



آنالیز مولکولی و فیزیولوژیکی پیری برگ پرچم و انتقال مجدد مواد فتوسنتزی در گندم نان تحت تنش خشکی انتهایی

سعید باقری کیا^۱، محمدهادی پهلوانی^{۲*}، احد یامچی^۳، خلیل زینلی نژاد^۳، علی مصطفایی^۴

^۱ دانشجوی دکتری گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲ دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۳ استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۴ استاد مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۲

چکیده

در مطالعه فیزیولوژیکی انتقال مجدد مواد فتوسنتزی از ساقه به دانه در طی پر شدن دانه‌ها مواد ژنتیکی جهش یافته ابزاری ارزشمند به شمار می‌آیند. دو لاین جهش یافته پیشرفته گندم نان (T-65-7-1 و T-67-60) به همراه رقم تیپ وحشی آن‌ها (رقم طبسی) در دو شرایط رطوبتی (مطلوب و ۴۰-۳۰ درصد ظرفیت مزرعه) به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار کشت شدند. اعمال تنش در مرحله ظهور کامل سنبله (زادوکس ۶۰) آغاز شد و نمونه‌برداری‌ها در ۵ مرحله (۰، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از گرده‌افشانی) انجام شد. بر اساس نتایج انتقال مجدد ساقه و کارایی آن تحت تنش خشکی انتهایی در لاین‌های جهش یافته به طور معنی‌داری بیشتر از رقم تیپ وحشی بود. علت این امر قدرت مخزن بالاتر و بروز پیری زودرس در لاین‌های جهش یافته نسبت به رقم تیپ وحشی بود. با توجه به روند تغییرات محتوای کلروفیل و بیان نسبی ژن‌های کلیدی فتوسنتزی روپیسکو (زیرواحدهای کوچک و بزرگ روپیسکو و روپیسکو اکتیواز) در ژنوتیپ‌ها طی پر شدن دانه‌ها به نظر می‌رسد تجزیه کلروپلاست و سیستم فتوسنتزی در اثر پیری القاء شده توسط تنش خشکی در لاین‌های جهش یافته با شدت بیشتری نسبت به رقم تیپ وحشی اتفاق افتاده است. از آنجایی که پدیده پیری تحریک‌کننده انتقال مجدد مواد فتوسنتزی از ساقه به دانه است، انتقال مجدد ساقه و کارایی آن در لاین‌های جهش یافته بیشتر از رقم تیپ وحشی بود. رقم تیپ وحشی نیز بیشتر با تداوم فتوسنتز جاری برگ‌ها در جهت پر کردن دانه‌ها عمل کرده است.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پیری، جهش یافته، روپیسکو، کلروفیل.

مقدمه

کاهش منابع آب سبب شده که توسعه ارقام زراعی با سازگاری بالاتر به خشکی هدف مهمی در بسیاری برنامه‌های اصلاحی گیاهان باشد (Sivamani et al., 2000). در مناطقی با شرایط آب و هوایی مدیترانه‌ای (مانند ایران) زراعت گندم نان در دوره پر شدن دانه با تنش خشکی و گرما مواجه است. در شرایط تنش انتهای فصل، انتقال مواد ذخیره‌ای ساقه یکی از مهم‌ترین و فرآیندهای مؤثر در تحمل به خشکی به شمار می‌آید (Blum, 1998). در غلات رشد و نمو دانه تا اندازه‌ای توسط انتقال مواد ذخیره‌ای گیاه حمایت می‌شود که این مواد ذخیره‌ای عمدتاً در ساقه قبل از مرحله گلدهی ذخیره شده و تحت عنوان انتقال مجدد مواد ذخیره‌ای ساقه نامیده می‌شود. تحت تنش خشکی فتوسنتز جاری کاهش یافته و نقش انتقال مجدد ساقه در پر شدن دانه افزایش می‌یابد (Ehdaie et al., 2008). توانایی ژنوتیپ‌ها از نظر انتقال مجدد مواد فتوسنتزی از ساقه به دانه در طی پر شدن دانه با استفاده از پایش وزن خشک ساقه برآورد می‌شود (Blum et al., 1994; Ehdaie et al., 2006). بر اساس گزارشات متعدد فرآیند پیری ارتباط تنگاتنگی با فرآیند پر شدن دانه دارد (Yang et al., 2000; Mi et al., 2002; Bazargani et al., 2011). تأخیر در پیری امری نامطلوب به حساب می‌آید زیرا گیاه در عین رسیدگی سبز می‌ماند، در

نتیجه نرخ پر شدن دانه‌ها کاهش می‌یابد (Yang & Zhang, 2006). تنش خشکی باعث القاء پیری زودرس می‌شود و انتقال مجدد آسیمیلات‌ها را به دانه افزایش می‌دهد (Plaut et al., 2004; Yang & Zhang, 2006). از جمله مهم‌ترین رخدادها در خلال پیری تخریب دستگاه فتوسنتزی، تجزیه کلروپلاست و کاهش چشمگیر کلروفیل است (Hörtensteiner & Feller, 2002). رویسکو و رویسکو اکتیواز از آنزیم‌های کلیدی فتوسنتز در کلروپلاست گیاهان C_3 می‌باشد همچنین رویسکو اولین آنزیم تخریب شده در چرخه کالوین طی پیری برگ است به همین علت کاهش میزان رویسکو یکی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی در طی پیری برگ پرچم می‌باشد (Weng et al., 2005). تنش خشکی در گیاهان گوجه فرنگی (Bartholomew et al., 1994) آرابیدوپسیس (Williams et al., 1994) و برنج (vu et al., 1998) باعث کاهش شدید رونوشت‌های زیر واحد رویسکو شده است.

