

پاسخ فیزیولوژیک و روابط آبی فلفل دلمه‌ای با توقف فعالیت آکواپورین‌های ریشه در شرایط تنش خشکی

زینب معصومی^۱، مریم حقیقی^{۱*}، سید امیرحسین جلالی^۲

^۱ گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ^۲ پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه

صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹)

چکیده

آکواپورین‌ها، پروتئین‌های اصلی در غشا پلاسمایی هستند که حرکت آب، دی‌اکسید کربن و دیگر مواد محلول کوچک از عرض غشا را تسهیل می‌نمایند. هدف از این پژوهش بررسی نقش آکواپورین‌های ریشه بر میزان تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و روابط آبی تحت تنش خشکی است. به همین منظور پژوهشی در قالب طرح کاملاً تصادفی بر روی فلفل دلمه‌ای رقم (Ps۳۰۱) و تحت تنش خشکی در محیط کشت بدون خاک انجام شد. جهت اعمال تنش خشکی از پلی‌اتیلن گلاکول ۶۰۰۰ و توقف فعالیت آکواپورین‌ها از نیترات نقره ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. نتایج نشان داد که در حضور آکواپورین‌ها میزان وزن تر و خشک ریشه و شاخساره، میزان رطوبت نسبی (۲۲٪)، پروتئین (۴۴٪)، غلظت عناصر سدیم (۲۹٪)، پتاسیم (۱۳٪) و محتوای آبسزیک اسید (۱۹٪) افزایش یافت. همچنین در نبود آکواپورین‌ها در شرایط تنش خشکی منفی تر شدن پتانسیل آب ریشه (۵۷٪)، افزایش میزان پرولین (۱/۲ برابر)، محتوای آبسزیک اسید (۱۲٪) و محتوای فنول (۹۰٪) به‌عنوان عامل محافظت‌کننده سلول در مقابل رادیکال‌های آزاد مشاهده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده حاصل از تنش خشکی و توقف فعالیت آکواپورین‌ها می‌توان به نقش اساسی کانال‌های آبی در تنظیم اسمزی به کمک انتقال آب و کاهش اثرات تنش اشاره کرد.

کلمات کلیدی: پتانسیل آب، کانال‌های آب، فنول

مقدمه

کاهش رشد است که باعث پاسخ‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه می‌شود. این در حالی است که دهیدراسیون ناشی از تنش خشکی از طریق اختلال در واکنش بیوشیمیایی فتوسنتز نرخ فتوسنتزی را کاهش می‌دهد (Mafakheri et al., 2010). از سوی دیگر، در هنگام تنش خشکی به دلیل بسته شدن روزنه‌ها میزان دی‌اکسید کربن هم کاهش می‌یابد و به سیستم فتوسنتز آسیب می‌رساند. عمده‌ترین اثر تنش خشکی روی کاهش اسیمیلاسیون دی‌اکسید کربن

تنش‌های غیرزیستی مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد هستند که با تأثیر منفی که بر وضعیت رشد و فتوسنتز گیاه دارد موجب کاهش شدید عملکرد می‌گردند (Chaves and Oliveira, 2004). در حال حاضر با توجه به شرایط آب و هوایی، توزیع و پراکنش گیاهان، تنش خشکی دومین تنش غیرزیستی آسیب‌زننده به محصولات کشاورزی در سراسر دنیا است (Blumwald, 2000). اولین واکنش گیاه به تنش خشکی،

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mhaghghi@cc.iut.ac.ir

در مسیر بسته شدن سلول نگرهبان روزنه مؤثر است. در هنگام تنش خشکی، گیاه برای مقابله با تغییرات ایجاد شده در شرایط محیطی، در درون خود تغییراتی ایجاد می‌کند. این تغییرات شامل افزایش میزان جذب آب، میزان مواد محلول و مواد فعال اسمزی از جمله شکسته شدن پروتئین‌ها، افزایش آمینواسیدها، مواد معدنی و پرولین است (Koc et al., 2010).

تنش خشکی سبب آسیب به سیستم ریشه، کاهش جذب عناصر و گردش آن در گیاه می‌شود. همچنین پتاسیم در حفظ پتانسیل اسمزی و جذب آب نقش دارد. گیاهان با ذخیره مطلوب پتاسیم، پتانسیل اسمزی را افزایش می‌دهند و آب کمتری از دست می‌دهند. پتاسیم نقش مهمی در کاهش تنش‌های حاصل از کم‌آبی از طریق تنظیم روزنه‌ها و ایجاد تعادل یونی درون سیستم گیاهی ایفا می‌کند (Chaudhry and Mushtag, 2004).

مطالعات متعدد نشان داده است که آبسیزیک اسید در این رابطه به عنوان یک واسطه در واکنش پذیری گیاه به محرک‌های محیطی، عمل می‌نماید. غلظت آبسیزیک اسید در گیاهان با افزایش شدت تنش افزایش و با کاهش سطح تنش خشکی به سرعت کاهش و به سطح اولیه باز می‌گردد (Castonguay, 1993). افزایش محتوای آبسیزیک اسید بافت برگ، از طریق کاهش گشودگی روزنه‌ها، خروج آب از گیاه را کاهش می‌دهد. در این رابطه به نظر می‌رسد در سطح سلول‌های محافظ روزنه، گیرنده ویژه آبسیزیک اسید وجود دارد که در لایه بیرونی غشا پلاسمایی آنها قرار گرفته است. وجود این گیرنده و عمل آن باعث تغییر در باز شدن کانال‌های یونی شده و شیب پروتئینی را فعال می‌نماید. در واقع با بسته شدن روزنه‌ها در پاسخ به عوامل شیمیایی از جمله آبسیزیک اسید به عنوان یک ساز و کار جهت حفظ آب و کاهش تعرق در اثر تنش خشکی مطرح است. گیاهان تحت شرایط تنش خشکی دارای سیستم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فنولی هستند که تولید اضافی گونه‌های فعال اکسیژن را کنترل می‌کند و آنها را در مقابل آثار مخرب گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کند و سطح مناسبی از رادیکال‌های آزاد این ترکیبات را برای رشد و مسیر انتقال پیام

