



بررسی بیان ژن‌های کلیدی در انتقال مجدد فروکتان گندم و برخی صفات فیزیولوژیک طی تنش شوری

انتهای فصل

ماهرخ شربتخواری^۱، زهرا سادات شبر^{۲*}، سراله گالشی^۳، افشین سلطانی^۴، بابک ناخدا^۵

^۱ دانشجوی دکتری گروه زراعت، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲ استادیار بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

^۳ استاد گروه زراعت، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۰۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۲۱

چکیده

انتقال مجدد قندهای محلول ساقه گندم به‌ویژه فروکتان در شرایط تنش اهمیت زیادی در پر نمودن دانه و تولید عملکرد دارد. به‌منظور مطالعه اثر شوری بر بیان ژن‌های کلیدی دخیل در این سازوکار، ارقام متحمل بم و حساس قدس از نظر بیان ژن‌های *I-sst* و *6-sft* دخیل در بیوسنتز فروکتان، ژن‌های *I-feh* و *ivf* به‌ترتیب دخیل در تجزیه فروکتان و ساکارز و ژن *sut1* دخیل در انتقال ساکارز به‌روش Real-Time PCR بررسی شدند. آزمایش در گلخانه بر پایه طرح کاملاً تصادفی به‌روش فاکتوریل، در سه تکرار و اعمال شوری از شروع گلدهی با آب آبیاری با هدایت الکتریکی 15 dSm^{-1} به‌همراه تیمار شاهد انجام شد. نمونه‌برداری ساقه برای اندازه‌گیری فروکتان در پنج نوبت به‌فاصله یک هفته طی پر شدن دانه، نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب و پرولین از برگ و برای آزمایشات مولکولی از ساقه و بذر طی یک نوبت در ۲۱ روز پس از گلدهی انجام شد. مقدار انتقال مجدد از تفاضل حداکثر و حداقل فروکتان محاسبه گردید. نتایج نشان داد اثر شوری بر محتوای نسبی آب و پرولین معنی‌دار بود. طی شوری القای انتقال مجدد و افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *I-sst*، *I-feh* و *ivf* ساقه و *sut1* بذر در بم اتفاق افتاد. بیان ژن‌های *I-feh* و *ivf* با انتقال مجدد فروکتان در شوری همبستگی مثبت و معنی‌دار داشت. براساس نتایج، رقم بم با توانایی بالاتر در تجزیه و انتقال فروکتان طی پر شدن دانه به‌کمک تنظیم بیان ژن‌های درگیر در این مسیر، در استفاده از ذخایر ساقه طی شوری موفق‌تر بوده و عملکرد بالاتری تولید کرد.

واژه‌های کلیدی: شوری انتهای فصل، انتقال مجدد فروکتان، بیان ژن.

مقدمه

اسمولیت‌ها مستلزم افزایش بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های درگیر در مسیرهای متابولیکی این ترکیبات می‌باشد. فروکتان‌ها که الیگو و پلی ساکاریدهای خطی یا منشعب بر پایه فروکتوز می‌باشند و از ساکارز مشتق شده‌اند، بیشترین مقدار قند محلول کل ساقه گندم را تشکیل می‌دهند. لذا مطالعات زیادی در مورد فعالیت آنزیم‌های مسیر متابولیکی فروکتان‌ها و ژن‌های دخیل در این فرایند در شرایط آبیاری و تنش خشکی انجام شده است (Xue et al., 2008). مهم‌ترین ژن‌هایی که در مسیر بیوسنتز فروکتان دخالت دارند شامل ژن *I-sst* مربوط به آنزیم ۱- فروکتوزیل ترانسفراز، ژن *6-sft* مربوط به آنزیم ۶-فروکتوزیل ترانسفراز و ژن *I-fft* مربوط به آنزیم ۱ و ۲- بتافروکتان ۱-فروکتوزیل ترانسفراز می‌باشند (Van den Ende et al., 2003). افزایش تولید فروکتان با هدف افزایش تحمل تنش‌های غیر زیستی طی دو دهه اخیر مورد توجه محققین بوده است. افزایش بیان ژن‌های بیوسنتزی فروکتان و تجمع آن در تنش‌های خشکی و سرما (Kawakami and Yoshida, 2008; Xue et al., 2005) که اولین آثار منفی آنها بر گیاه ناشی از تنش اسمزی است به گیاه کمک می‌کند تا با جذب آب و تداوم فعالیت‌های حیاتی، برای مقابله با افزایش شدت تنش راهبردهای پیچیده تری را سازماندهی کند (Hisano et al., 2004) ولی در رابطه با تنظیم بیان این ژن‌ها تحت تنش شوری در انتهای فصل رشد تاکنون مطالعه‌ای

تحت شرایط تنش، طیفی از پاسخ‌ها در کل گیاه و در سطوح سلولی و مولکولی مشاهده می‌شود (Hasegawa et al., 2000) و الگوی بیان بسیاری از ژن‌ها از جمله ژن‌های مربوط به پروتئین‌های درگیر در مسیرهای سیگنالی و پروتئین‌های عملکردی در پاسخ به تنش تغییر می‌کند. پاسخ‌های گیاهی در این شرایط به طور کلی منجر به حفظ ثبات، سم زدایی و تداوم رشد گیاه می‌گردد (Salekdeh et al., 2002). در مناطق خشک و نیمه‌خشک با طی شدن رشد رویشی، گیاه با کاهش بارندگی مواجه شده، فراوانی آبیاری کاهش یافته و میزان تبخیر و تعرق گیاه با افزایش دما افزایش می‌یابد. این عوامل باعث تجمع نمک در محلول خاک شده و می‌تواند تنش شوری را در مرحله رشد زایشی گیاه به وجود بیاورد (Karim et al., 1993). به دلیل تنش اسمزی و یونی ناشی از شوری، گیاه از سازوکارهای مختلفی نظیر تنظیم اسمزی و کده‌بندی سدیم و کلر در واکوئل برای تداوم جذب آب و حفظ کارایی فتوسنتز استفاده می‌کند (Jenks, 2007). تنظیم اسمزی تحت تاثیر عوامل محیطی بوده و باعث افزایش انواع اسمولیت‌ها مانند کربوهیدرات‌های محلول شامل فروکتان‌ها، ساکارز، گلوکز و فروکتوز طی شوری می‌گردد و در بین ارقام گندم دارای تنوع ژنتیکی است (Blum, 1998; Kerepesi and Galiba, 2000; Eghdaie et al., 2006). تجمع هر یک از

