مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

اثر تنش فلز کادمیوم بر الگوی بیان ژن و فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در گیاه ماریتیغال (Silybum marianum)

ثریا پورتبریزی[۱]، شهرام پورسیدی*[۲]، روح‌اله عبدالشاهی[۳]، نازی نادرنژاد[۴]

[۱] کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.

[۲] دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.

[۳] دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.

[۴] استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۳

چکیده

کادمیوم یکی از فلزات سنگین است که در گیاهان تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کند و گیاهان برای حفاظت در برابر این تنش مجهز به یک سیستم جاروب کننده رادیکال های آزاد می‌باشند. این سیستم شامل آنزیم های آنتی اکسیدان و نیز سیستم آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی است. در این مطالعه تغییر در الگوی بیان ژن و فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در پاسخ به غلظت های (۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرو مولار) کلرید کادمیوم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به ترتیب با ۲ و ۵ تکرار در گیاه ماریتیغال (Silybum marianum) بررسی شد. طبق نتایج بدست آمده از آنالیز نیمه کمی RT-PCR، میزان بیان این ژن در برگ گیاهچه های تحت تنش نسبت به گیاهچه های شاهد، تغییرات معنی دار نشان داد به طوری که کمترین و بیشترین میزان بیان به ترتیب در سطح شاهد و غلظت ۹۰۰ میکرو مولار کلرید کادمیوم مشاهده شد. بنابراین می توان گفت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی در پاسخ به سمیت کادمیوم در گیاه ماریتیغال نقش ایفا می کند.

کلمات کلیدی: *آنزیم های آنتی اکسیدان، کادمیوم، ماریتیغال، گلوتاتیون ردوکتاز، بیان ژن.*

* نویسنده مسئول: شهرام پورسیدی تلفن: ۰۹۱۳۳۴۳۳۰۳۸۹ Email: spseyedi@gmail.com

مقدمه

کادمیوم یک فلز آلاینده محیطی است که در طبیعت منتشر می شود. منابع مختلف شامل صنایع، فاضلاب شهری و مواد سوختی غلظت این آلاینده را افزایش می دهند. همچنین استفاده از کود های شیمیایی، مخصوصاً کود های فسفاته مقدار این عنصر را در خاک افزایش می دهد (Baryla *et al*., 2001). کادمیوم به راحتی به وسیله ریشه گیاه جذب می شود و سمیت آن تا ۲۰ برابر بیشتر از سایر فلزات سنگین است (Noorani Azad and Kafilzadeh., 2010). بررسی ها نشان داده کادمیوم علاوه بر کلروز و نکروز شدن برگ ها (Singh and Myhr.,1998) و کاهش عملکرد و رشد، باعث باز دارندگی فعالیت برخی آنزیم ها از جمله روبیسکو می گردد (Manara, 2012). فلزات سنگین از جمله کادمیوم از طریق تولید انواع مختلف گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species ROS) موجب آسیب به پروتئین ها، کربوهیدرات ها و DNA شده و در نهایت منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می شوند (Zhang *et al*., 2009). این ترکیبات هم چنین روی بیان ژنها تأثیر گذاشته و موجب تغییر در بسیاری از فرآیند ها مانند رشد، چرخه سلولی، مرگ برنامه ریزی شده سلول و پاسخ به تنش های غیر زیستی می‌شوند (Singh and Tuteja., 2010). آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی به واسطه دادن الکترون یا هیدروژن، نقش اساسی در جاروب کردن رادیکال های آزاد دارند که از آن جمله می توان به بتاکاروتن ها، آلفا- توکوفرول، گلوتاتیون و آسکوربات اشاره کرد (Gill *et al*., 2013). آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، چرخه آسکوربات – گلوتاتیون و چرخه گلوتاتیون در زمره سیستم های آنزیمی درگیر در جاروب کردن ترکیبات ROS می‌باشند (Romero-Puertas *et al*., 2006). گلوتاتیون ردوکتاز یک فلاووپروتئین اکسیدوردوکتاز و یک آنزیم آنتی اکسیدان سلولی بالقوه از سیکل آسکوربات – گلوتاتیون است که به همراه گلوتاتیون در تعیین تحمل گیاهان به تنش نقش حیاتی دارد (Gill *et al*., 2013). گلوتاتیون ردوکتاز در سیتوپلاسم و کلروپلاست وجود دارد و با استفاده از NADPH ، گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) را به گلوتاتیون (GSH) تبدیل می کند. گلوتاتیون احیا شده برای بسیاری از عملکرد های سلولی مورد نیاز است و باید دوباره تولید شود (Wang *et al*., 2006). در تنش ها نسبت GSH /GSSG به عنوان نشانگر تنش اکسیداتیو شناخته می شود (Kumar *et al*., 2010). افزایش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز نسبت $NADP^+/NADPH$ را افزایش می‌دهد و به همین دلیل مقدار $NADP^+$ در دسترس به عنوان گیرنده انتهایی الکترون در واکنش های نوری فتوسنتز افزایش می یابد و در نتیجه احتمال انتقال الکترون