ناشی از بسته شدن روزنه است. در هنگام تنش خشکی گیاه برای اجتناب از خشکی و نهایت استفاده از مقدار آب محدودی که در اختیار دارد، اقدام به بستن روزنه‌های خود می‌کند تا از هدرروی آب جلوگیری شود بنابراین با شروع دوره خشکی تا مدتی گیاه تعرق و هدایت روزنه‌های خود را در سطح حداکثر نگه می‌دارد ولی با تداوم دوره خشکی اقدام به تنگ نمودن روزنه و در نهایت بستن آنها می‌نماید (Nahar et al., 2018). از سوی دیگر، تنش خشکی موجب تخریب کلروفیل و ظهور رنگریزه‌های محافظ مانند کارتنوئیدها (گزاتوفیل، کاروتن، لیکوپن) و آنتوسیانین می‌گردد (Chalkerscott, 2002). در شرایط تنش، به دلیل کاهش آب در دسترس گیاه، پتانسیل اسمزی محلول غذایی کاهش می‌یابد و گیاه توانایی جذب آب خود را از دست می‌دهد. بنابراین جذب عناصر غذایی محلول در آب محدود می‌گردد و در نتیجه رشد و نمو گیاه و وزن تر و خشک ریشه و شاخساره کاهش می‌یابد (Farooq et al., 2009). میزان کلروفیل فلورسانس (Fv /Fm) که نشان‌دهنده ظرفیت انتقال الکترون PSII است در اثر تخریب سیستم فتوسنتزی و دگرگونی در تغییر رنگدانه‌های فتوسیستم II کاهش می‌یابد. در این هنگام آنزیم‌های تجزیه‌کننده کلروفیل‌از، موجب تجزیه شدن رنگدانه‌های فتوسنتزی فعال همچون کلروفیل و کارتنوئید می‌شوند (Havaux and Niyogi, 1999). در اثر اعمال تنش خشکی با منفی شدن پتانسیل اسمزی و پتانسیل آب در برگ‌ها، گیاه قادر خواهد بود که آب بیشتری را از خاک جذب کند (Maricle et al., 2007).

محققان با بررسی واکنش گوجه‌فرنگی به تنش خشکی دریافتند که تنش از طریق اختلال در روابط آبی گیاه منجر به کاهش رطوبت نسبی می‌شود (Sanchez Rodriguez, 2010). از سوی دیگر، در اثر تنش خشکی دیواره سلولی تخریب و مایع سلولی به داخل محیط تراوش شده و باعث غلیظ‌تر شدن مایع سلولی می‌شود و هر چه میزان غلظت مایع سلولی بیشتر شود نشان‌دهنده تخریب بیشتر و بالارفتن هدایت الکتریکی محلول می‌شود.

کارتنوئید به عنوان پیش‌ساز تولید هورمون آبسیزیک اسید

گیاه فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum* L.) رقم Ps301 تحت شرایط دمای متوسط روزانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شبانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵٪ با تیمارهای گیاه تحت تنش خشکی دارای اکوپورین فعال (D_{aq}) و گیاه تحت تنش خشکی که فعالیت اکوپورین ریشه آن متوقف شده بود (D_{-aq}) انجام شد.

ابتدا بذرهای فلفل دلمه‌ای در سینی نشا حاوی بستر پرلایت و ورمی‌کولایت با نسبت حجمی ۱ به ۲ کشت شد. زمانی که برگ حقیقی نهال‌ها ظاهر شد، با شستشوی کامل ریشه به کمک آب مقطر به ظروف پلاستیکی با قطر ۱۶ و ارتفاع ۱۳ سانتی‌متر و حجم ۱ لیتر حاوی محلول غذایی جانسون انتقال یافت. این ظروف هر ۱۵ دقیقه، به مدت ۵ دقیقه هوادهی گردید و در اتاقک رشد گلخانه نگهداری شدند. تنش خشکی به وسیله پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ مطابق روش میچل و کافمن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به میزان ۵- بار اعمال شد. قابل ذکر است که در آزمایش مقدماتی از بین ۴ سطح ۲-، ۳-، ۴- و ۵- بار خشکی، ۵- بار به عنوان حد تنش‌زا برای فلفل دلمه‌ای انتخاب شد. جهت توقف فعالیت اکوپورین‌ها نیترات نقره به میزان ۵۰ میلی‌مولار (Jyostna, Devi et al., 2012) به محلول غذایی اضافه شد. طبق نظر Alexandersson (۲۰۱۰) مبنی بر تأثیر زمان بر فعالیت اکوپورین‌ها و پاسخ ابتدایی گیاه در این شرایط بلافاصله پس از اتمام زمان ۴۸ ساعت از قرارگیری نمونه‌ها در شرایط تنش خشکی نمونه‌گیری و شاخص‌های زیر اندازه‌گیری شد.

جهت اندازه‌گیری وزن تر و خشک ریشه و شاخساره پس از خارج کردن گیاهان از ظروف پلاستیکی ریشه آنها شسته با کمک چاقوی تیز از محل طوقه بخش هوایی و ریشه از هم جدا شد و هر کدام به کمک ترازوی دیجیتال توزین شدند. سپس بخش هوایی و ریشه به صورت جداگانه داخل پاکت‌های کاغذی قرار گرفتند و به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس با ترازوی دیجیتال توزین شدند.

جهت اندازه‌گیری کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) نمونه‌ها در طول آزمایش با دستگاه فلورسانس سنج (مدل RS

حفظ می‌کند (Mittler et al., 2004). میزان پرولین به عنوان محافظ اسمزی و محافظت از غشا پلاسمایی در برابر رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. گیاهان تا حد ممکن از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله بستن روزنه‌ها، زخم‌شدن کوتیکول، افزایش وزن و طول ریشه، جلوگیری از کاهش پروتئین، بالا نگه‌داشتن فتوسنتز و کاهش تنفس و تنظیم اسمزی می‌تواند در برابر خشکی مقاومت کند (Hajar, 1997). میزان بیان ژن پروتئین‌های غشا پلاسمایی (Plasma membrane Intrinsic Proteins)، ایزوفرم نوع ۱ (PIP1) در برگ گیاهانی که تحت تنش خشکی قرار می‌گیرند افزایش می‌یابد که ممکن است به دلیل نقش اصلی ریشه برای انتقال آب باشد (Luu and Maurel, 2005). تصور بر این است که در هنگام تنش خشکی، سلول میزان نفوذپذیری غشا را به منظور افزایش عبور آب بهبود می‌بخشد (Maathuis et al., 2003). اکوپورین‌ها، پروتئین‌های غشایی هستند که وظیفه انتقال آب، اوره، گلیسرول و دی‌اکسید کربن را در فضای سیمپلاستی به عهده دارند (Johanson et al., 2001). اکوپورین‌ها مسئول تنظیم دقیق حرکات آب هستند، در نتیجه نقش مهمی در تحمل تنش خشکی ایفا می‌کنند. همچنین می‌توانند به عنوان مولکول‌های اصلی برای مقابله با تنش عمل کنند. میزان بیان اکوپورین‌ها تحت تأثیر گونه، شدت تنش، طول مدت تنش و مرحله رشدی قرار می‌گیرد. PIP های گیاهی را بر اساس توالی-ها و فعالیت کانال آب می‌توان به دو دسته عمده، PIP1 و PIP2 تقسیم کرد (Bienert et al., 2011). فلزات سنگین همچون نیترات نقره و کلرید جیوه قدرت مهارکردن اکوپورین‌ها را در جریان یک طرفه دارا هستند (Agre et al., 1997).