گردیده (Yang et al., 2004) و بیشترین بیان آن طی خشکی از ۲۱ تا ۳۲ روز پس از گلدهی گزارش شده است (Yang et al., 2004; Joudi et al., 2012). چرخه مداوم تجزیه و ساخت ساکارز از ویژگی‌های مهم متابولیسم ساکارز در بسیاری از سیستم‌های گیاهی است. ساکارز مهم‌ترین کربوهیدرات انتقال یابنده در مسیرهای طولانی است و جابجایی آن در عرض غشا از دو مسیر حاملین با میل ترکیبی بالا و ظرفیت پایین شامل زیرخانواده SUT1 و ناقل‌های با میل ترکیبی پایین و ظرفیت بالا شامل دو زیرخانواده SUT2 و SUT4 صورت می‌گیرد. این سه زیر خانواده از نظر ساختار ژن و پروتئین، سینتیک انتقال قند و محل استقرار در سلول متفاوتند. ناقلین ساکارز در گندم در زیرخانواده SUT2 قرار داشته، همبر (سیمپورتر) ساکارز/پروتون بوده و با قرار گرفتن در ساختار غشای پلاسمایی در بارگیری آوند آبکش در بافت منبع و انتقال ساکارز در مسیرهای طولانی و بارگذاری در بافت مخزن اهمیت دارند و فعالیت آنها در سطح بیان ژن تنظیم می‌گردد (Shiratake, 2007). ژن *sut1* در گندم هگزاپلوئید دارای سه نسخه *sut1A*, *sut1B*, *sut1D* است که هر یک از آنها در کروموزوم شماره ۴ به ترتیب در ژنوم‌های A, B و D وجود دارند. این رونوشت‌ها از نظر طول منطقه 3'UTR که رونویسی شده ولی ترجمه نمی‌شود متفاوتند ولی از نظر توالی پروتئین ۹۸٪ شباهت دارند و به مقدار مشابهی در برگ، ساقه و دانه بیان می‌شوند (Aoki et al., 2004; Aoki et al., 2004).

انجام نشده است. در دوره پر شدن دانه‌ها با افزایش بیان ژن‌های درگیر در هیدرولیز فروکتان مانند *1-feh* و *6-feh* مربوط به آنزیم‌های ۱-اگزوهیدرولاز و ۶-اگزوهیدرولاز و تجزیه فروکتان به فروکتوز و ساکارز، ساکارز انتقال مجدد ذخایر کربوهیدرات محلول ساقه فعال می‌گردد (Xue et al., 2008). ژن *1-feh* دارای سه نسخه *1-feh w1*, *1-feh w2* و *1-feh w3* است که هر یک از آنها روی کروموزوم ۶ به ترتیب در ژنوم‌های D, A و B گندم قرار دارند. میزان بیان آنها بین و درون ژنوتیپ‌های گندم در تیمار تنش آبی متفاوت گزارش شده است. به دلیل بیان بالاتر ژن *1-feh w3* به میزان ۱۰ تا ۲۰ برابر نسبت به دو رونوشت دیگر و همبستگی بالای آن با مقدار فروکتان، این رونوشت به عنوان ژن کلیدی در تجزیه فروکتان در گندم معرفی شده است (Zhang et al., 2009). تحت تنش آبی بیان ژن *1-feh* طی ۲۰ تا ۲۸ روز پس از گلدهی به حداکثر می‌رسد (Wardlaw and Willenbrink, 2000; Zhang et al., 2009). استفاده موثر از قندها در گیاه بستگی به فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده ساکارز دارد که تحت تاثیر ژن‌های پاسخ‌دهنده به قند بیان می‌شوند (Koch, 1996). آنزیم اینورتاز واکوئلی (*ivr*) در کنترل ترکیب قندها در اندام‌های مخزن و نیز در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی و تنظیم اسمزی اهمیت دارد. افزایش بیان ژن اینورتاز واکوئلی طی پر شدن دانه و به دنبال تجزیه فروکتان، باعث هیدرولیز ساکارز و تولید فروکتوز و گلوکز

2007). بر اساس مطالعات انجام شده تاکنون تحقیقی در رابطه با تاثیر شوری انتهای فصل بر تغییرات ذخایر قندی ساقه گندم طی پر شدن دانه و بررسی بیان ژنهای دخیل صورت نگرفته است. در این پژوهش با مطالعه تغییرات بیان ژنهای دخیل در انتقال مجدد فروکتان در ژنوتیپهای حساس و متحمل به شوری، نقش آنها در توانمند ساختن گیاه برای استفاده از ذخایر ساقه در شوری انتهای فصل مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روش ها

کشت گیاه و اعمال تنش

دو رقم گندم شامل بم (متحمل به شوری با انتقال مجدد بالا) و قدس (حساس به شوری با انتقال مجدد پایین) از نظر چگونگی بیان ژنهای کلیدی دخیل در بیوسنتز، تجزیه و انتقال فروکتان مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. کشت در گلخانه با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل رقم و تیمار شوری هر کدام در دو سطح بودند. تیمار شوری از طریق انحلال کلرید سدیم در آب آبیاری با هدایت الکتریکی ۱۵ دسی‌زیمنس بر متر از مرحله شروع گلدهی اعمال شد. هدایت الکتریکی خاک از طریق آب زهکش گلدان به طور هفتگی کنترل شد.