اصلاح موتاسیونی به القاء آگاهانه و توسعه لاین‌های جهش یافته به منظور بهبود گیاهان زراعی اشاره دارد. اصلاح موتاسیونی همچنین در مفهوم گسترده‌تری برای بهره‌برداری از جهش یافته‌های طبیعی و همچنین خودبخودی و توسعه هر وارسته حامل یک جهش شناخته شده با هر منبعی، کاربرد دارد (Shu et al., 2012). پرتوتابی هسته‌ای با

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۲ اجرا گردید. آزمایش با دو لاین جهش یافته نسل هفتم به نام‌های T-67-60 و T-65-7-1 حاصل از برنامه اصلاح موتاسیونی سازمان انرژی اتمی ایران با هدف اولیه مقاومت به ورس (با استفاده از پرتوتابی گاما با منشأ کبالت ۶۰) به همراه رقم گندم طوسی به عنوان تیپ وحشی (رقم والدی) لاین‌های مذکور انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (شرایط رطوبتی در دو سطح و ژنوتیپ در سه سطح) با سه تکرار در گلدان‌هایی حاوی ۱۰ کیلوگرم خاک با ترکیب رس، ماسه بادی و کود حیوانی به نسبت ۱:۲:۱ انجام شد. در هر واحد آزمایشی (گلدان) ۱۰ بذر کشت گردید. اعمال تنش و قطع آبیاری در مرحله زادوکس ۶۰ (ظهور کامل سنبله) انجام شد (Zadoks *et al.*, 1974). ساقه اصلی بوته‌های موجود در هر گلدان با در نظر گرفتن نمایان شدن اولین سنبله از میان غلاف برگ پرچم در هر بوته نشان‌دار گردید. رطوبت گلدان‌ها در شرایط شاهد از طریق آبیاری منظم در محدوده ظرفیت زراعی نگهداری می‌شدند، در شرایط تنش خشکی نیز رطوبت گلدان‌ها به وسیله توزین منظم روزانه در حدود ۴۰-۳۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری گردیدند. نمونه‌برداری به صورت تصادفی از برگ

ایجاد ژرم پلاسما غنی از تنوع ژنتیکی می‌تواند نقش مهمی در اصلاح گیاهان ایفا کند زیرا اصلاح گیاهان زمانی می‌تواند صورت گیرد که تنوع کافی برای صفت مورد نظر در دسترس اصلاحگر باشد. صفاتی زراعی مهمی از قبیل کوتاه کردن طول دوره رشدی و افزایش تحمل و مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهانی همچون گندم از طریق اصلاح موتاسیونی بهبود یافته‌اند (Singh & Balyan, 2009). مطالعات فیزیولوژیکی گیاهی در واکنش به خشکی پیچیده است. یکی از مشکلات در معرفی رقم متحمل به تنش این است که این ارقام با ژنوتیپ‌های آستانه که فاصله ژنتیکی زیادی از هم دارند، مقایسه می‌شوند. استفاده از جهش‌یافته‌ها یا لاین‌های ایزوژنیک نزدیک ابزار بسیار مناسبی برای مطالعه ژنتیک گیاهی هستند و مطالعه آن‌ها می‌تواند جهت توسعه گیاهان متحمل به کم‌آبی امیدبخش باشد (Tuberosa & Salvi, 2006; Xu *et al.*; 2010). هدف از این تحقیق ارزیابی روند بیان برخی ژن‌های فتوسنتزی وابسته به پیری و همچنین تغییرات محتوای کلروفیل در برگ پرچم و ارتباط آن با انتقال مجدد مواد فتوسنتزی در گندم نان طی پر شدن دانه‌ها تحت تنش خشکی انتهایی در لاین‌های جهش‌یافته و رقم تیپ وحشی گندم طوسی بود.

استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در دو طول موج ۶۴۴/۸، ۶۶۱/۶ قرائت گردید. مقدار کلروفیل های a، b و کل برحسب میکروگرم بر میلی لیتر از فرمول های زیر استفاده شد (Lichtenthaler, 1987).

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 11.24 A_{661.6} - 2.04 A_{644.8}$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 20.13 A_{644.8} - 4.19 A_{661.6}$$

$$C_{a+b} (\mu\text{g/ml}) = 7.05 A_{661.6} - 18.09 A_{644.8}$$

بررسی الگوی بیان ژن ها

برای ارزیابی بیان ژن ها، استخراج RNA کل از g ۰/۱ نمونه های تهیه شده با استفاده از کیت P-Biozol (Bio Flux) انجام شد. پس از تیمار DNaseI کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین گردید. به منظور ساخت cDNA، میزان ۱ میکروگرم از هر نمونه RNA در واکنش RT-PCR به همراه آغازگر 18 (d)T Oligo، آب DEPC، بافر ساخت cDNA، مخلوط dNTP، آنزیم بازدارنده ریونوکلاز و آنزیم رونوشت بردار معکوس به روش پیشنهادی شرکت Fermentas استفاده شد. واکنش های زنجیره ای پلی مرز کمی در زمان واقعی (q-RT-PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از فناوری رنگ SYBR Green I (کیت سایبر بیوپارس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) تهیه شدند و در دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad در شرایط بهینه اجرا گردیدند. آغازگرهای

پرچم و ساقه های اصلی نشان دار شده با طول تقریباً یکسان در ۵ مرحله (هر واحد آزمایشی شامل ۲ بوته)، از شروع گرده افشانی (زمان صفر گرده افشانی) در فاصله های زمانی ۷ روزه (در زمان های ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از گرده افشانی) صورت گرفت. نمونه های مربوط به ساقه در آون ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردیدند و سپس توزین شدند. برگ های پرچم نیز پس از فریز شدن در ازلت مایع در فریزر ۸۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

اندازه گیری انتقال مجدد و کارایی انتقال مجدد

انتقال مجدد از تفاضل بین حداکثر و حداقل چگالی وزنی ساقه پس از گرده افشانی محاسبه شد. چگالی وزنی از تقسیم وزن ساقه به طول آن محاسبه شد. کارایی انتقال مجدد از نسبت انتقال مجدد به حداکثر چگالی وزنی به دست آمد (Ehdaie et al., 2006).