هدف از این تحقیق شناخت اثر اکوپورین ریشه در پاسخ فیزیولوژیک گیاه فلفل دلمه‌ای به عنوان گیاه الگو در زمان عدم فعالیت اکوپورین‌های ریشه است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه‌های تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان بر روی

برای کلروفیل a، کلروفیل b و نهایتاً کارتنوئید خوانده شد (Arnon, 1967).

$$\text{Carotenoids} = 100(A470) - 3.27(\text{mg Chl a}) - 104(\text{mg Chl b}) / 227$$

برای اندازه‌گیری پروتئین از روش برادفورد استفاده می‌شود که یک سنجش کلرومتری با استفاده از اسپکتروفتومتر است و به منظور ساختن یک منحنی استاندارد که برای محاسبه غلظت پروتئین نمونه به کار می‌رود. پس تهیه نمونه‌ها، میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد، غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (Bradford, 1976).

جهت اندازه‌گیری میزان غلظت عناصر سدیم و 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 کلریدریک اسید دو مولار استفاده شد و در نهایت به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانیده شد و با استفاده از دستگاه فلیم‌فوتومتر (JENWAY, PFP-7) اندازه‌گیری شد (Hamada and EL-enany, 1994).

برای اندازه‌گیری محتوای آب‌سازیک اسید یک گرم بافت تازه، با متانول ۸۰٪ و ۰/۱ گرم پلی‌وینیل پیرولیدون در دمای ۴ درجه سلسیوس یکنواخت شد. سپس در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی برداشته شد و pH آن به ۸ رسید. متانول توسط خلع تبخیر شد و مقدار ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه به باقیمانده محلول 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. یک میلی‌لیتر محلول حاوی سه درصد متانول و ۰/۱ مول استیک اسید به رسوب باقیمانده اضافه و حل شد. سپس از صافی ۰/۴۵ میلی‌متر عبور داده شد و به ستون فاز معکوس (Diamonsic, C₁₈, 5µm) به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر در دستگاه HPLC (Unicam-Crystal-200, UK) تزریق گردید. فاز متحرک گرادیان متانول-استیک اسید (۳٪-۹۷٪) با سرعت چهار میلی‌لیتر در دقیقه به همراه دکتور diode array استفاده شد. از استاندارد آب‌سازیک اسید با خلوص ۹۹/۹۷٪ ساخت کارخانه

۲۳۲، انگلستان) اندازه‌گیری شد. بدین منظور برگ گره‌های میانی به مدت ۲۰ دقیقه به وسیله گیره‌های مخصوص در تاریکی قرار داده شدند و پس از آن Fv/Fm اندازه‌گیری شد.

به منظور اندازه‌گیری پتانسیل آب، در زمان بیشینه دمای هوا از برگ‌های میانی بوته و قسمت انتهایی برگ و ریشه به همراه طوقه برداشت شد و با دستگاه بمب فشار یا محفظه فشاری (SKPM1405, GBR) اندازه‌گیری شد (Turner, 1988).

جهت اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ دیسک‌های برگ‌ها از برگ سوم سه گیاه موجود در گلدان جدا گردید. دیسک‌های برگ‌ها توزین شدند و وزن تر آنها (FW) به دست آمد. پس از آن دیسک‌های برگ‌ها بلافاصله در آب یون‌برداری شده در پتری‌دیش به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. وزن اشباع دیسک‌های برگ‌ها (TW) با گرفتن آب سطحی و سپس توزین آنها به دست آمد. وزن خشک دیسک‌های برگ‌ها (DW) پس از قراردادن دیسک‌های برگ‌ها در آن ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت و سپس توزین آنها به دست آمد. در پایان محتوای نسبی آب برگ از رابطه زیر محاسبه گردید (Martinez et al., 2004; Singh et al., 2000).

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

برای اندازه‌گیری میزان نشت یونی در هر تکرار سه دیسک برگ‌ها (برگ‌های بالغ انتهایی) به قطر یک سانتی‌متر تهیه شد. سپس نمونه‌ها سه بار توسط آب دیونیزه شستشو شدند. ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به آن اضافه شده و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) 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 در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند و بعد از سرد شدن مجدداً EC محلول اندازه‌گیری شد (EC₂). سپس با استفاده از رابطه زیر میزان نشت یونی به دست آمد (Lutts et al., 1996).

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

رنگیزه‌های فتوسنتزی توسط حلال استون ۱۰۰٪ استخراج گردید و به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-600A میزان جذب نور در سه طول موج ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر به ترتیب

محلول اضافه سپس ۳۰ ثانیه ورتکس شد. نمونه به مدت ۸ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ قرار گرفت. سپس فاز رویی جدا و به میکروتیوب جدید منتقل و به میزان یک سوم حجم فاز رویی جدا شده لیتیم کلراید ۲ مولار و همچنین هم حجم نمونه، ایزوپروپانول سرد (۲۰°C-) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. محلول رویی با دقت به‌طور کامل از میکروتیوب حذف گردید. سپس به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد و نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. الکل به‌طور کامل خارج و خشک شد. پس از خشک شدن رسوب به میزان ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب عاری از RNase اضافه گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ترمومیکس قرار گرفت و پس از آن در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

هضم DNA با DNaseI (Thermoscientific, USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. عملکرد و کیفیت RNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ (pico200, Picodrop, UK) تعیین شد. جهت ساخت رشته cDNA، ۱ میکروگرم RNA کل استخراج شده با استفاده از Revert Aid M-Mulv Reverse Transcriptas (Thermo Scientific, USA)، سنتز شد. تجزیه و تحلیل زمان واقعی PCR جفت پرایمر مورد استفاده برای بیان ژن آکوپورین (PIP1) و ژن مرجع اکتین به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. در یک مخلوط واکنش ۱۰ میلی‌لیتر، حاوی ۵ میکرولیتر SYBRGreen (Gent Bio. PRK)، ۱/۸ میکرولیتر آب DNase / RNase free، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۰/۲ واحد ROX با شرایط PCR به شرح: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ دور، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. بیان نسبی ژن‌های آکوپورین (PIP1) با استفاده از روش Comparative C_t (ΔΔC_t) مقایسه دوره از رابطه $2^{-\Delta\Delta C_t}$ برای بررسی بیان ژن (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد.