اندازه‌گیری عملکرد و صفات فیزیولوژیک

عملکرد دانه با محتوای رطوبتی ۱۳٪ بر حسب گرم در بوته محاسبه گردید. محتوای نسبی آب برگ (RWC) بر روی دومین برگ کاملاً رشد یافته از بالا (Dhanda and Sethi, 1998) و محتوای پرولین برگ با استفاده از اسپکتروفوتومتری در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bates *et al.*, 1973). برای اندازه‌گیری قند، نمونه‌برداری از ساقه از زمان گلدهی به فاصله هفت روز طی پنج نوبت انجام و پس از استخراج به روش ژو و همکاران (Xue *et al.*, 2008) محتوای قندهای هگزوز (گلوکز+فروکتوز) و فروکتان با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد (Ehdaie *et al.* 2006). انتقال مجدد فروکتان ساقه از تفاضل حداکثر و حداقل محتوای فروکتان در طول پر شدن دانه محاسبه گردید.

آزمایشات مولکولی

نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری بیان ژن در زمان ۲۱ روز پس از گلدهی از بافت ساقه و بذر (با ۳ مشاهده در هر تکرار) صورت گرفت و داخل نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. دو دلیل اصلی برای انتخاب زمان نمونه برداری شامل رسیدن شوری خاک به سطح ۱۵ دسی‌زیمنس بر متر و بررسی تاثیر شوری بر بیان ژنهای مورد مطالعه در زمان اوج مرحله پر شدن و بالاترین سرعت رشد دانه می‌باشد.

Promega از شرکت RNase-free DNase انجام گرفت. جهت اطمینان از حذف آلودگی احتمالی DNA، واکنش PCR با RNA تیمار شده DNase با استفاده از آغازگر ژن *phg* انجام شد.

سنتز cDNA و بررسی نسبی بیان ژن با روش Real time PCR: واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت BIO-RAD, iScript cDNA synthesis kit و واکنش Real time PCR با استفاده از کیت (BIO-RAD, iQ Syber Green) Supermix انجام شد. به منظور تعیین کارایی (E) هر جفت آغازگر در واکنش Real Time PCR، پنج سری رقت با دو تکرار از مخلوط cDNA تهیه و منحنی استاندارد رسم شد و پس از تعیین شیب خط، کارایی هر جفت آغازگر محاسبه گردید (فرمول ۱) (Pfaffi, 2001).

فرمول (۱) $E = (1 - 10^{-1/Slope}) * 100$

میزان بیان ژن با روش Efficiency adjusted $\Delta\Delta Ct$ (فرمول ۲) (Pfaffi, 2001) محاسبه شد. همه داده‌ها با ژن خانه‌دار فسفوجلوکونوات دهیدروژناز (*phg*) به عنوان کنترل داخلی (Paolacci et al., 2009) نرمال و میزان بیان ژن در تنش‌های مختلف نسبت به شاهد رقم متحمل بم سنجیده شد.

(۲)

$$ratio = \frac{E_{(target)}^{\Delta Ct_{target}(Control-sample)}}{E_{(ref)}^{\Delta Ct_{ref}(Control-sample)}}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و با استفاده از رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ۰/۰۵ صورت گرفت.

طراحی آغازگر: به منظور بررسی الگوی بیان پنج ژن دخیل در انتقال مجدد فروکتان ساقه شامل *1-sst*, *6-sft*, *1-feh*, *ivr* و *sut1* و ژن خانه‌دار فسفوجلوکونودهایدروژناز (*phg*)^۱ که بر اساس مطالعات انجام شده بیان آن طی دوره زایشی گندم در بافت‌های مختلف و در شرایط تنش دارای ثبات نسبی بالایی بود (Paolacci et al., 2009) به روش Real time PCR، آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار OLIGO ver 5 و بر اساس توالی‌های اختصاصی طراحی شدند به طوری که حداقل پرایمر برگشتی بر روی توالی 3'UTR قرار داشت (جدول ۱). در مورد ژن *sut1* طراحی دو آغازگر متفاوت برای تفکیک رونوشت‌های A و B امکان‌پذیر نبود لذا با جفت آغازگر طراحی شده هر دو رونوشت مورد تکثیر قرار گرفتند. تکثیر همزمان این دو رونوشت در تحقیقات دیگر نیز صورت گرفته است (Aoki et al., 2004). بیان این ژن علاوه بر ساقه در بذر نیز اندازه‌گیری شد.

استخراج RNA: ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت تر گیاه با کمک نیتروژن مایع در هاون ساییده و با استفاده از ترایزول (Invitrogen, life technology) کل RNA استخراج شد (Chomczynski & Sacchi, 1987). به منظور اطمینان از کیفیت مطلوب و تعیین غلظت، نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند. حذف آلودگی DNA ژنومی با کیت DNase1 (RQ1)

^۱ Similar to phosphogluconate dehydrogenase

جدول ۱- فهرست آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژنهای دخیل در متابولیسم و انتقال مجدد فروکتان.

Table 1- List of primer pairs used in expression analysis of genes involved in fructan metabolism and remobilization.