اندازه گیری محتوای کلروفیل

ابتدا مقدار ۵۰ میلی گرم بافت برگ پرچم در ۵ میلی لیتر استون خالص به خوبی سائیده شده و سپس مخلوط به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و در نهایت فاز فوقانی به لوله آزمایش جدید منتقل گردید و برای سنجش کلروفیل از آن استفاده شد. جذب عصاره ها با

(Goncalves *et al.*, 2005). توالی و مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده و ژن خانه‌دار در جدول ۱ ارائه شده است. ارزیابی میزان بیان نسبی ژن‌ها بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به گیاهان کنترل در همان مرحله انجام شد (Pfaffl, 2001) و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای نرم‌افزار 6 GenEx و SAS 9.1.3 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

مورد نیاز به منظور ارزیابی الگوی بیان ژن‌های فتوسنتزی مرتبط با پدیده پیری شامل زیر واحدهای کوچک و بزرگ روبیسکو و روبیسکو اکتیواز بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI گردید. این طراحی با استفاده از نرم‌افزار AlleID7.0 و با در نظر گرفتن ویژگی‌های مطلوب برای استفاده در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی در زمان واقعی (q-RT-PCR) انجام شد. از ژن خانه‌دار GAPDH که دارای بیان یکسانی در تمام مراحل نمونه‌برداری است استفاده شد

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن‌های مرتبط با پدیده پیری.

Table 1- The primer used in expression analysis of genes involved in senescence.

نام آغازگر	توالی	دمای اتصال	طول محصول
Primer name	Sequence (5' → 3')	Annealing Temp (°C)	Product Length (bp)
Rubisco Large Subunit	F:GGTGGAGGAACTTTAGGACAT R:TCGCCTTCCATACTTCACAA	60	187
Rubisco Small Subunit	F:ACTGGACAATGTGGAAGC R:ACTCCTTCTTGACCTCCTC	60	84
Rubisco Activase	F: TACGACATCTCCGATGACCA R: CTCGTAGGAGCTCAGGATGG	62	164
GAPDH	F:TCACCACCGACTACATGACC R: ACAGCAACCTCCTTCTCACC	60	121

نتایج و بحث

همچنین صفات مذکور در دو شرایط رطوبتی شاهد و تنش اختلاف معنی‌دار آماری داشتند (جدول ۲).

عملکرد دانه و انتقال مجدد ساقه و کارایی آن
نتایج تجزیه واریانس نشان داد ژنوتیپ‌ها از نظر عملکرد دانه در سنبله اصلی، انتقال مجدد ساقه و کارایی آن دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند،

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات در شرایط رطوبتی و ژنوتیپ‌های گندم نان.

Table 2- Analysis of variance for traits in moisture conditions and bread wheat genotypes.

کلروفیل کل		کلروفیل		کارایی انتقال مجدد		عملکرد در سنبله		درجه آزادی		منبع تغییر	
Total chlorophyll		Chlorophyll b		Remobilization efficiency		Yield per spike		df		SOV	
81.37**	26.02**	15.48**	373.04**	187.79**	0.942**	2	ژنوتیپ Genotype (G)				
104.23**	13.73**	42.30**	82.51**	17.91**	0.135**	1	شرایط رطوبتی moisture conditions (M)				
9.45 ^{ns}	1.00 ^{ns}	4.92 ^{ns}	9.12 ^{ns}	3.15 ^{ns}	0.002 ^{ns}	2	ژنوتیپ×شرایط رطوبتی G×M				
20.99	47.13	8.87	34.37	13.16	0.150	12	خطا Error				
4.70	7.54	4.46	8.07	9.28	11.64		ضریب تغییرات (%) CV (%)				

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و عدم معنی‌داری است.

** , ns: Significant at 5% and 1% probability level and no significant respectively.

بیشترین عملکرد دانه در سنبله بودند که از نظر آماری نیز معنی‌دار بود (جدول ۳). تنش خشکی باعث کاهش عملکرد در همه ژنوتیپ‌ها شد که البته تنها در رقم تیپ وحشی معنی‌دار بود (جدول ۳)

مقایسه میانگین عملکرد دانه در سنبله اصلی در هر سطح شرایط رطوبتی نشان داد که عملکرد لاین‌های جهش‌یافته بیشتر از رقم تیپ وحشی است به طوری که رقم تیپ وحشی و لاین جهش‌یافته T-65-7-1 به ترتیب دارای کمترین و

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات در ژنوتیپ‌های گندم نان در هر سطح شرایط رطوبتی.