به اکسیژن و تولید رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل را کاهش می دهد (Abdul Jaleel *et al*., 2009; Wang *et al*., 2006). ماریتیغال گیاهی دارویی متعلق به تیره آستراسه (Asteraceae) است که در مناطق مختلف کشور ایران از جمله چالوس، گنبد کاووس، بابل، دشت مغان، کرمانشاه، خوزستان و جهرم به صورت خودرو می روید. از این گیاه موادی به‌نام سیلی مارین و سیلی بین با خواص درمانی فراوان استخراج شده که میزان آن ها در بذر نسبت به سایر اندام های گیاه بیشتر است (Keville *et al*., 1991). از عصاره بذری این گیاه جهت ساخت نانو ذره نقره استفاده شده است (Mohammadinejad *et al*., 2013).

در این تحقیق به منظور تعیین نقش سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی گیاه ماریتیغال در برابر تنش فلز سنگین کادمیوم، میزان فعالیت و الگوی بیان ژن کد کننده آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در غلظت های مختلف کلرید کادمیوم در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت مواد گیاهی و اعمال تنش: بذور گیاه ماریتیغال از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید و پس از ضدعفونی با هیپو کلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، به کمک آب مقطر چندین بار شستشو داده شد. بذر های ضدعفونی شده، جهت تسریع در جوانه زنی با نیترات پتاسیم ۰/۲٪ به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند (Nabaee *et al*., 2012) و سپس در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو و پنج تکرار در گلدان حاوی نسبت مساوی کوکوپیت و ماسه بادی کشت گردیدند و در قفسه نوری، تحت شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از یک هفته آبیاری با آب مقطر و سبز شدن گیاهچه ها، به مدت دو هفته از محلول کامل غذایی هوگلند جهت آبیاری استفاده شد. پس از این که گیاهچه ها به مرحله دو تا چهار برگی رسیدند، توسط محلول های حاوی ۰ و ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ میکرو مولار کلرید کادمیوم به مدت دو هفته یک روز در میان تحت تنش قرار گرفتند. در این فاصله محلول غذایی هوگلند نیز به گیاهچه ها داده شد (Noorani azad and kafilzadeh., 2010) سپس، نمونه های برگی در ازت مایع منجمد و تا زمان اندازه گیری فعالیت آنزیم و بررسی الگوی بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز در دمای۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج عصاره آنزیمی: برای این منظور یک گرم برگ فریز شده در یک هاون چینی محتوی ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH =۷/۲ که دارای اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ۱ میلی مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید ۱ میلی مولار و پلی وینیل پیرولیدین ۱ درصد بود، ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در

