیان ژن *PIP1* در ریشه گیاه تنباکو کاهش یافت (Mahdieh et al., 2009). نتایج یافته‌ها یک فرضیه را ایجاد می‌کنند که *AtPIP1* می‌تواند نقش ویژه‌ای را برای جذب آب باقیمانده تحت تنش خشکی که با تنظیم اسمزی برای انتقال بسترهای خاص

مانند انتقال مولکول‌هایی مانند گلیسرول، قندها، اسیدهای آلی یا دی‌اکسیدکربن به جای آب برای محافظت از گیاهان از خشکسالی بازی کند. *PIP* به هدایت مزوفیل و در نتیجه تأثیر بر میزان فتوسنتز و میزان انتقال دی‌اکسیدکربن 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 دی‌اکسیدکربن 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 فتوسنتز گیاه می‌گذارد (Chaves and 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 ملایم 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 *PIP* 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 روزنه‌ای 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 تأثیر نوع ایزوفرم و نوع تنش اعمال شده می‌باشد در صورتی که گیاه تحت تنش نباشد میزان بیان *PIP1;1* 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 جریان آب در فضای آپوپلاستی 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 Voeselek, 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 این تغییرات نشان دهنده اثرگذاری این تیمارها بر بیان است. به‌طور 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، D-aq به ترتیب ۶۵، ۶۶ و ۲۵ درصد در تنش غرقابی کوتاه مدت به ترتیب ۹۰ و ۷۲ و ۶۲ درصد بود (شکل ۷ و ۸).



شکل ۷- اثر تنش غرقابی بلندمدت بر وضعیت باز بودن روزنه (الف) شاهد (ب) Daq (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 تنش 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 منفی‌تر به دلیل عدم امکان جذب آب بافت و به دنبال آن محتوای آب برگ نیز کاهش یافت و به دنبال آن فاکتورهای تنش مانند پرولین و فنول افزایش یافت اما شاخص آنتی‌اکسیدان بیشتر تحت تاثیر مدت زمان تنش قرار گرفت. میزان پتاسیم و اسیدآبسیزیک گیاه در شرایط تنش خصوصاً عدم حضور آکواپورین افزایش یافت تا با بستن روزنه محتوای آب گیاه را حفظ کند از طرفی کاروتنوئید 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., & Sjövall, 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.
- Mahdiah, 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., Aarouf, J., & Bidet, 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 Haghighi^{2*}

Department of Horticulture, College of Agriculture , Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Corresponding Author, Email: (mhaghighi@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: Absciscic acid, PIP gene expression, Water potential, Water relations, Stomata status.