Table 3- Mean comparison of traits in bread wheat genotypes at each level of moisture

کارایی انتقال مجدد (%)		انتقال مجدد (mg cm ⁻¹)		عملکرد در سنبله (g)		ژنوتیپ
Remobilization efficiency (%)	Remobilization (mg cm ⁻¹)	Yield per spike (g)	Genotype	تنش	شاهد	
تنش	شاهد	تنش	شاهد	تنش	شاهد	
Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	
18.88b (a)	16.45b (a)	8.93b (a)	7.99b (a)	0.61c (b)	0.81b (a)	تیپ وحشی Wild Type
20.05b (a)	15.51b (b)	10.62b (a)	8.56b (b)	0.82b (a)	0.97b (a)	جهش یافته T-67-60 T-67-60 Mutant
30.32a (a)	24.44a (b)	17.30a (a)	14.31a (b)	1.18a (a)	1.35a (a)	جهش یافته T-65-7-1 T-65-7-1 Mutant
کلروفیل کل (µg ml ⁻¹)		کلروفیل b (µg ml ⁻¹)		کلروفیل a (µg ml ⁻¹)		ژنوتیپ
Total chlorophyll (µg ml ⁻¹)	Chlorophyll b (µg ml ⁻¹)	Chlorophyll a (µg ml ⁻¹)	Genotype	تنش	شاهد	
تنش	شاهد	تنش	شاهد	تنش	شاهد	
Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	
29.44a (a)	32.57a (a)	10.61a (a)	12.03a (a)	18.83a (a)	20.54a (a)	تیپ وحشی Wild Type
23.65b (b)	28.28b (a)	7.80b (a)	9.21b (a)	15.84b (b)	19.06b (a)	جهش یافته T-67-60 T-67-60 Mutant
24.01b (b)	30.68a (a)	7.94b (b)	10.35b (a)	16.06b (b)	20.32ab (a)	جهش یافته T-65-7-1 T-65-7-1 Mutant

در هر ستون میانگین‌هایی که حرف (حروف) مشترک دارند با هم تفاوت معنی‌دار ندارند (LSD %۵).

حرف مشترک داخل پرانتز بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار آماری هر ژنوتیپ در شرایط شاهد و تنش در بخش مورد نظر می‌باشد (LSD %۵).

Means in each column followed by same letter(s) are not significantly different (LSD 5%).

Same letter in parentheses indicates no significant difference between each genotype under control and stress conditions in that part (LSD 5%).

صفات مربوط به رقم تیپ وحشی بود (جدول ۳).

تنش خشکی باعث افزایش انتقال مجدد در رقم

تیپ وحشی (۱۱/۷۳ درصد) و لاین‌های

در هر دو شرایط رطوبتی شاهد و تنش، انتقال

مجدد ساقه و کارایی آن در لاین جهش یافته T-65-

7-1 به طور معنی‌داری بیشتر بود. کمترین میزان این

محتوای کلروفیل

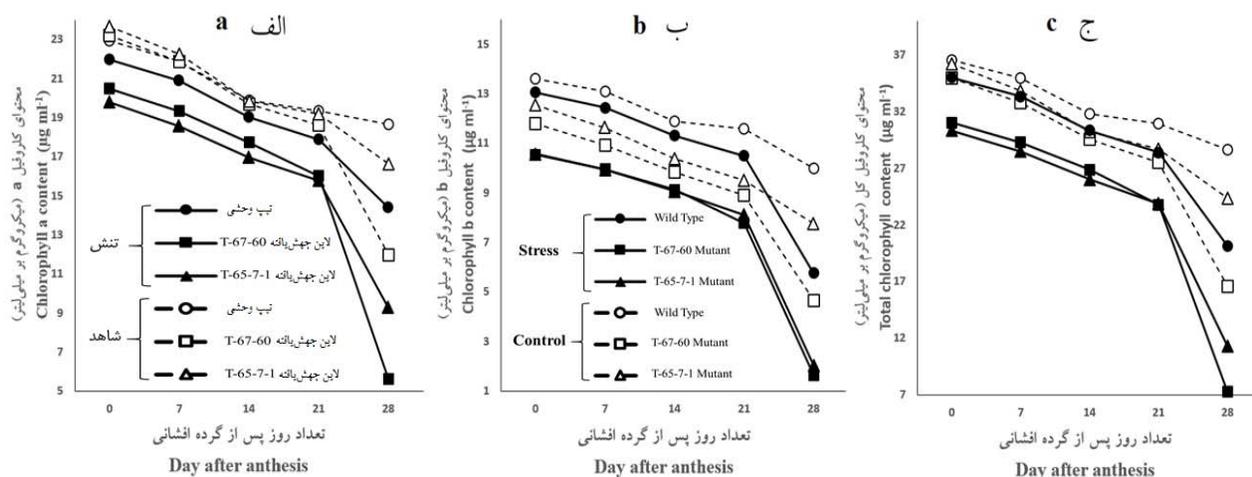
نظر به اینکه کلروفیل a, b و کل در پنج مرحله پس از گرده‌افشانی و در طی پر شدن دانه‌ها اندازه‌گیری شده بود برای آنالیز آماری از میانگین پنج مرحله استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و شرایط رطوبتی از نظر کلروفیل a, کلروفیل b و کلروفیل کل وجود دارد (جدول ۲). مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها در شرایط شاهد بیانگر بیشترین مقدار کلروفیل a, کلروفیل b و کلروفیل کل در رقم تیپ وحشی بود اما اختلافی از لحاظ آماری با لاین جهش‌یافته T-65-7-1 نداشت (جدول ۳). مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش کلروفیل a, کلروفیل b و کلروفیل کل می‌شود. این کاهش در لاین‌های جهش‌یافته بیشتر بود و رقم تیپ وحشی کمترین کاهش را نشان داد (جدول ۳).