سانتریفیوژ یخچال دار با ۱۴۰۰۰ دور قرار گرفت (Nadernejad., 2014). جهت سنجش پروتئین کل از روش Bradford (1976) استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز: فعالیت این آنزیم به وسیله اکسیداسیون NADPH طبق روش (Foyer *et al*., 1976) تعیین شد. در این روش مخلوط واکنش با حجم کل ۳ میلی لیتر حاوی ۲/۴ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH =۷/۸)، ۳۲/۸۳ میلی گرم گلوتاتیون اکسید شده (GSSG)۰/۵ میلی مولار، ۱۰۰ میکرو لیتر NADPH ۰/۱ میلی مولار، ۰/۰۷۵ گرم EDTA ۲ میلی مولار و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با اضافه کردن NADPH شروع شد. جذب نمونه ها به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد (Nadernejad., 2014). استخراج RNA و ساخت cDNA: RNA کل با استفاده از کیت TOTAL RNA Isolation شرکت دنازیست طبق دستورالعمل آن استخراج شد. تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، از دو روش الکتروفورز در ژل آگارز با غلظت یک درصد و دستگاه نانو دراپ اسپکتروفتومتری استفاده گردید. جهت حذف آلودگی احتمالی DNAتیمار DNase I برای تمامی نمونه ها بر اساس روش پیشنهادی شرکت Thermoscientific انجام شد. مقدار ۵ میکرو گرم از RNA تیمار شده با استفاده از کیت HyperScript شرکت GeneAll برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. طراحی آغازگر: با توجه به این که توالی کد کننده ژن گلوتاتیون ردوکتاز (GR) در گیاه مورد نظر در بانک ژن موجود نبود، در نتیجه طراحی آغازگر از نواحی تقریباً حفاظت شده ژن GR پس از مقایسه و همردیف کردن توالی های نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن، با نرم افزار primer premier v.5 انجام شد (جدول۱). واکنش Semiq- RT- PCR: واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر و در دو تکرار در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرو لیتر محلول آماده جهت پی سی آر، ۲ میکرو لیتر cDNA، ۱۰ پیکو مول از هر آغازگر برای ژن هدف (GR) و ژن کنترل داخلی اکتین (ACT) و ۶ میکرو لیتر آب بود. زمان بندی واکنش PCR ژن هدف و ژن کنترل داخلی اکتین طراحی و واکنش در ۳۵ سیکل انجام شد (جدول۲). پس از پایان واکنش، ۵ میکرو لیتر از محصولات واکنش تکثیر بر روی ژل آگارز ۱ درصد بار گذاری و تحت ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت ۹۰ دقیقه در بافر TBE ۰/۵x الکتروفورز شد. جهت رنگ آمیزی ژل با رعایت اصول ایمنی از اتیدیوم بروماید استفاده و به منظور مشاهده و بررسی نمونه‌ها، از دستگاه UV Gel Document برای عکس برداری استفاده گردید.

جدول ۱- لیست آغازگر های مورد استفاده در واکنش RT- PCR نیمه کمی.

Table 1- list of used primer in semi-quantitative RT-PCR reactions.

نام ژن Gene Name	توالی Sequence	طول محصول (جفت باز) Amplicon Length (bp)
GR	5'- GAGGTGTTGGTGGAACGTG-3': F 5' - CCACGCCATATTGAAGCA -3': R	472
ACT	5'- CTACGAATTGCCTGATGGAC-3': F 5' - CCTCCTGAAAGGACGATGTT -3': R	189

GR: Glutathione Reductase, ACT: Actin

جدول ۲- زمان بندی واکنش RT- PCR نیمه کمی.

Table 2- Timing of semi-quantitative RT-PCR reactions.

مرحله Step	درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	مدت زمان (دقیقه) Time (min)
واسرشت سازی اولیه Pre-Denaturing	94	3
واسرشت سازی هر چرخه Denaturing	94	1
اتصال پرایمر به توالی هدف Annealing	ACT 56 GR 59	1
بسط و ساخت رشته جدید Extension	72	1
تکثیر نهایی Final synthesis	72	10

میانگین هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری با استفاده از آزمون دانکن ($p<0/05$) اختلاف معنی داری ندارند.