Sigma استفاده شد تا پیک خروجی با کالیبراسیون برای سنجش نمونه استخراجی مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس سطح زیر منحنی و موفقیت آن در پیک‌های خروجی مقدار نمونه مجهول استخراجی تعیین شد (Flexas, 2006).

میزان ترکیبات فنولیک با دستگاه اسپکتروفتومتری با طول‌موج ۷۶۵ نانومتر از روش Singleton و Rossi (۱۹۶۵) اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از نمودار استاندارد میزان فنول نمونه به‌دست آمد (Singleton and Rossi, 1965).

به‌منظور اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان ابتدا از گیاهان خشک‌شده در آن عصاره‌گیری شد. سپس برای اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان برگ به شیوه (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV-600A ساخت کشور انگلستان) استفاده شد و غلظت نهایی بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (Yu et al., 2002).

$$\text{جلب کنترل} - \text{جلب نمونه} = \frac{\text{درصد ممانعت کنترلی}}{\text{جلب کنترل}}$$

جهت تهیه محلول‌های پرولین استاندارد از پرولین خالص استفاده گردید. برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از غلظت‌های مختلف پرولین و از تولوئن خالص به‌عنوان شاهد استفاده گردید و منحنی استاندارد رسم گردید. پس از تهیه نمونه‌ها میزان جذب در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد و غلظت پرولین نمونه‌ها بر حسب میکرومول در گرم وزن تر نمونه محاسبه و بیان گردید (Bates et al., 1973).

جهت استخراج RNA و سنتز cDNA به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی همراه با ۰/۰۱ گرم پودر پلی وینیل پلی پیرولیدون با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج RNA کیت ایرایزول (شرکت زیست فن آوران RNA) در هاون چینی استریل شده کاملاً ساییده شد. تمامی بافت به همراه بافر به میکروتیوب استریل شده انتقال و به مدت ۲ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. فاز رویی شفاف جدا و به میکروتیوب استریل جدید افزوده شد. به میزان ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم و ۰/۱ حجم مایع جدا شده، سدیم استات ۳ مولار با pH ۵/۲ به

مواد محلول به درون سلول کاهش یافته و سبب کاهش جذب آب و عناصر توسط ریشه که بر رشد اندام هوایی تأثیرگذار است (Farooq et al., 2009).

نتایج تنش خشکی در حضور و عدم حضور آکوپورین‌ها نشان داد که کمترین مقدار کلروفیل فلورسانس به گیاهان تحت تنش در نبود آکوپورین تعلق داشت. همچنین، بین تیمار شاهد و گیاهان تحت تنش در حضور آکوپورین‌ها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). کلروفیل فلورسانس اطلاعاتی در مورد وضعیت فتوسیستم II و جریان الکترون در فتوسیستم به‌عنوان شاخصی برای میزان کلی فتوستنز در اختیار ما می‌گذارد. در بررسی روند فتوستنزی و کلروفیل فلورسانس گیاهان تحت تنش خشکی، مشاهده شد که عدم دسترسی به آب در روزهای اول بعد از تنش، کاهش چندانی در فتوستنز، تعرق و هدایت روزنه‌ای نداشت (Percival and Sheriffs, 2002). به‌دلیل توقف عملکرد آکوپورین‌ها تحت تأثیر نترات نقره میزان آب در گیاه کاهش می‌یابد و موجب تغییر کارایی نسبی انتقال الکترون از فتوسیستم II به فتوسیستم I می‌شود در نتیجه میزان فتوستنز کاهش می‌یابد (Percival and Sheriffs, 2002).

پتانسیل آب برگ و ریشه تحت تأثیر تنش خشکی نسبت به شاهد روند کاهشی داشت اما اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در گیاهان D_{aq} و D_{-aq} مشاهده نشد (جدول ۲). محتوای نسبی آب برگ و ریشه در گیاهان تحت تنش نسبت به شاهد روند کاهشی داشت که کمترین میزان محتوای نسبی آب برگ (44%) و ریشه (64%) در گیاهان D_{-aq} مشاهده شد. محتوای آب نسبی منعکس‌کننده فعالیت متابولیک در بافت‌های گیاه است. گیاهان متحمل به خشکی با جذب آب از پروتوپلاست، آب بیشتری را در خود نگهداری می‌کنند، بنابراین دارای مقادیر بالاتری از محتوای آب نسبی هستند زیرا بیشتر بودن رطوبت نسبی برگ در شرایط تنش به معنی جذب آب بیشتر و افزایش تورژسانس سلولی است (YoungKwon and YoungWoo, 2016). با منفی شدن پتانسیل اسمزی و در نتیجه پتانسیل آب در برگ‌ها، گیاه قادر خواهد بود آب را از خاک جدا نموده

جهت اندازه‌گیری شاخص حساسیت به تنش در هر یک از صفات اندازه‌گیری شده به روش فیشر و مائور از فرمول زیر استفاده می‌شود (نباتی و همکاران، ۱۳۹۷):

$$SSI = 1 - Y_s / Y_p$$

شاخص حساسیت به تنش = SSI، میزان صفت در محیط

بدون تنش = Y_p ، میزان صفت در محیط تنش = Y_s .