نام ژن Gene	شماره دسترسی Accession No.	آغازگر رو به جلو Forward	آغازگر برگشتی Reverse	دمای اتصال Annealing (c) Temp.	طول محصول Product Length (bp)
<i>1-sst</i>	AB029888.1	GCGACTCTGCCTATCACTTC	CATAGCCCTGTCATCAACAC	62	88
<i>6-sft</i>	AB029887.1	CGATCACTCGTATGTTCAATG	CACGGATAGATGTTTCTGTTC	61	118
<i>1-feh w3</i>	AJ508387.1	AATGTGGAGAAGGGTTGGAG	GGCTATTTTCTTTCCTGCTG	61	125
<i>ivr</i>	AF069309.1	ACGATGCCTCAGCCGCCTTG	GAGGGAGGAAGTCGCCGATC	62	122
<i>sut1A</i>	AF408842.1	TATTCCTGCTGCCCAAGATC	CTGCTCTACGGAGTCCTTAG	60	159
<i>sut1B</i>	AF408843.1	TATTCCTGCTGCCCAAGATC	CTGCTCTACGGAGTCCTTAG	60	145
<i>phg</i>	Ta30797.1	ACTGGTGGTTCAGGCTAAAG	TGGGTTGGACGAACTACAAG	62	92

نتایج و بحث

عملکرد دانه و صفات فیزیولوژیک

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر شوری بر محتوای رطوبت نسبی، محتوای پرولین و انتقال مجدد فروکتان و اثر ژنوتیپ بر عملکرد دانه، حداکثر محتوای هگروزها و محتوای پرولین معنی دار بود (جدول ۲). اثر متقابل شوری و ژنوتیپ نیز بر تمام صفات غیر از مقدار هگروزها معنی دار بود که نشان داد دو رقم مورد بررسی تحت تنش شوری به شیوه متفاوتی پاسخ دادند. مقایسه ارقام در هر یک از سطوح شوری نشان داد رقم قدس طی شوری به طور قابل توجهی عملکرد دانه کمتری نسبت به بم داشت (جدول ۳). حفظ محتوای آب نسبی برگ در بم

همزمان با افزایش معنی دار محتوای پرولین (جدول ۳) و قندهای هگروز (شکل ۴b) حاکی از واکنش این رقم در پاسخ به شوری برای تنظیم اسمزی است. انتقال مجدد فروکتان نیز در ارقام بم و قدس طی شوری به ترتیب افزایش و کاهش یافت (جدول ۳). به نظر می رسد تنش شوری انتهای فصل اعمال شده تأثیری بر محتوای آب برگ نگذاشته و گیاه قادر به تداوم فتوسنتز خود بوده و از طرفی این تنش ملایم منجر به القای سازوکار انتقال مجدد در رقم متحمل بم گردیده و در این شرایط بذور در حال پر شدن با دو منبع فتوسنتز جاری و انتقال مجدد ذخایر ساقه تغذیه شدند که می تواند باعث افزایش وزن دانه در بوته شده و عملکرد نهایی را افزایش دهد.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات محتوای آب نسبی، محتوای پرولین، حداکثر محتوای هگزوزها (گلوکز+ فروکتوز)، انتقال مجدد فروکتان و عملکرد دانه برای ارقام بم و قدس در سطوح شوری.

Table 2- Analysis of variance of relative water content (RWC), proline content, hexoses content, fructan remobilization (Fructan Rem.) and grain yield for Bam and Ghods varieties at salt levels.

منبع تغییرات SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of square				
		محتوای آب نسبی RWC	پرویلین Prolin	محتوای هگزوزها Hexoses content	انتقال مجدد فروکتان Fructan Rem.	عملکرد Yield
ژنوتیپ	1	17.5 ^{ns}	0.44 ^{**}	164.4 ^{**}	3.9 ^{ns}	0.001 ^{**}
Genotype(G)						
شوری Salinity(S)	1	89.1 ^{**}	0.13 ^{**}	2.9 ^{ns}	61.8 [*]	1.302 ^{ns}
ژنوتیپ×شوری (S×G)	1	102.7 ^{**}	0.34 ^{**}	0.117 ^{ns}	566.4 ^{**}	0.117 ^{**}
Errorخطا	8	7.0	0.003	0.36	10.7	0.001

Non-significant ^{ns}, Significant at P<0.01 ^{**} ^{**} معنی داری در سطح ۰/۰۱، ^{ns} غیر معنی دار

جدول ۳- مقایسه میانگین عملکرد دانه (گرم در بوته)، محتوای آب نسبی (%)، محتوای پرولین، انتقال مجدد فروکتان و محتوای هگزوزها (میلی گرم بر گرم).

Table 3- Mean comparison of grain yield (g per plant), RWC (%), prolin content (mgg⁻¹), fructan remobilization (mgg⁻¹) and hexoses content (mgg⁻¹).

ژنوتیپ Genotype	محتوای آب نسبی RWC		عملکرد Yield		پرویلین Prolin		انتقال مجدد فروکتان Fructan Rem.		محتوای هگزوزها Hexoses content	
	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S
	بم (Bam)	84.0 ^a	84.6 ^a	0.73 ^b	0.83 ^a	0.10 ^b	0.75 ^a	26.4 ^b	33.0 ^a	4.5 ^a
قدس (Ghods)	81.3 ^a	77.1 ^b	0.86 ^a	0.73 ^b	0.18 ^a	0.23 ^b	37.7 ^a	28.0 ^b	3.4 ^a	3.3 ^b

مقایسه میانگین ها در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) انجام شده است. در هر ستون حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار است.