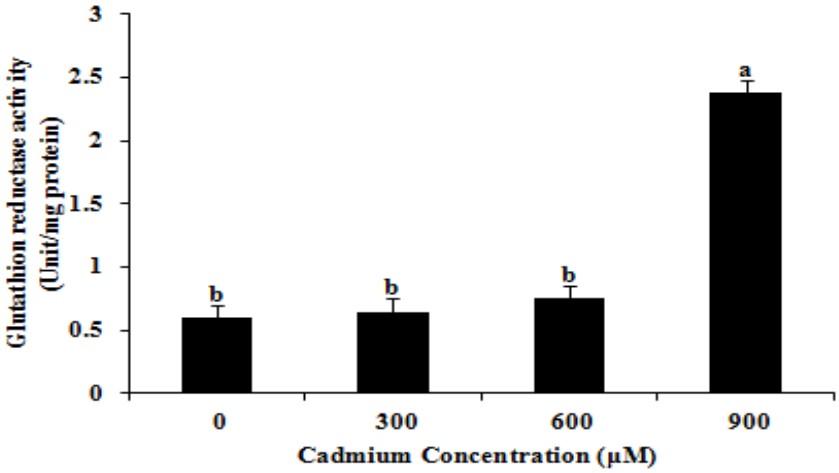
جدا سازی و تعیین توالی قطعه مرکزی ژن گلوتاتیون ردوکتاز (GR): پس از تکثیر ژن با استفاده از دو پرایمر فوروارد و ریورس، محصول PCR قطعه مورد نظر جهت توالی یابی و خالص سازی به شرکت ماکروژن در کشور کره ارسال گردید. بررسی رابطه فیلو ژنتیکی ژن GR بر

اساس توالی اسید امینه حاصل از توالی جزئی ژن جدا شده از گیاه ماریتیغال با سایر جنس های موجود انجام شد. آزمایشات فیزیولوژیکی اندازه گیری فعالیت آنزیم با ۵ تکرار و آزمایشات بیان ژن در ۲ تکرار انجام شد. تجزیه داده ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت. رسم نمودار ها با نرم افزار Excel و کمی کردن محصولات تکثیر شده با استفاده از نرم افزار Total lab TL120 و بررسی رابطه فیلو ژنتیکی و رسم دندروگرام با نرم افزار MEGA6 انجام شد.

نتایج و بحث

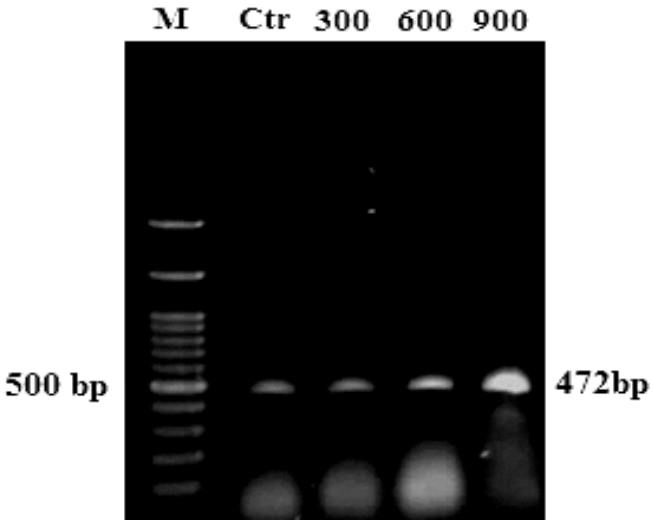
بررسی اثر سطوح مختلف کلرید کادمیوم بیانگر افزایش معنی دار ($p<۰/۰۵$) فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در بالاترین غلظت کلرید کادمیوم (۹۰۰ میکرو مولار) است.