اساساً کاهش کلروفیل در فرآیند پیری یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تشخیص پیری در سلول‌های گیاهی است (Hukmani & Tripath, 1994). استفاده آسیمیلات‌های ذخیره شده در بافت‌های رویشی برای پر شدن دانه گیاهان تک‌لپه مانند گندم نیازمند آغاز یا به عبارتی تحریک پدیده پیری در کل گیاه می‌باشد (Yang & Zhang, 2006). تنش خشکی در مرحله پر شدن دانه منجر به تسریع پدیده پیری، کوتاه شدن طول دوره پر شدن دانه

جهش‌یافته T-67-60 (۲۴/۱۱ درصد) و T-65-7-1 (۲۰/۸۴ درصد) شد که این افزایش در لاین‌های جهش‌یافته معنی‌دار بود. همچنین افزایش معنی‌داری از نظر کارایی انتقال مجدد در لاین‌های جهش‌یافته تحت تنش خشکی مشاهده شد (جدول ۳). تفاوت معنی‌دار ارقام تحت تنش خشکی از نظر میزان انتقال مجدد از اندام‌های ساقه به دانه‌ها گزارش شده است (Plaut *et al.*, 2004; Ehdai *et al.*, 2006). در مطالعاتی دیگر در مرحله گرده‌افشانی گندم گزارش شده است که انتقال مجدد آسیمیلات‌ها و کارایی آن در شرایط تنش افزایش می‌یابد (Ehdai *et al.*, 2006; Mojtabaie *et al.*, 2013; Zamani *et al.*, 2014). در شرایط تنش خشکی از آنجایی که فتوسنتز جاری برای پر شدن دانه کافی نیست گیاه با القای بیشتر مکانیسم انتقال مجدد درصدد پرکردن دانه برمی‌آید به نظر می‌رسد این مکانیسم در لاین‌های جهش‌یافته بیش از رقم تیپ وحشی تأثیرگذار بوده است. از یک سو تقاضای مخزن بیشتر (عملکرد بالاتر) برای دریافت آسیمیلات‌های ذخیره شده در ساقه و از سوی دیگر فعالیت آنزیم‌های مؤثر در انتقال مجدد و یا پیام‌های القاء‌کننده انتقال مجدد دلیل برتری لاین‌های جهش‌یافته نسبت به تیپ وحشی است.

ژنوتیپ‌ها در طی پر شدن دانه‌ها به نظر می‌رسد تجزیه کلروپلاست و سیستم فتوسنتزی تحت تنش خشکی در لاین‌های جهش‌یافته با شدت بیشتری نسبت به رقم تیپ وحشی اتفاق افتاده است (شکل ۱).

و انتقال و بازیافت مواد ذخیره‌ای در جهت پر شدن دانه است (Bazargani *et al.*, 2011)، از نشانه‌های بارز پیری برگ روند تغییرات بسیار منظم و کنترل‌شده فعل و انفعالات فیزیولوژیک شامل توقف فتوسنتز، تجزیه کلروپلاست، کاهش چشمگیر کلروفیل و شکستن پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های بزرگ است (Hörtensteiner & Feller, 2002). با توجه به روند تغییرات محتوای کلروفیل a، b و کل



شکل ۱- روند تغییرات کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب) و کلروفیل کل (ج) برگ پرچم ژنوتیپ‌های گندم نان.

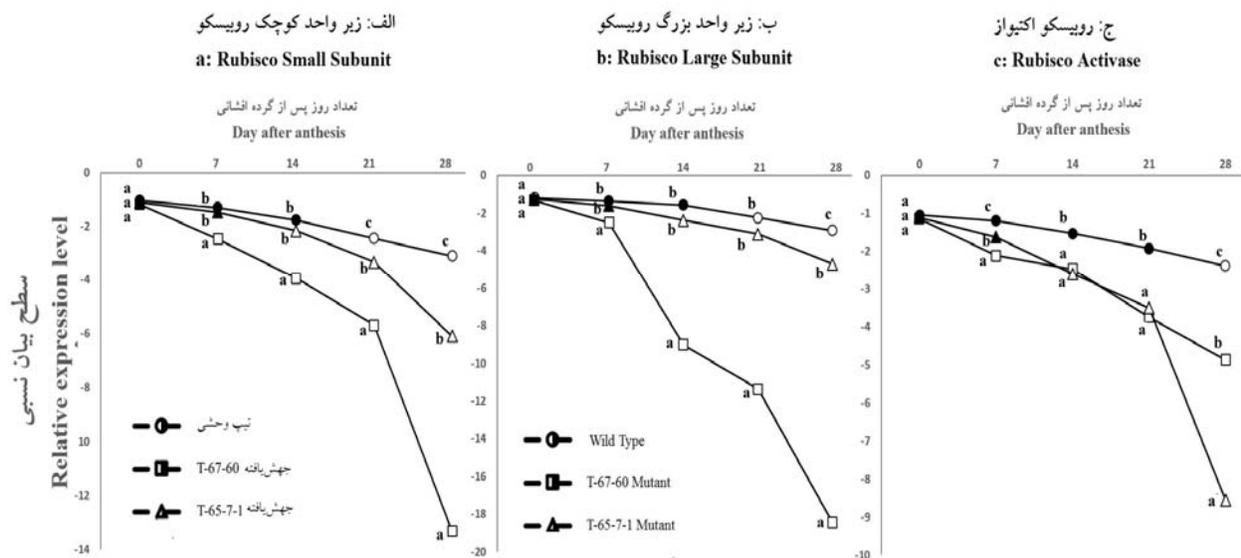
Figure 1- The changes of chlorophyll a (a), chlorophyll b (b) and total chlorophyll (c) in flag leaf of bread wheat genotypes.