Mean comparison at P<0.05 using Least Significant Difference (LSD) test. Similar characters in each column shows non-significant difference.

ژن *6-sft* که اثر ساده شوری بر آن معنی دار نبود بیان سایر ژنهای مورد بررسی در زمان ۲۱ روز پس از گلدهی به طور معنی داری تحت تاثیر قرار گرفت (جدول ۴). اثرات متقابل معنی دار بیانگر

مقایسه بیان ژن های مورد بررسی تحت تیمارهای شاهد و شوری نتایج تجزیه واریانس داده های بیان ژن نشان داد، تحت تنش شوری انتهای فصل غیر از

افزایش یافت (Xue et al., 2008) ولی در مورد چگونگی بیان آن در مرحله پر شدن دانه گندم مطالعه‌ای انجام نشده است. بررسی انجام شده بر روی فعالیت آنزیم *I-sst* ساقه گندم طی تنش خشکی انتهای فصل نشان داد فعالیت آنزیم با شروع تنش روند کاهشی پیدا کرد (Yang et al., 2004). به نظر می‌رسد طی تنش شوری انتهای فصل، افزایش بیان ژن *I-sst* در روز ۲۱ پس از گلدهی در القای تنظیم اسمزی دخالت داشته باشد.

پاسخ‌دهی متفاوت ارقام در مواجهه با شوری بود و نشان داد بیان ژن‌های مورد بررسی در ساقه دو رقم به طور متفاوتی تحت تاثیر شوری قرار گرفته‌اند.

بررسی بیان ژن *I-sst* مربوط به آنزیم ساکارز-ساکارز ۱- فروکتوزیل ترانسفراز: میزان بیان ژن *I-sst* در ساقه در پاسخ به شوری نسبت به حالت نرمال در رقم بم به میزان ۳/۱ برابر و در رقم قدس به میزان ۲/۸ برابر افزایش یافت (شکل ۱) بیان این ژن در ساقه گندم طی تنش خشکی انتهای فصل در شروع گرده افشانی

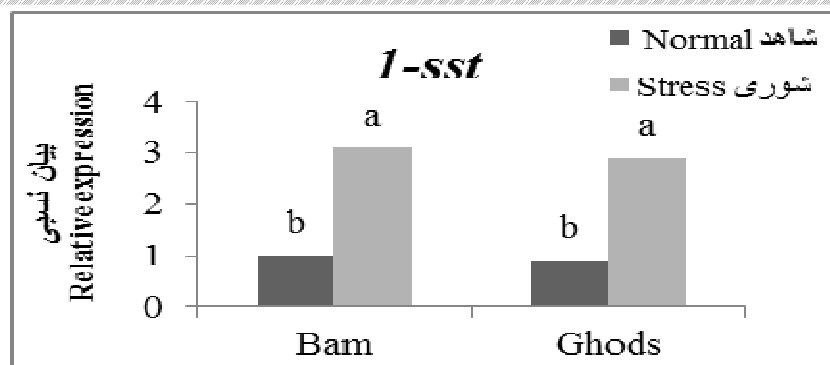
جدول ۴- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی تحت تنش شوری انتهای فصل.

Table 4- Analysis of variance for expression of the studied genes under terminal salinity.

منبع تغییرات SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of square					
		<i>I-sst</i> stem	<i>6-sft</i> stem	<i>1-feh</i> stem	<i>ivrstem</i>	<i>sut 1</i> stem	<i>sut</i> seed
ژنوتیپ	1	5.35**	1.47**	2.0**	1.14 ^{ns}	0.08**	0.00 ^{ns}
شوری (S)	1	19.8**	0.21 ^{ns}	1.1**	41.4**	0.4**	1.02**
ژنوتیپ×شوری S×G	1	3.9*	0.16*	2.0**	15.6**	0.3**	0.1 ^{ns}
خطا Error	8	3.8	0.39	0.8	7.3	0.05	0.27

* معنی داری در سطح ۰/۰۵، ** معنی داری در سطح ۰/۰۱، ^{ns} غیر معنی دار

Non-significant ^{ns}, Significant at P<0.01** Significant at P<0.05*

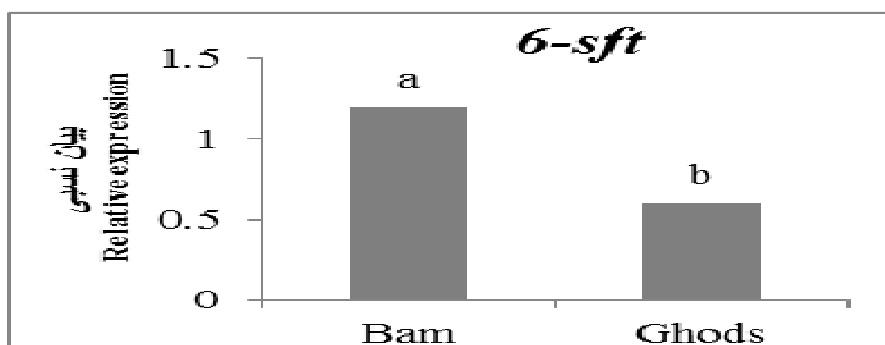


شکل ۱- مقایسه میانگین بیان ژن *I-sst* نسبت به شاهد رقم متحمل بم در روز ۲۱ پس از گلدهی با استفاده از آزمون LSD.

Figure 2- Mean comparison of *I-sst* relative expression to the normal level of Bam at 21 after anthesis using LSD test.

گندم در تنش خشکی انتهای فصل، بیشترین فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز فروکتان در هفته اول پس از گلدهی اتفاق افتاد و پس از آن روند تغییرات نزولی بود (Yang et al., 2004). در شرایط مطالعه حاضر این احتمال وجود دارد که شروع افزایش بیان در این ژن زودتر اتفاق افتاده باشد و در زمان اندازه‌گیری (روز ۲۱ پس از گلدهی) بیان ژن روند کاهشی را طی کند.