در این مطالعه با افزایش غلظت کادمیوم میزان رونوشت ژن کد کننده GR در مقایسه با شاهد بطور معنی داری افزایش یافت و بیشترین میزان بیان ژن همانند فعالیت آنزیمی در غلظت ۹۰۰ میکرو مولار مشاهده شد و نتایج مربوط به اندازه گیری فعالیت آنزیمی را تایید کرد. بعد از تکثیر ژن GR با استفاده از دو پرایمر Fwd و Rev، محصول PCR قطعه مورد نظر جهت توالی یابی و خالص سازی ارسال گردید. اطلاعات بدست آمده از تعیین توالی جزئی این ژن جدا سازی شده از گیاه ماریتیغال نشان داد طول این قطعه ۴۴۵ جفت است. نتایج هم ردیفی نشان داد که بیشترین میزان شباهت توالی ژن GR جدا شده از گیاه ماریتیغال با Zinnia violacea به میزان ۸۹ درصد می باشد. آنزیم های آنتی اکسیدان مهم ترین ترکیبات در جلوگیری از تنش اکسیداتیو در گیاهان می باشند و این واقعیت وجود دارد که عموماً فعالیت یک یا چند مورد از این آنزیم ها در گیاهان تحت تنش القاء می شوند (Manara, 2012). مطالعات گوناگون در گیاهان و حتی موجودات پروکاریوت نشان دهنده اهمیت حضور این آنزیم در مقابل تنش های محیطی است به طوری که با کاهش ۳۰ تا ۷۰ درصدی فعالیت این آنزیم در گیاه ترانسژنیک تنباکو افزایش حساسیت به تنش های اکسیداتیو تایید شده است (Ding *et al*., 2009). هم چنین تاثیر مثبت این آنزیم در نژاد تغییر شکل یافته‌ی E.coli در مقابله با تنش کادمیوم و پاراکوات (Yoon *et al*. 2005) نشان دهنده اهمیت مطالعه این آنزیم است. نتایج حاصل از این مطالعه نیز بروز واکنش و پاسخ آنزیم های اکسیداتیو به کادمیوم را در گیاه ماریتیغال نشان داد. تنش کادمیوم باعث تحریک GR در سطح رونویسی و فعالیت آنزیمی شد که می تواند دلیلی بر افزایش ترکیبات ROS تحت تنش کادمیوم در گیاهچه های ماریتیغال و القاء سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی به منظور خنثی کردن این ترکیبات باشد (شکل ۱و ۲).



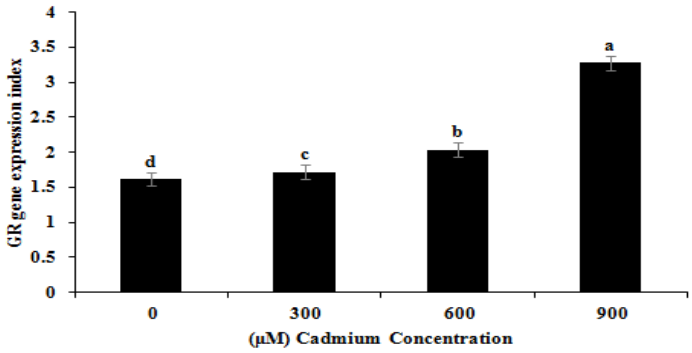
شکل ۱- اثر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در گیاهچه های ماریتیغال. میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری با استفاده از آزمون دانکن (p<۰/۰۵) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 1- Effect of cadmium on GR activity in Silybum m. seedlings. Means followed by the same letters are not significantly different for p< 0.05 according to the Duncan's test.



شکل ۲- نتایج RT-PCR نیمه کمی ژن GR ماریتیغال در غلظت های مختلف کلرید کادمیوم.

Figure 2- Semi quantitative RT-PCR results of GR gene of Silybum m. in different concentrations of cadmium chloride.



شکل ۳- میزان نسبی بیان ژن GR در گیاهچه های ماریتیغال.

Figure 3- Relative expression levels of GR gene in Silybum m. seedlings.