(شکل ۱). به طور کلی تقاضای مخزن عاملی تعیین‌کننده در انتقال مجدد کربوهیدرات‌های ساقه است (Ehdaie *et al.*, 2006). استفاده آسیمیلات‌های ذخیره شده در بافت‌های رویشی برای پر شدن دانه گیاهان تک لپه مانند گندم نیازمند

با گذشت زمان تأثیر پیری القایی در اثر خشکی تأثیر خود را بیشتر نشان داده به طوری که مراحل انتهایی اختلاف بین محتوای کلروفیل در حالت شاهد و تنش بیشتر بود البته این اختلاف در لاین‌های جهش‌یافته بیشتر از رقم تیپ وحشی بود

رقم تیپ وحشی اتفاق افتاده باشد. در این تحقیق، الگوی بیان ژن‌های کد کننده پروتئین رویسکو شامل ژن‌های زیرواحدهای کوچک و بزرگ رویسکو و ژن رویسکو اکتیواز در پنج مرحله پس از گرده‌افشانی و در طی پر شدن دانه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان نسبی در هر ژنوتیپ در شرایط تنش نسبت به کنترل خود در همان مرحله محاسبه شد. با توجه به روند تغییرات بیان ژن‌های فتوستتزی به نظر می‌رسد در شروع گرده‌افشانی (۰ روز) که هنوز اثر تنش خشکی به خوبی توسط گیاه حس نشده است هیچ یک از ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری از نظر کاهش بیان ژن‌های مورد مطالعه در اثر تنش نداشتند (شکل ۲، الف تا ج). این عدم معنی‌داری در رقم تیپ وحشی در ژن‌های زیرواحد کوچک و بزرگ رویسکو تا ۱۴ روز پس از گرده‌افشانی و ژن رویسکو اکتیواز تا ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی ادامه داشت که نشان‌دهنده تأثیر کمتر خشکی در تخریب سیستم فتوستتزی در رقم تیپ وحشی نسبت به لاین‌های جهش‌یافته است (شکل ۲).

آغاز یا به عبارتی تحریک پدیده پیری در کل گیاه می‌باشد (Yang & Zhang, 2006)، بنابراین لاین‌های جهش‌یافته در انتقال مواد ذخیره‌ای ساقه بهتر عمل کردند. رقم تیپ وحشی نیز با تداوم فتوستتزی جاری برگ‌ها در جهت پر شدن دانه‌ها می‌کوشد. به طور کلی گزارش‌های متعددی در خصوص کاهش مقدار کلروفیل برگ در طی پیری وجود دارد (Nie *et al.*, 1995; Weng *et al.*, 2014; Rubia *et al.*, 2014). کلروفیل در مراحل ابتدایی رشد گیاهان کم است و هرچه بذر به رسیدگی فیزیولوژیک نزدیک می‌شود، میزان آن افزایش می‌یابد که احتمالاً به سبب نیازهای شدید گیاه از نظر تأمین ذخایر بذری است، در نهایت با آغاز مرحله پیری میزان کلروفیل به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (Matile *et al.*, 1996). میزان کاهش کلروفیل ناشی از پیری در اثر تنش در مراحل انتهایی به علت کاهش بیوستتزی کلروفیل و افزایش فرآیندهای اکسیداسیونی با شدت بیشتری اتفاق می‌افتد (Salehi *et al.*, 2003; Navabpour *et al.*, 2015)؛ بنابراین به نظر می‌رسد این رخدادها در لاین‌های جهش‌یافته با شدت بیشتری نسبت به



شکل ۲- روند تغییرات بیان ژن‌های زیر واحد کوچک روبیسکو (الف)، زیر واحد بزرگ روبیسکو (ب) و روبیسکو اکتیواز (ج) برگ پرچم ژنوتیپ‌های گندم نان.

اشکال توپر عدم اختلاف معنی‌دار آماری کاهش بیان ژن تحت تنش خشکی را نشان می‌دهد.

Figure 2- The changes of genes expression, Rubisco small subunit (a), Rubisco large subunit (b) and Rubisco Activase (c) in flag leaf of bread wheat genotypes.

Bold shapes indicates no significant difference in down-regulation under drought stress

سریع‌تر برگ پرچم لاین‌های جهش‌یافته در اثر پیری برگ زودرس ناشی از تنش خشکی است (شکل ۲). روبیسکو یکی از پروتئین‌های مهم فتوسنتزی است که حدود ۳۰-۱۲ درصد کل پروتئین‌های برگ گیاهان C_3 را شامل می‌شود (Evans, 1989). تنش‌های محیطی باعث کاهش سنتز روبیسکو و تخریب آن و در نتیجه کاهش فتوسنتز می‌شود (Ono *et al.*, 2014). به همین

به همین دلیل و با توجه به محتوای کلروفیل بالای رقم تیپ وحشی (شکل ۱) به نظر می‌رسد رقم تیپ وحشی با تداوم فتوسنتز جاری برگ‌ها در جهت پر شدن دانه‌ها عمل می‌نماید. همچنین در هر سه ژن مورد مطالعه لاین جهش‌یافته T-67-60، در ۷ روز پس از گرده‌افشانی و لاین جهش‌یافته T-65-7-1 در ۱۴ روز پس از گرده‌افشانی کاهش معنی‌دار بیان نسبی ژن‌های فتوسنتزی در اثر تنش خشکی را نشان دادند که بیانگر تحت تأثیر قرار گرفتن

دلیل روند کاهش بیان ژن‌های فتوستتزی در ژنوتیپ‌ها در طی پر شدن دانه‌ها دور از ذهن نبود. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها از نظر بیان ژن‌های فتوستتزی مطالعه شده در هر مرحله به صورت جداگانه صورت گرفت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها از نظر بیان ژن زیر واحد کوچک رویسکو نشان داد که در شروع گرده‌افشانی کاهش بیان این ژن در لاین‌های جهش‌یافته T-67-60 (۱/۱۸) و T-65-7-1 (۱/۱۱) بیشتر از رقم تیپ وحشی (۱/۰۲) بود هرچند از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل ۲، الف). در طی پر شدن دانه‌ها با گذشت زمان، اختلاف کاهش بیان ژن زیر واحد کوچک رویسکو بین ژنوتیپ‌ها بیشتر شده به طوری که در ۲۸ روز پس از گرده‌افشانی میزان کاهش بیان در لاین‌های جهش‌یافته T-67-60 و T-65-7-1 و رقم تیپ وحشی به ترتیب ۱۳/۱۶، ۶/۰۵ و ۳/۰۹ برابر بود (شکل ۲، الف). در ژن زیر واحد بزرگ رویسکو به طور مشابهی بیشترین کاهش بیان در تمام مراحل به ترتیب در لاین‌های جهش‌یافته T-67-60 و T-65-7-1 و رقم تیپ وحشی مشاهده شد به طوری که بیشترین اختلاف بیان ژنوتیپ‌ها از نظر کاهش این ژن در اثر تنش خشکی مربوط به ۲۸ روز پس از گرده‌افشانی (به ترتیب ۱۸/۳۱، ۴/۶۶ و ۲/۹۱ برابر) بود (شکل ۲، ب). در ژن رویسکو اکتیواز در شروع گرده‌افشانی اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها از نظر کاهش