بررسی بیان ژن *6-sft* مربوط به آنزیم ساکارز-فروکتان ۶- فروکتوزیل ترانسفراز: بر اساس نتایج بدست آمده در روز ۲۱ پس از گلدهی، اثر تیمار شوری در هیچ یک از دو رقم معنی‌دار نبود (شکل ۲) ولی پاسخ متفاوت ارقام به شوری باعث شد تا میزان بیان در رقم قدس تحت شرایط تنش به طور معنی‌داری کمتر از رقم بم به دست آید. در مطالعه انجام شده بر روی

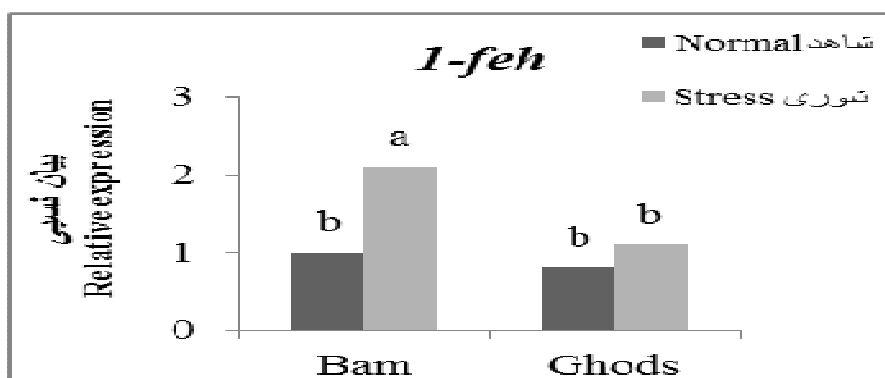


شکل ۲- مقایسه میانگین بیان ژن *6-sft* نسبت به شاهد رقم متحمل بم در روز ۲۱ پس از گلدهی بین ارقام بم و قدس در تیمار شوری.

Figure 2- Mean comparison of *6-sft* relative expression to the normal level of Bam at 21 after anthesis between Bam and Ghods varieties under salt stress.

رقم وستونیا با انتقال مجدد بالا افزایش قابل توجهی نسبت به رقم کاز با انتقال مجدد پایین داشت (Zhang et al., 2009). القای انتقال مجدد فروکتان همزمان با افزایش بیان *I-feh* ساقه طی شوری در رقم بم نشان می‌دهد (شکل ۳) در زمان افزایش تقاضا برای پر شدن دانه‌ها و محدودیت ساکارز، افزایش فعالیت فروکتان اگزوهیدرولاز می‌تواند منجر به شکسته شدن فروکتان و آزاد سازی فروکتوز و ساکارز شود. طی بررسی میزان فعالیت این آنزیم تحت تنش خشکی در گندم و نمونه برداری از ساقه از مرحله گلدهی با فواصل زمانی ۶ روزه تا مرحله بلوغ فیزیولوژیک مشخص شد میزان فعالیت آنزیم FEH طی پر شدن دانه‌ها افزایش می‌یابد و طی شرایط تنش در ۲۱ روز پس از گلدهی به حداکثر می‌رسد که در مقایسه با حالت نرمال زودتر اتفاق می‌افتد (Yang et al., 2004).

بررسی بیان ژن *I-feh* مربوط به آنزیم فروکتوزیل اگزوهیدرولاز: اعمال شوری از شروع گلدهی منجر به افزایش قابل توجهی در میزان بیان *I-feh* در روز ۲۱ پس از گلدهی در رقم متحمل بم شد در حالیکه در رقم قدس تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید. با توجه به نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳)، میزان انتقال مجدد فروکتان طی شوری به طور معنی‌داری در رقم افزایش و در قدس کاهش یافت. در تنش شوری همبستگی مثبت و معنی‌داری بین انتقال مجدد فروکتان و بیان ژن *I-feh* مشاهده شد ($r=0.71$ ، $p<0.05$). بر اساس نتایج محققین دیگر نیز بین میزان بیان *I-feh* با غلظت کربوهیدرات محلول و کارایی انتقال مجدد رابطه پایداری وجود داشت به این معنی که در مطالعات مختلف با شرایط متفاوت افزایش بیان این ژن با کاهش فروکتان و افزایش انتقال مجدد همراه می‌باشد و مشخص شد که میزان بیان این ژن طی تنش خشکی در



شکل ۳- مقایسه میانگین بیان ژن *I-feh* نسبت به شاهد رقم بم در روز ۲۱ پس از گلدهی به روش آزمون LSD.

Figure 3- Mean comparison of *I-feh* relative expression to the normal level of Bam at 21 after anthesis using LSD test.