Silybum marianum, Glutathione reductase, partial CDS
GGGGGGCGTGCCCGAGTATAACAACGCGCTTTGGTAACTCCTCCAAACTCAAAGC
CTCATCTGAGGTTATAGCCAACTCCTTCCCAGGAATATCTGCACGGGCCGCCCTG
CTACCAGTTGCTATCAGTATGTGCTTTGCTGTATAGGATAGTTTAGTGCCATCCAA
TTGTATCACCTCCACTTCATTAGGGCCCACGATTCTTCCCTCCCCTTCAAACAGTT
TGACTCCCGCATTTGAAAGTAAGCGCTTGTATATCCCATTTAGCCTCAGTATTTCC
TCAGTCTTCTTGTGCAGTAGCTTTTTCCAATCAAAATCAATCTTCTCATTCACTTGC
CATCCATATTCCTTTGCATCCTGAATTTCAGGCCCAAAGCTTGCTCCATAGACCAG
AATCTTTTTAGGAACGCACCCACGAATCACACACGTTCCCCAAAACACCCTCAA

شکل ۴- توالی نوکلئوتیدی جدا سازی شده ژن گلوتاتیون ردوکتاز در گیاهچه ماریتیغال.

Figure 4- Nucleotide sequence of GR isolated gene in Silybum m. seedling.

جدول ۳- نتایج حاصل از بلاست توالی نوکلئوتیدی ژن GR جدا شده از گیاه ماریتیغال در پایگاه داده NCBI.

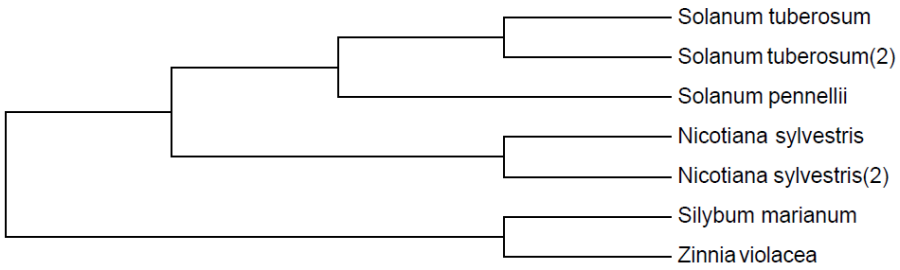
Table 3-Results of GR gene isolated from Silybum m. Blast nucleotide sequences in NCBI database.

Species	E - Value	Identity	Accession
Zinnia violacea	1e-149	89 %	AB158513.1
Arabidopsis lyrata	5e - 44	75 %	XM_002883433.1

جدول ۴- نتایج حاصل از بلاست توالی جزئی ژن GR جدا شده از گیاهچه ماریتیغال.

Table 4- Blast results of the GR gene sequence isolated from Silybum m. seedling.

Species	E - Value	Identity	Accession
Zinnia violacea	2e-87	93%	BAD27393.1
Nicotiana sylvestris	1e-81	86%	XP_009785965.1
Solanum pennellii	2e-81	86%	XP_015087857.1
Nicotiana sylvestris	3e-81	86%	XP_009785967.1
Solanum tuberosum	4e-81	86%	XP_006360359.1



شکل ۵- رابطه فیلو ژنتیکی توالی جزئی ژن GR جدا شده از گیاه ماریتیغال با سایر جنس های موجود بر اساس توالی آمینو اسیدی.

Figure 5- Phylogenetic relationship of GR gene isolated from phylogenetic relationship with other genus based on amino acid sequence.

گلوتاتیون ردوکتاز نیز یکی از آنزیم های بالقوه سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی است که حالت احیا کننده GSH را از طریق چرخه آسکوربات – گلوتاتیون حفظ کرده و یک نقش حیاتی در حفاظت از گروه سولفیدریل داشته و به عنوان سوبسترای گلوتاتیون – اس – ترانسفراز است. علاوه بر این گلوتاتیون ردوکتاز با حفظ ذخیره گلوتاتیون درون سلولی به حالت احیا کننده با سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل واکنش می دهد و باعث از بین رفتن رادیکال آزاد می‌شود (Peerzada *et al*., 2012) و افزایش فعالیت این آنزیم نیز در این تحقیق موید همین مطلب است و نتایج مشابه در مطالعات (Barandeh *et al.*, 2014) روی گیاه عدس گزارش شده است. مطالعه روی دو گیاه Triticum aestivum و نیز Brassica juncea نیز افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز را در تیمار کادمیوم ثابت کرد (Eyidogan and Oz., 2005). نتایج دیگر مطالعات نشان داد که در گیاهچه های ماریتیغال، میزان فعالیت دیگر آنزیم