هر چه میزان شاخص حساسیت به تنش در رقم پایین‌تر باشد، بیانگر متحمل‌تربودن آن رقم، به شرایط تنش خواهد بود؛ و هر چه مقدار Y_p و Y_s نزدیک به هم باشد نشان‌دهنده آن است که پایداری عملکرد آن واریته بیشتر است و هر چه SSI کوچک‌تر باشد تحمل آن واریته به تنش مورد نظر بهتر است. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل طبقه‌بندی و با برنامه آماری Statistix 8 آنالیز شدند و مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد محاسبه شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که میزان وزن تر شاخساره و وزن تر ریشه تحت تنش خشکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و وزن تر شاخساره در نبود آکوپورین‌ها بیشترین میزان کاهش را داشت در حالی که کمترین وزن خشک شاخساره در گیاهان تحت تنش با حضور آکوپورین‌ها مشاهده شد که از لحاظ آماری با گیاهان تحت تنش و عدم حضور آکوپورین‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. تفاوت معنی‌داری در میزان وزن خشک ریشه بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۱). در پژوهشی Farooq و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که روند عمومی که گیاهان در شرایط تنش خشکی با آن روبرو هستند کاهش وزن تر و خشک گیاه است که با روند تغییرات در این آزمایش مشابه است. کمبود آب در گیاه سبب کاهش پتانسیل اسمزی محلول غذایی می‌شود بنابراین سلول‌های ریشه قادر به جذب آب مورد نیاز برای رشد نیستند؛ در نتیجه در گیاه جذب برخی عناصر غذایی محلول در آب محدود و در نهایت رشد و نمو گیاه و وزن خشک کل به‌دلیل نقص در سوخت ساز گیاه کم می‌شود همچنین در عدم حضور آکوپورین‌ها میزان انتقال آب و

جدول ۱- تأثیر تنش خشکی بر وزن تر و خشک شاخساره و ریشه، فلورسانس کلروفیل و شاخص سبزیگی فلفل دلمه‌ای تحت تنش خشکی و در شرایط حضور و عدم حضور آکوپورین

تیما	وزن تر شاخساره				تیما
	وزن خشک شاخساره	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	فلورسانس کلروفیل (fv/fm)	
شاهد	۳/۸۵ ^a	۲/۲۷ ^a	۰/۴۲ ^a	۰/۸۰ ^a	
تنش در حضور آکوپورین	۳/۰۹ ^b	۱/۱ ^b	۰/۳۲ ^{ab}	۰/۸۲ ^a	
تنش در عدم حضور آکوپورین	۱/۸۷ ^c	۱/۴۴ ^b	۰/۳۳ ^{ab}	۰/۳۸ ^b	

*: اعداد هر ستون دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۰.۰۵ فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

جدول ۲- تأثیر تنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیک فلفل دلمه‌ای تحت تنش خشکی و در شرایط حضور و عدم حضور آکوپورین

تیما	پتانسیل		محتوای نسبی	محتوای نسبی آب	محتوای نسبی آب	نشت یونی	کارتونوئید	پروتئین کل
	آب برگ	آب ریشه						
شاهد	-۱/۵۳ ^b	-۵/۵ ^b	۷۳/۵ ^a	۸/۱۶ ^a	۱۷/۹ ^a	۳۱/۲ ^b	۷/۲۳ ^b	۰/۵۵ ^a
تنش در حضور آکوپورین	-۲/۸۳ ^a	-۱۰ ^a	۵۷/۰ ^b	۶/۶۵ ^b	۸/۱۶ ^b	۳۴/۱ ^{ab}	۱۷/۳۲ ^a	۰/۲۹ ^b
تنش در عدم حضور آکوپورین	-۲/۰۱ ^a	-۰/۱۳ ^a	۲۳/۰ ^c	۴/۶ ^c	۶/۳۹ ^c	۶۲/۳ ^a	۱۷/۵۲ ^a	۰/۱۰ ^c

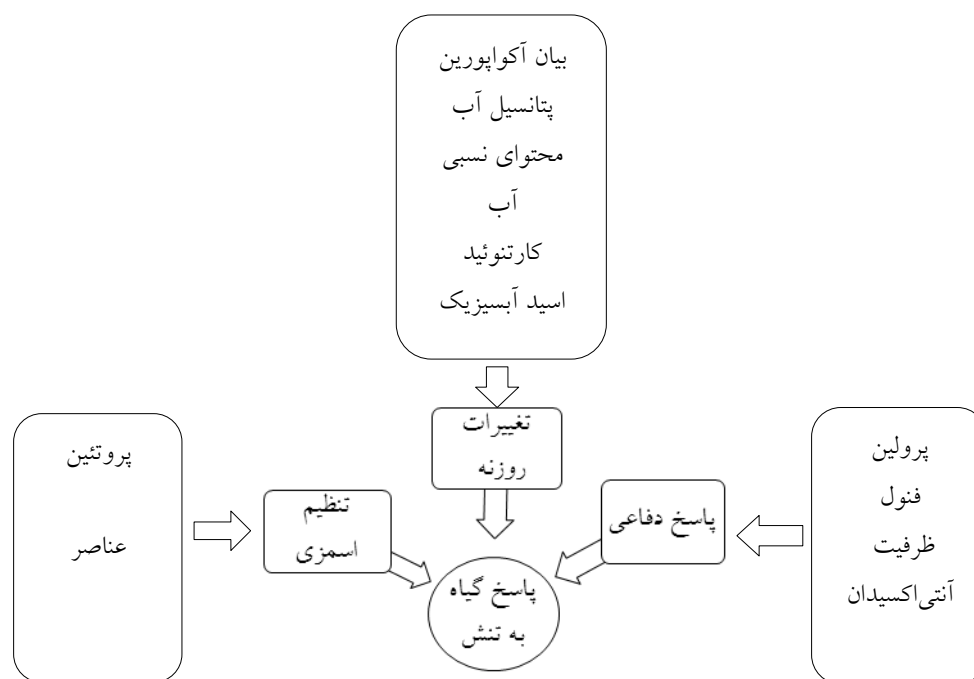
*: اعداد هر ستون دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۰.۰۵ فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

عدم حضور آکوپورین‌ها میزان آب سلول را کاهش می‌دهد در نتیجه یون‌ها به خارج سلول تراوش می‌کند (خزاعی، ۱۳۸۱). طبق بررسی‌های انجام شده در این آزمایش میزان کارتونوئید در گیاهان تحت تنش و در حضور و عدم حضور آکوپورین‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۲) کارتونوئید به‌عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از طریق خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد و پیش‌ساز تولید هورمون آبسزیک اسید نقش مهمی در تعدیل اثرات سو تنش دارد. بر اساس نتایج به‌دست آمده (جدول ۲) بر اثر تنش خشکی میزان پروتئین روند کاهشی نشان داد که بیشترین کاهش در گیاهان تحت تنش و عدم حضور آکوپورین‌ها است. تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی از آمینواسیدها در جهت افزایش پتانسیل اسمزی جهت مقابله با تنش است (شکل ۱).

نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تغییرات غلظت یون سدیم در گیاهان D_{aq} و D_{-aq} نسبت به

و در بافت‌های خود ذخیره کند تا بتواند آب ذخیره شده را مورد استفاده قرار دهد. در صورتی که آب به اندازه کافی در اختیار گیاه باشد برگ‌ها حالت اشباع به خود می‌گیرد (Figueiredo, 2015). با توجه به نتایج میزان پتانسیل آب ریشه در تنش و عدم حضور آکوپورین‌ها برخی از گیاهان قادرند به‌طور نسبی دوره‌های طولانی خشکی را پشت سر گذارند. با این شرایط گیاه قادر خواهد بود با وجود کمبود آب، پتانسیل آبی خود را بالا نگه داشته و تورژسانس سلولی و رشد را حفظ نموده و از اثرات بعدی خشکی دوری گزیند (Maricle, 2007).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان نشت یونی در گیاهان تحت تنش نسبت به شاهد روند افزایشی داشت و بیشترین میزان نشت یونی در گیاهان تحت تنش و عدم حضور آکوپورین‌ها به میزان ۹۹٪ افزایش یافت (جدول ۲). در گیاهان تحت تنش خشکی، کمبود آب، افزایش رادیکال‌های آزاد و



شکل ۱- بررسی روابط عوامل محافظت کننده در برابر تنش

طریق کاهش بازشدن روزنه‌ها کاهش می‌دهد (شکل ۱) و عمل بسته‌شدن روزنه‌ها بسیار سریع انجام می‌شود (Mohammadkhani and Heidari, 2008). در گیاهان D_{aq} و D_{aq} نسبت به شاهد محتوای فنول، ظرفیت آنتی‌اکسیدان و پرولین روند صعودی داشت (جدول ۳). در گیاهان فنول و آنتی‌اکسیدان به‌عنوان عوامل محافظت‌کننده سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد هستند، بنابراین در شرایط تنش میزان آنها افزایش می‌یابد و در تنش خشکی در گیاهان تخریب پروتئین‌ها و اکسیداسیونی صورت می‌گیرد که موجب تجمع پرولین می‌شود. همچنین این تجمع در نبود آکوپورین‌ها در گیاهان تحت تنش افزایش بیشتری می‌یابد. در بررسی بیان ژن آکوپورین با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که میزان بیان این ژن در بافت ریشه در گیاهان D_{aq} و D_{aq} اختلاف معنی‌داری داشت اما در بافت برگ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۴). با توجه به نتایج حاصله میزان بیان ژن آکوپورین در گیاهان تحت تنش و عدم حضور آکوپورین‌ها کاهش یافت و این کاهش در ریشه نسبت به گیاهان تحت تنش و حضور آکوپورین‌ها بیشتر بود.

شاهد از نظر آماری معنی‌دار بود اما غلظت یون پتاسیم اثر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۳). با توجه به نقش یون‌های سدیم و پتاسیم در کانال‌های پادبر جهت تنظیم فشار اسمزی و کنترل روزنه‌ای برای حفظ آب سلول میزان این دو یون در عدم حضور آکوپورین‌ها افزایش یافته‌است (Chaudhry and Mushtag, 2004).

میانگین محتوای آبسزیک اسید در گیاهان D_{aq} و D_{aq} نسبت به شاهد به‌میزان ۲۰٪ افزایش یافت (جدول ۳). آبسزیک اسید از هورمون‌هایی است که نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای مهم فیزیولوژیکی، رشد و نمو و همچنین عکس‌العمل‌های سازگاری گیاه به تنش‌های محیطی را ایفا می‌کند. تحت تنش‌های محیطی، سیستم هورمونی گیاهان تحت تأثیر قرار می‌گیرد بنابراین محتوای آبسزیک اسید در گیاهان با افزایش شدت تنش افزایش می‌یابد که می‌توان به این نکته اشاره کرد که در اثر تنش اعمال‌شده گیاه برای حفظ آب این هورمون را در جهت بسته‌شدن روزنه‌ها برای جلوگیری از تعرق افزایش می‌دهد. شواهد معتبری وجود دارد که افزایش محتوای آبسزیک اسید بافت برگ، خروج آب از گیاه را از

جدول ۳- تأثیر تنش خشکی بر برخی شاخص‌های تنش فلفل دلمه‌ای تحت تنش خشکی و در شرایط حضور و عدم حضور آکوپورین

تیمار	غلظت سدیم (mg.g ⁻¹ DW)	غلظت پتاسیم (mg.g ⁻¹ DW)	آبسیزیک اسید (ng ⁻¹ grFW)	محتوای فنول (mg g ⁻¹ FW)	ظرفیت آنتی‌اکسیدان (%)	پرولین (μmol g ⁻¹ FW)
شاهد	۱۴/۶ ^{ab}	۲۹/۷ ^a	۱۹/۷ ^b	۱۵/۳ ^c	۵۲/۸ ^b	۸/۷۱ ^c
تنش در حضور آکوپورین	۱۸/۹ ^a	۳۳/۶ ^a	۲۳/۶ ^a	۲۳ ^b	۵۳/۶۵ ^b	۱۳/۶ ^{ab}
تنش در عدم حضور آکوپورین	۶/۳۱ ^b	۲۲/۱ ^a	۲۲/۱ ^a	۲۹/۰ ^a	۶۴/۸۴ ^a	۱۸/۴ ^a

*: اعداد هر ستون دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۰.۰۵ فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

جدول ۴- تأثیر تنش خشکی بر بیان ژن آکوپورین برگ و ریشه فلفل دلمه‌ای تحت تنش خشکی و در شرایط حضور و عدم حضور آکوپورین

تیمار	بیان ژن آکوپورین برگ	بیان ژن آکوپورین ریشه
تنش در حضور آکوپورین	۱/۵۰ ^a	۱ ^a
تنش در عدم حضور آکوپورین	۱/۲۱ ^a	۰/۷۱ ^b
T-test	۰/۱۷	۰/۰۰۶

بررسی شاخص حساسیت بر صفات وزن اندام هوایی، وزن ریشه، میزان محتوای آبسیزیک اسید، در حضور آکوپورین‌ها مقاومت بیشتری نسبت به تنش خشکی نشان داد و میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان، فنول و پرولین در عدم حضور آکوپورین‌ها مقاومت بیشتری در اثر تنش خشکی نشان داد (جدول ۵). با توجه به میزان یون پتاسیم در سلول، میزان کارایی این یون در تنش عدم حضور بیشتر از حضور آکوپورین‌ها مشاهده شد.