یافت. در شکل ۴ افزایش بیان اینورتاز در میانگره‌های حاوی غلاف برگ نشان داده شده است. میزان این افزایش در رقم بم ۶/۴ برابر حالت نرمال و در قدس ۲/۵ برابر حالت نرمال بوده است. در این زمان تجزیه فروکتان و انتقال کربوهیدرات تجمع یافته در ساقه اهمیت پیدا می‌کند که با کاهش قند محلول فروکتان در ساقه همراه می‌باشد. اینورتاز سرعت انتقال کربوهیدرات به اندام مقصد را با تجزیه ساکارز کنترل می‌کند (Kim et al., 2000). تجمع هگزوزها طی تنش شوری در ساقه بم به طور معنی‌داری بالاتر از قدس بود (جدول ۳). احتمال دارد هگزوزهای تولید شده در رقم قدس بلافاصله در مسیرهای متابولیکی مورد استفاده قرار گرفته و یا تنظیمات پس از رونویسی یا ترجمه به نحوی بوده که منجر به افزایش فعالیت آنزیم و تولید قندهای هگزوز در این رقم نشده است. در اینورتازهای مهارشونده با قند، عناصر پایین‌دست ژن احتمالاً در تغییر شکل سریع mRNA نقش داشته و منجر به تنظیمات پس از رونویسی می‌شوند (Huang et al., 2007). در مطالعه اثر خشکی بر ذرت نیز، بیان ژن اینورتاز واکوئلی در ریشه تحت تنش خشکی افزایش یافت درحالی‌که فعالیت اینورتاز واکوئلی تغییری نکرد (Kim et al., 2000). در مطالعات بعدی علت این امر وجود یک مهارکننده پروتئینی گزارش شد که در تنظیم پس از ترجمه اینورتاز واکوئلی و اینورتاز دیواره سلولی دخالت دارد (Jin et al., 2009). در رابطه با بیان ژن *ivr* در

به نظر می‌رسد توان بالاتر رقم بم در انتقال مجدد ذخایر ساقه در تنش شوری (جدول ۳) با بیان بالاتر ژن *I-feh* مرتبط بوده و پتانسیل بالاتر این رقم را در استفاده از ذخایر فروکتان ساقه در تولید عملکرد دانه آشکار می‌سازد درحالی‌که در رقم قدس با انتقال مجدد پایین (جدول ۳) افزایش مشاهده شده در بیان ژن *I-feh* طی شوری معنی‌دار نبود. براساس مطالعه Zhang et al. (2009) میزان بیان *I-feh* با مقدار قند محلول ساقه همبستگی منفی داشت و بیان بالای این ژن به عنوان شاخصی برای کارایی بالای انتقال مجدد قند محلول معرفی شد.

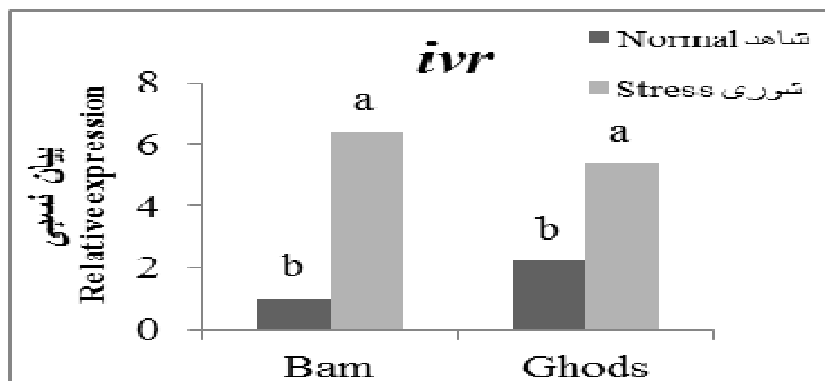
در تیمار شاهد، میزان بیان *I-feh* در هر دو رقم مشابه بود ولی رقم قدس احتمالاً به دلیل داشتن مقدار بالاتر فروکتان ساقه از حداکثر فعالیت آنزیمی خود برای تجزیه و انتقال مجدد استفاده نموده، در حالی‌که تحت شرایط تنش توانایی تنظیم افزایشی این ژن را نداشته و احتمالاً به دلیل محدود کننده بودن سایر عوامل دخیل ظرفیت انتقال مجدد آن محدود شده است. در صورتیکه افزایش بیان *I-feh* در رقم بم در تیمار تنش به همراه فراهم بودن سایر عوامل دخیل، منجر به افزایش انتقال مجدد آن شده است.

بررسی بیان ژن اینورتاز واکوئلی (*ivr*)

در ساقه: نتایج مربوط به تیمارهای شاهد و شوری از مرحله گلدهی نشان داد در تیمار شوری میزان بیان اینورتاز در ساقه در هر دو رقم نسبت به شاهد در ۲۱ روز پس از گلدهی افزایش

گلدهی در تیمار خشکی، تا ۲۱ الی ۲۴ روز پس از گلدهی افزایش یافت و طی دوره پر شدن دانه به حداکثر رسید (Joudi, Yang et al., 2004;) (2009).

ساقه گندم طی دوره پر شدن دانه تاکنون مطالعه ای انجام نشده ولی در بررسی فعالیت اینورتاز طی تنش خشکی انتهای فصل در گندم، فعالیت آنزیم پس از یک کاهش اولیه در هفته اول پس از



شکل ۴- مقایسه میانگین بیان ژن *ivr* نسبت به شاهد رقم بم در روز ۲۱ پس از گلدهی با استفاده از آزمون LSD.

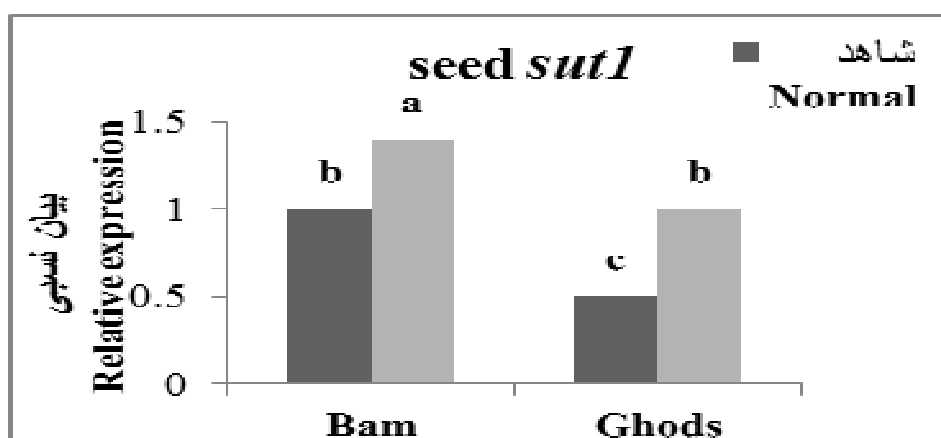
Figure 4- Mean comparison of *ivr* relative expression to the normal level of Bam at 21 after anthesis at 21 after anthesis using LSD test.