بیان این ژن در اثر تنش خشکی وجود نداشت اما از مرحله ۷ روز پس از گرده‌افشانی به بعد، اختلاف کاهش بیان این ژن در لاین‌های جهش‌یافته در اثر تنش، به طور معنی‌داری بیشتر از رقم تیپ وحشی بود و هرچه گیاهان به مراحل پایانی پر شدن دانه نزدیک می‌شدند این اختلاف، بیشتر خود را نشان داد به طوری که در مرحله ۲۸ روز پس از گرده‌افشانی کاهش بیان ژن رویسکو اکتیواز در لاین‌های جهش‌یافته T-65-7-1 و T-67-60 و رقم تیپ وحشی به ترتیب ۸/۰۹، ۴/۸۱ و ۲/۳۹ برابر بود. (شکل ۲، ج). رویسکو در طی پیری تخریب شده و محصولات حاصل از آن می‌توانند به عنوان منبع نیتروژن و کربن در توسعه بافت‌ها و بذرها در حال رشد مورد استفاده قرار گیرند (Suzuki et al., 2001) و البته هنوز علی‌رغم اهمیت و تأثیر فیزیولوژیکی آن در هموستازی و تولید در گیاهان مکانسیم کلی تخریب رویسکو مشخص نیست (Masclaux-Daubresse et al., 2010). با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت لاین‌های جهش‌یافته نسبت به رقم تیپ وحشی در اثر خشکی با پیری زودرس مواجه می‌شوند و از آنجا که تحریک انتقال مجدد مواد فتوستتزی از ساقه به دانه جهت استفاده آسیمیلات‌های ذخیره شده در بافت‌های رویشی توسط پدیده پیری انجام می‌شود؛ لاین‌های جهش‌یافته از انتقال مجدد و کارایی بیشتری نسبت به رقم تیپ وحشی برخوردار باشند.

تغییرات ژنتیکی مرتبط با پیری زودرس در لاین‌های جهش‌یافته و متعاقب آن افزایش انتقال مجدد ذخایر فتوسنتزی ساقه به دانه طی پر شدن دانه شده است و کاهش شدید عملکرد دانه در اثر تنش خشکی جلوگیری کرده است. نتایج پژوهش حاضر می‌تواند نقش مهمی در توجه به پتانسیل اصلاح موتاسیونی در متحمل کردن گیاهان به خشکی داشته باشد.

رقم تیپ وحشی نیز بیشتر با تداوم فتوسنتز جاری برگ‌ها در جهت پر شدن دانه‌ها عمل کرده است. در مناطق خشک و نیمه‌خشک پیری القایی بر اثر تنش، باعث افزایش انتقال مجدد مواد فتوسنتزی و بهبود عملکرد می‌شود و تأخیر در پیری نتیجه نامطلوبی در پی خواهد داشت (Yang & Zhang, 2006). با توجه به اینکه لاین‌های جهش‌یافته مورد مطالعه حاصل از برنامه اصلاح موتاسیونی با پرتوتابی گاما بوده‌اند به نظر می‌رسد پرتوگاما باعث

منابع

- Bartholomew DM, Bartley GE, Scolnik PA (1991). Abscisic acid control of rbcS and cab transcription in tomato leaves. *Plant Physiology* 96: 291-296.
- Bazargani MM, Sarhadi E, Bushehri A-AS, Matros A, Mock H-P, Naghavi M-R, Hajihoseini V, Mardi M, Hajirezaei M-R, Moradi F (2011). A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *Journal of proteomics* 74: 1959-1973.
- Blum A (1998). Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica* 100:77-83.
- Blum A, Sinmena B, Mayer J, Golan G, Shpiler L (1994). Stem reserve mobilisation supports wheat-grain filling under heat stress. *Functional Plant Biology* 21: 771-781.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers P, Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28: 350-356.
- Ehdaie B, Alloush G, Madore M, Waines J (2006). Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: I. P postanthesis changes in internode dry matter. *Crop science* 46: 735-747.
- Ehdaie B, Alloush G, Waines J (2008). Genotypic variation in linear rate of grain growth and contribution of stem reserves to grain yield in wheat. *Field Crops Research* 106: 34-43.
- Evans JR (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78: 9-19.
- Goncalves SJ, Cairney J, Maroco MM (2005). Evaluation of control transcripts in real-time RT-PCR expression analysis during maritime pine embryogenesis. *Planta* 222: 556-563.
- Hörtensteiner S, Feller U (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* 53: 927-937.
- Hukmani P, Tripathy BC (1994). Chlorophyll biosynthetic reactions during senescence of excised barley (*Hordeum vulgare* L. cv IB 65) leaves. *Plant physiology* 105: 1295-1300.