های آنتی اکسیدان نظیر PAL و APX نیز در برابر تنش فلز کادمیوم افزایش یافت (Pourtabrizi *et al.*, 2017). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هم زمان با افزایش فعالیت آنزیمی، میزان رونوشت ژن کد کننده GR در گیاه ماریتیغال تحت تنش کادمیوم در مقایسه با شاهد بطور معنی داری افزایش یافت و تایید کرد که تنش های محیطی مسبب تنش اکسیداتیو، معمولاً باعث فعال کردن آنزیم های آنتی اکسیدان در سطح رونویسی می شوند (Jithesh *et al.*,2006). از این رو ماریتیغال که توانایی افزایش بیان و فعالیت این آنزیم و سایر آنزیم های دفاع را دارد، احتمالاً متحمل به کادمیوم است. بررسی توالی آمینو اسیدی حاصل از ترجمه قطعه بدست آمده از ژن GR و همردیف سازی مناسب با توالی آمینو اسیدی در سایر گیاهان و دارا بودن ناحیه فعال پروتئینی در این جنس ها، تاییدی بر صحت اطلاعات حاصله از BLAST بود. توالی اسید آمینه‌ای ژن GR گیاه ماریتیغال از خانواده Asteraceae که با استفاده از انتخاب بهترین نتیجه حاصل از نرم افزار Expasy بدست آمد، ۹۳٪ مشابهت را با Zinnia violacea از همین خانواده و درصد بالایی از مشابهت را با گیاهانی هم چون Nicotiana sylvestris از خانواده Solanaceae داشت که علاوه بر تایید مطالعه صحیح ژن مورد نظر، نشان دهنده توالی حفاظت شده این ژن در گیاهان خانواده های دور است.

منابع

Barandeh F, Kavousi HR, Pourseyedi SH (2014). Activity of antioxidant enzymes, PAL and prolin content of lentil seedlings under cadmium stress. 1th Conference on New Finding in Environment and Agriculture Ecosystems. Tehran, Iran

Baryla A, Carrier p, Frank F, Coulomb C, Sahut C, Havaux M (2001). Leaf chlorosis oilseed rape plants (Brassica napus) grown on cadmium-polluted soil: Causes and consequences for photosynthesis and growth. Planta 212:696-709.

Ding Q, Zhang Y, Yang Z, Wen X, Zhang L, Lu C (2009). Enhanced sensitivity to oxidative stress in transgenic tobacco plants with decreased glutathione reductase activity leads to a decrease in ascorbate pool and ascorbate redox state. Plant Molecular Biology 69: 577–592.

Eyidogan F, Oz MT (2005). Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. Acta Physiology Plant 29: 485–493.

Furbank RT, Foyer CH (1988). C_4 Plant as valuable model experimental systems for the study of photosynthesis. New Phytol 109: 265 – 277.

Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill, R (2013). Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. Plant Physiology and Biochemistry. Environmental Toxicology 70: 204 – 212.

Hegedus A, Erdei S, Horvath G (2001). Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress. Plant science 160: 1085-1093.

Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida A (2006). Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the

highly salt tolerant grey mangrove, Avicennia marina (forsk) vierh. By mRNA analysis. Plant Cell Reports 25: 865- 876.

Keville K (1991). The illustrated herb encyclopedia: A complete culinary, cosmetic, medicinal, and ornamental guide to herbs. simon & Schuster Australia, East Roseville, New South Wales.

Kumar A, kazemiyan Abyaneh M, Sulabha G, kulkarni K (2007). Nitrat reductase - mediated metabolism by cadmium toxicity Cucumis sativus. Science Horticulture 521: 523-530.