شکل ۱ که بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش طراحی شده است، نشان می‌دهد که تغییر در شرایط محیطی باعث ایجاد تنش در گیاه می‌شود و گیاه برای پاسخ به تنش سه روش پاسخ دفاعی، تغییرات روزنه‌ای و تنظیم اسمزی را در پیش می‌گیرد. در مسیر پاسخ دفاعی، گیاه برای مقابله با عوامل آسیب‌زننده و ادامه رشد میزان پرولین را به منظور تنظیم پتانسیل اسمزی و همچنین میزان فنول و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را برای مقابله با رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. از جهت دیگر، تنظیم اسمزی با افزایش میزان پروتئین و عناصر در

کامبود آب ممکن است رونویسی و پس از آن ترجمه را در فعالیت آکوپورین تحریک کند، همچنین نشان داده شده است که آکوپورین‌ها توسط فسفوریلاسیون تنظیم می‌شود (Jang *et al.*, 2004).

تنش خشکی بر روی هدایت هیدرولیکی ریشه اثر منفی نشان داد. همچنین انتقال آب سلول به سلول 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 (Alexandersson, 2010). نتایج یافته‌ها در بررسی بیان ژن PIP1 در گیاه آرابیدوپسیس یک فرضیه را ایجاد می‌کند که تحت تنش خشکی این پروتئین غشا پلاسمایی می‌تواند نقش ویژه‌ای را در جهت جذب آب باقیمانده در سلول‌ها به صورت تنظیم اسمزی با انتقال مولکول‌هایی مانند گلیسرول، قندها، اسیدهای آلی یا دی‌اکسید کربن به جای آب برای محافظت از گیاهان از خشک‌سالی ایفا کند (Postaire *et al.*, 2010).

جدول ۵- تأثیر تنش خشکی بر برخی شاخص‌های تنش فلفل دلمه‌ای تحت تنش خشکی و در شرایط حضور و عدم حضور آکوپورین

تیما	-SSI	-SSI	-NACE	-SSI	-SSI	-SSI	-SSI
تیما	شاخساره	ریشه	پتاسیم	آبسزیک اسید	فنول	آنتی‌اکسیدان	ظرفیت
تنش در حضور آکوپورین	۰/۱۹۷ ^a	۰/۲۳۸ ^a	۸۸/۴۰ ^b	۰/۱۹۷ ^a	۰/۵۰۳ ^b	۰/۰۱۵ ^b	۰/۰۵۶ ^b
تنش در عدم حضور آکوپورین	۰/۵۱۴ ^b	۰/۲۱۴ ^b	۱۳۴/۲۰ ^a	۰/۱۲۲ ^b	۰/۸۹ ^a	۰/۲۲ ^a	۱/۱۲ ^a

جهت حفظ و جذب آب سلول انجام می‌شود. در شرایط تنش خشکی با منفی‌تر شدن پتانسیل آب سلول و افزایش پتانسیل اسمزی سلول اقدام به جذب آب بیشتر می‌کند در نتیجه فعالیت آکوپورین‌ها افزایش می‌یابد. در همین مسیر، با افزایش تولید کارتونوئید به‌عنوان پیش‌ساز تولید آبسزیک اسید و افزایش تولید این هورمون و با اتصال این هورمون به گیرنده‌های سطح سلول‌های نگهبان روزنه و خروج پتاسیم از سلول در جهت کاهش تعرق، سلول‌های نگهبان روزنه بسته می‌شود (Alexandersson, 2010; Mohammadkhani and Heidari, 2008; YoungKwon and YoungWoo, 2016).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، یکی از عوامل مهم در جهت تأمین آب و جلوگیری از کاهش آب در شرایط تنش خشکی گیاه فلفل دلمه‌ای آکوپورین‌ها هستند که به‌عنوان کانال‌های اصلی عبور آب در غشا پلاسمایی فعالیت دارند. در پی فعالیت آکوپورین‌ها پتانسیل آب ریشه کاهش می‌یابد و

منابع

- خزاعی، ح. (۱۳۸۱) اثر تنش خشکی بر عملکرد و خصوصیات فیزیولوژیک ارقام مقاوم و حساس گندم و معرفی مناسب‌ترین شاخص‌های مقاومت به خشکی. پایان‌نامه دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد.
- نباتی، ج.، معصومی، ع.، کمندی، ع.، صالحی، م.، برزویی، ا. و کافی، م. (۱۳۹۷) فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی (دانشگاه مشهد)، مشهد.
- Arnon, A. N. (1967) Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal* 23: 112-124.
- Agre, P., Lee, M. D., Devidas, S. and Guggino, W. B. (1997) Aquaporins and ion conductance. *Science* 275: 1490-1501.
- Alexandersson, E., Danielson, J., Rade, A., Moparthi, H. J., Fontes, V. K., Kjellbom, M. P. and Johanson, U. (2010) Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Journal of Plant* 61: 650-660.
- Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 431-434.
- Bates, L., Waldren, R. and Teare, I. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.

احتمالاً کاهش پتانسیل اسمزی از طریق افزایش میزان پرولین و شکسته‌شدن پروتئین‌ها به‌منظور جذب آب بیشتر رخ می‌دهد. همچنین با افزایش میزان کارتونوئید به‌عنوان پیش‌ساز هورمون آبسزیک اسید روزنه‌ها بسته می‌شود در نتیجه میزان تعرق کاهش می‌یابد و از سوی دیگر، افزایش میزان فنول در کاهش فعالیت رادیکال‌های آزاد مؤثر بوده است. نکته حائز اهمیت در این پژوهش این بود که در نبود آکوپورین‌ها آسیب به غشای پلاسمایی و نشت یونی افزایش می‌یابد و از سوی دیگر، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و جذب عناصر کاهش می‌یابد در نتیجه از وزن تر و خشک شاخساره و ریشه کاسته می‌شود.

تشکر و قدر دانی

از همکاران و مسئولین زیست فناوری و مهندسی زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان که نویسندگان را در انجام این تحقیق یاری رساندن تشکر می‌شود.