- Lichtenthaler HK (1987). Chlorophyll fluorescence signatures of leaves during the autumnal chlorophyll breakdown. *Journal of Plant Physiology* 131: 101-110.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany: mcq028*.
- Matile P, Hortensteiner S, Thomas H, Krautler B (1996). Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant physiology* 112: 1403.
- Mi G, Tang L, Zhang F, Zhang J (2002). Carbohydrate storage and utilization during grain filling as regulated by nitrogen application in two wheat cultivars. *Journal of plant nutrition* 25: 213-229.
- Mojtabaie Zamani M, Nabipour M, Meskarbashee M (2013). Evaluation of stem soluble carbohydrate accumulation and remobilization in spring bread wheat genotypes under terminal heat stress conditions in Ahwaz in Iran. *Iranian Journal of Crop Sciences* 15(3): 277-294 (In Farsi).
- Navabpour S, Ramezani SS, Kazemi G (2015). Molecular analysis of hypersensitive reaction and senescence process in wheat leaves. *Quarterly Modern Genetics Journal* 10(1): 59-68 (In Farsi).
- Nie G, Long S, Garcia R, Kimball B, Lamorte R, Pinter P, Wall G, Webber A (1995). Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant, Cell & Environment* 18: 855-864.
- Ono Y, Wada S, Izumi M, Makino A, Ishida H (2013). Evidence for contribution of autophagy to Rubisco degradation during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment* 36: 1147-1159.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45-e45.
- Rubia L, Rangan L, Choudhury RR, Kamínek M, Dobrev P, Malbeck J, Fowler M, Slater A, Scott N, Bennett J (2014). Changes in the chlorophyll content and cytokinin levels in the top three leaves of new plant type rice during grain filling. *Journal of plant growth regulation* 33: 66-76.
- Salehi M, Nassiri Mahallati M, Koocheki A (2003). Leaf nitrogen and chlorophyll as indicators for salt stress. *Iranian Journal Field Crops Research* 1: 199-205 (In Farsi)
- Sharbatkhari M, Galeshi S, Sadat Shobbar Z, Soltani A, Nakhoda B (2014). Expression analysis of the key genes of fructan remobilization and some physiological traits in wheat under terminal salinity. *Journal of Agricultural Biotechnology* 6: 75-90 (In Farsi).
- Shu Q, Forster BP, Nakagawa H, Nakagawa H (2012). *Plant mutation breeding and biotechnology: CABI. UK.*
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho T-HD, Qu R (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science* 155: 1-9.
- Suzuki Y, Makino A, Mae T (2001). Changes in the turnover of Rubisco and levels of mRNAs of *rbcL* and *rbcS* in rice leaves from emergence to senescence. *Plant, Cell & Environment* 24: 1353-1360.
- Tuberosa R, Salvi S (2006). Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in Plant Science* 11: 405-412.
- Vu JC, Baker JT, Pennanen AH, Allen Jr LH, Bowes G, Boote KJ (1998). Elevated CO₂ and water deficit effects on photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, and carbohydrate metabolism in rice. *Physiologia Plantarum* 103: 327-339.

- Weng XY, Xu HX, Jiang DA (2005). Characteristics of gas exchange, chlorophyll fluorescence and expression of key enzymes in photosynthesis during leaf senescence in rice plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 47: 560-566.
- Williams J, Bulman M, Neill S (1994). Wilt-induced ABA biosynthesis, gene expression and down-regulation of *rbcS* mRNA levels in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 91: 177-182.
- Xu S, Chu C, Harris M, Williams C (2010). Comparative analysis of genetic background in eight near-isogenic wheat lines with different H genes conferring resistance to Hessian fly. *Genome* 54: 81-89.
- Yang J, Zhang J (2006). Grain filling of cereals under soil drying. *New phytologist* 169: 223-236.
- Yang J, Zhang J, Huang Z, Zhu Q, Wang L (2000). Remobilization of carbon reserves is improved by controlled soil-drying during grain filling of wheat. *Crop Science* 40: 1645-1655.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research* 14: 415-421.

Molecular and physiological analysis of flag leaf senescence and remobilization of assimilates in bread wheat under terminal drought stress

Bagherikia S.¹, Pahlevani M H. ^{*2}, Yamchi A.³, Zenalinezhad K.³, Mostafaie A. ⁴

¹ Ph. D. Candidate in Plant Breeding & Biotechnology Department, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Iran,

² Associate Professor in Plant Breeding & Biotechnology Department, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Iran,

³ Assistant Professor in Plant Breeding & Biotechnology Department, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Iran,

⁴ Professor in Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Iran,

Abstract

In the physiological study of stem remobilization of assimilates during grain filling, mutant genetic materials are a valuable tool. Two advanced mutant lines of bread wheat (T-67-60 and T-65-7-1) along with their wild type (Tabasi Cv.) were planted at two moisture conditions (normal and 30-40% of field capacity) as a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. Drought treatment initiated at full heading stage (Zadoks 60) and sampling done at 5 steps (0, 7, 14, 21 and 28 days after anthesis). Based on the results remobilization of stem and its efficiency in the mutant lines was significantly more than wild type, under terminal drought stress. The reasons for this were higher capability of the sink and early senescence in the mutant lines compared to the wild type. In consequence of changes in chlorophyll content and relative gene expression of key photosynthetic Rubisco (Rubisco large and small subunits and Rubisco activase), in the genotypes during grain filling seems degradation of chloroplasts and photosynthetic system occurred caused by senescence drought stress-induced in the mutant lines more strongly than in the wild type, and because of senescence is stimulating remobilization of assimilates from stem to grain, remobilization of stem and its efficiency in mutant lines were more than wild type. Also, wild type further with continuation of current photosynthesis in the leaves has acted for the grain filling.

Keywords: *Gene expression, Senescence, Mutant, Rubisco, Chlorophyll.*

* Corresponding Author: Pahlevani M H.

Tel: +9801732437616

Email: hpahlavani@yahoo.com