Manara A (2012). Plant responses to heavy metal toxicity, In: Furini A(Eds.), Plant nad heavy metals. SpringerBriefs in Biometals 14: 28-54.

Mohammadinejad R, Pourseyedi Sh, Baghizadeh A, Ranjbar Sh, Mansoori GA (2013). Synthesis of silver nanoparticles using Silybum marianum seed extract International Journal of Nanoscience and Nanotechnology 9: 221-226.

Nabaee M, Roshandel P, Mohamad Khani A (2012). Effects of various chemical and non-chemical treatments to break seed dormancy in Silybum marianum L. Gaertner. Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 103: 48-54.

Nadernejd N (2013). Investigate the activity of the enzyme phenylalanine ammonia lyase and production of phenolic compounds in pistachio plant and mycorrhizal Aktv effect in reducing oxidative stress, UV-B). Ph.D. Thesis. Shahid Bahonar University, Kerman., Iran.

Noorani Azad H, Kafilzadeh F (2010). The effect of cadmium toxicity on growth, soluble sugars, photosynthetic pigments and some of enzymes in safflower (Carthamus tinctorius L.). Biological Science Promotion 24: 858-867.

Peerzada Y, Khalid RH, Ruby Ch, Parvaiz A (2012). Role of Glutathione Reductase in Plant Abiotic Stress. Abiotic Stress Responses in Plants. Springer Science. Business Media. Chapter 8: 149-158.

Pourtabrizi S, Pourseyedi SH, Abdolshahi R, Nadernarjad N (2017). Effect of cadmium stress on morphological and physiological traits of milk thistle (Silybum marianum). Iranian Society of Plant Physiology (In Press).

Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, del Río LA, Palma JM (2006). Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. New Phytologist 170: 43–52.

Singh B, Myhr K (1998). Cadmium uptake by barley as affected by Cd sources PH levels. Geoderma 84: 185–194.

Singh Gill S, Tuteja N (2010). Reactive Oxygen Species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochemical 48: 909-930.

Wang Jw, Zheng LP, Tan RX (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low- energy ultrasound in Taxus yannanensiscell suspension cultures. Nitric Oxide Biology and Chemistry 15: 351-358.

Yoon HS, Lee IA, Lee H, Lee BH, Jo J (2005). Overexpression of a eukaryotic glutathione reductase gene from Brassica campestris improved resistance to oxidative stress in E. Coli. Biochemical and Biophysical Research Communications 326: 618–623

Zhang F, Zhang H, Wang G, Xu L, Shen Z (2009). Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of Phaseolus aureus and Vicia sativa and the roles of different antioxidant enzymes. Journal Hazard Mater 168: 76-84.

Effect of cadmium stress on gene expression and enzyme activity of glutathione reductase of milk thistle (Silybum marianum)

Pourtabrizi S.[1], Pourseyedi S.H.*[2], Abdolshahi R.[3], Nadernarjad N.[4]

[1] Dept. Agronomy and Plant Breeding College of Agriculture, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.
[2] Dept. Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.
[3] Dept. Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.
[4]Dept. Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.

Abstract

Cadmium (Cd) is a one of the heavy metals that causes oxidative stress in plants and Plants equipped with a scavenging ROS system to protect against this stress. In this study, changes of expression profile and enzyme activity of glutathione reductase (GR) were analyzed in milk thistle (Silybum marianum) seedlings in response to cadmium chloride concentrations (0, 300, 600 and 900 µM) using completely randomized design with two and five replications, respectively. Results of semi quantitative RT- PCR showed that gene expression of GR in stress plants leaves was significantly different from control plants. The lowest and highest gene expression was in control and 900 µM concentration of cadmium chloride, respectively. It could be concluded that glutathione reductase enzyme plays important role in enzymatic antioxidant defense system in response to cadmium toxicity in Silybum marianum.

Keywords: *Antioxidant enzymes, Cadmium, Milk thistle, Glutathione Reductase, Gene expression.*

* Corresponding Author: Pourseyedi Sh. Tel+: 09133430389 Email: spseyedi@gmail.com