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals Biochem* 72: 248-254.
- Bienert, G. P., Bienert, M. D., Jahn, T. P., Boutry, M. and Chaumont, F. (2011) Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *Journal of Plant* 66: 306-317.
- Chalkerscott, L. (2002) Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues. *Plants Physiologia* 17: 104-135.
- Chaudhry, A. U. and Mushtag, M. (2004) Optimization of potassium in sunflower. *Journal Biological Science* 2: 887-888.
- Chaves, M. M. and Oliveira, M. M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55: 2365-2384.
- Castonguay, Y., Nadeau, P. and Simard, R. R. (1993) Effects of flooding on carbohydrate and ABA levels in roots and shoots of alfalfa. *Plant Cell and Environment* 16: 695-702.
- Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Hanson, D. T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H. and Kaldenhoff, R. (2006) Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. *Plant Journal* 48: 427-439.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable* 29: 185-212.
- Figueiredo, K. V., Oliveira, M. T., Arruda, E. C. P., Silva, C. F. and Santos, G. (2015) Changes in leaf epicuticular wax, gas exchange and biochemistry metabolism between *Jatropha mollissima* and *Jatropha curcas* under semi-arid conditions. *Plant Physiologia* 37: 108-130.
- Havaux, M. and Niyogi, K. K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Plant Biology* 96: 8762-8767.
- Hamada, A. and El-Enany, A. (1994) Effect of NaCl salinity on growth, pigment and mineral element contents, and gas exchange of broad bean and pea plants. *Biology Plant* 36: 75-81.
- Hajar, A. S., Khafagi, O. A. and Ibrahim, S. M. (1997) Response of grain sorghum to water deficit. *Journal of Agriculture Research* 42: 37-47.
- Jyostna Devi, M., Sadok, W. and Sinclair, T. (2012) Transpiration response of de-rooted peanut plants to aquaporin inhibitors. *Environmental and Experimental Botany* 78: 167-172.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysee, L., Weig, A. R. and Kjellbom, P. (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. *Journal of Plant Physiology* 126: 1358-1369.
- Jang, J. K., Kim, D. G., Kim, Y. O., Kim, J. S. and 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: 713-725.
- Koc, E., Islek, C. and Ustun, A. S. (2010) Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Gazi University Journal of Science* 23: 1-6.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method. *Methods San Diego Calif* 25: 402-408.
- Luu, D. T. and Maurel, C. (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environmental* 28: 85-96.
- Lutts, S., Kinet, J. and Bouharmont, J. (1996) NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany* 78: 389-398.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C. and Sohrabi, Y. (2010) Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal Science* 4: 580-585.
- Maathuis, F. J. M., Filatov, V., Herzyk, P., Krijger, G. C., Axelsen, K. B., Chen, S., Green, B. J., Li, Y., Madagan, K. L., Sanchez Fernandez, R., Fordeb, G., Palmgren, M. G., Rea, P. A., Williams, L. E., Sanders, D. and Amtmann, A. (2003) Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Journal of Plant* 35: 675-692.
- Maricle, B. R., Cobos, D. R. and Campbell, C. S. (2007) Biophysical and morphological leaf adaptations to drought and salinity in salt marsh grasses. *Environmental and Experimental Botany* 60: 458-467.
- Martinez, J. P., Lutts, S., Schanck, A., Bajji, M. and Kinet, J. M. (2004) Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the mediterranean shrub. *Atriplex halimus* L. *Journal of Plant Physiology* 161: 1041-1051.
- Mohammadkhani, N. and Heidari, R. (2008) Water stress induced stomatal closure in two maize cultivars. *Journal of Biology Science* 3: 750-754.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and VanBreusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Plants Science* 9: 490-491.
- Nahar, S., Sahoo, L. and Tanti, B. (2018) Screening of drought tolerant rice through morphophysiological and biochemical approaches. *Biotechnology Agriculture* 17: 1878-2001.

- Percival, G. C. and Sheriffs, C. N. (2002) Identification of drought tolerance woody perennials using chlorophyll fluorescence. *Journal of Arboriculture* 28: 215-223.
- Postaire, O., TournaireRoux, C. Grondin, A. Boursiac, Y. and Morillon, R. (2010) A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis. *Plant Physiology* 152: 1418-1430.
- Sanchez Rodriguez, E., Rubio Wilhelmi, M., Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., Romero, L. and Ruiz, J. M. (2010) Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science* 178: 30-40.
- Singh, S. P. A. Tewari, S. K. and Pathak, G. C. (2000) Significance of phonologically Asynhronus population of the center himalayan oaks in drought adaptation. *Current Science* 79: 353-357.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic posphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144.
- Turner, N. C. (1988) Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science* 9: 289-308.
- YoungKwon, M. and YoungWoo, S. (2016) Plants responses to drought and shade environments. *Journal of Biotechnology* 15: 30-33.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wison, J. and Qian, M. (2002) Free radicalscavenging properties of wheat extracts. *Agricultural and Food Chemistry* 50: 1619-1624..

The physiological response and water relationships in sweet pepper when stopping the activity of root Aquaporin's in drought stress

Maryam Haghghi *¹, Zeinab Masoumi ¹ and Seyed Amir Hossein Jalali²

¹Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

²Department of Natural Resources, Research Institute for Biotechnology & Bioengineering, Isfahan University of Technology

(Received: 10/04/2019, Accepted: 10/07/2019)

Abstract

Aquaporins are the main integral membrane proteins in the plasma membrane, that facilitate transport of water, carbon dioxide, and other small soluble material across the membrane. The aim of this study was to investigate the role of root aquaporins on the physiological, biochemical and biochemical changes and water relations under drought stress. For this purpose, a study was conducted in a completely randomized design on sweet pepper (Ps 301) under drought stress in a hydroponic medium. Sweet pepper plants were grown in hydroponically controlled condition and exposed to drought stress by applying polyethylene glycol (6000) and stopping the activity of aquaporin, using 50 mM of HgNO₃. The results showed that in the presence of aquaporins, fresh and dry weight of root and shoot, relative humidity (22%), protein (47%), sodium content (29%), potassium (13%), and abscisic acid (19 %) increased. Also, in the absence of aquaporins under drought stress conditions, the negative potential of root water (57 %), the increase in the amount of proline (1.2 times), the content of abscisic acid (12%) and the phenolic content (89.7%) as a protective factor in the cell against free radicals were observed. Based on the results obtained from drought stress and stopping the activity of aquaporins, the role of water channels in osmotic regulation can be explained by the transfer of water and decreasing the deleterious effect of stress.

Keywords: Water potential, Water channels, Phenol

Corresponding author, Email: mhaghghi@cc.iut.ac.ir