این ژن در تولید ناقل ساکارز به عنوان مهم‌ترین قند انتقال یابنده در گیاه، میزان بیان این ژن در هر دو رقم مورد بررسی در سطح مشابهی قرار داشته است. بررسی بیان ژن *sut1* در بذر نشان داد طی شرایط تنش میزان بیان در هر دو رقم افزایش معنی‌داری داشت و میزان بیان در بم به طور معنی‌داری بالاتر بود (شکل ۵). با توجه به اینکه ژن *sut1* در بافت‌های مختلف مانند ساقه، برگ و بذر بیان شده و به طور غیر اختصاصی در انتقال ساکارز از داخل به خارج سلول و یا اندامک واکوئل و بالعکس نقش دارد (Aoki et al., 2007; Aoki et al., 2004) در زمان پر شدن دانه که انتقال ساکارز به دانه مهم‌ترین اتفاق سلولی است افزایش بیان آن در بذر احتمالاً با مرحله

بررسی بیان ژن *sut1* مربوط به پروتئین ساکارز ترانسپرت: بر اساس نتایج به دست آمده میزان بیان این ژن در ساقه در روز ۲۱ پس از گلدهی در هیچ یک از دو رقم قدس و بم تغییر معنی‌داری نداشت. بر اساس مطالعات انجام شده بر روی بیان این ژن در ساقه برنج طی دوره رشد رویشی، حداکثر بیان این ژن در اندام‌های رویشی ۴ روز قبل از خروج خوشه در اندام‌های منبع (برگ و ساقه) گزارش شده است (Furbank et al., 2001). ولی در مورد چگونگی تغییرات بیان این ژن در ساقه گندم طی رشد زایشی مطالعه‌ای انجام نشده و احتمال دارد تغییرات بیان این ژن قبل از دوره رشد سریع دانه انجام شده باشد. درعین حال به نظر می‌رسد به دلیل نقش کلیدی

(Paknejad *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد افزایش بیان *sut1* در هر دو رقم مورد بررسی تحت تنش شوری می‌تواند در این راستا نقش موثری ایفا کند. افزایش بیان این ژن در بذر تحت شرایط تنش با مقدار ساکارز ساقه همبستگی منفی داشت (۰/۸۵، $p < 0/05$). بیان بالاتر این ژن در رقم بم در هر دو تیمار شاهد و تنش حاکی از توانمندی ذاتی این رقم در انتقال سریع‌تر ساکارز به آندوسپرم دانه‌های در حال تشکیل در مقایسه با رقم قدس می‌باشد.

رشد سریع دانه ارتباط داشته باشد. ژن *sut1* به میزان بالایی در بذر در غشای پلاسمایی لایه آلورون که اندوسپرم را احاطه کرده بیان شده و منجر به انتقال آسیمیلات‌ها به دانه‌های در حال پر شدن می‌گردد و بر اساس تحقیقات انجام شده حداکثر بیان آن در دانه برنج ۱۶ تا ۲۰ روز پس از گلدهی گزارش شده است (Furbank *et al.*, 2001). تحت شرایط تنش افزایش سرعت پر شدن دانه به عنوان یک سازوکار دفاعی برای تولید هر چه سریع‌تر دانه اتفاق می‌افتد



شکل ۵- مقایسه میانگین بیان ژن *sut1* بذر نسبت به شاهد رقم متحمل بم در روز ۲۱ پس از گلدهی با استفاده از آزمون LSD.

Figure 5- Mean comparison of seed *sut1* expression relative to normal level of Bam at 21 days after anthesis using LSD test.

که در تجزیه فروکتان ساقه دخالت دارند باعث شد تا طی شوری ذخایر فروکتان موجود در ساقه در مرحله پر شدن و رشد سریع دانه‌ها مورد استفاده گیاه قرار گیرد. به نظر می‌رسد تغییر الگوی بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم فروکتان و

نتیجه‌گیری کلی بر اساس آزمایشات انجام شده رقم متحمل بم توانایی بالایی در تغییر الگوی بیان ژن‌های بیوسنتز کننده و تجزیه کننده فروکتان ساقه تحت تنش شوری دارد. افزایش بیان ژن‌های *I-feh* و

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر خود را از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به دلیل فراهم آوردن امکانات مالی و اجرایی این پروژه (شماره مصوب: ۷-۰۵-۰۵-۹۰۱۱۸) ابراز می‌دارند.

در نتیجه انتقال مجدد بالای این ذخایر تحت تنش

شوری یکی از علل موفقیت بوم به عنوان رقم متحمل به شوری باشد.

منابع

- Aoki N, Scofield GN, Hirose T, Furbank RT (2007). Involvement of the sucrose transporter, OsSUT1, in the long-distance pathway for assimilate transport in rice. *Journal of Experimental Botany* 58: 3155-3169.
- Aoki N, Scofield GN, Wang XD, Patrick JW, Offler CE, Furbank RT (2004). Expression and localisation analysis of the wheat sucrose transporter TaSUT1 in vegetative tissues. *Planta* 219: 176-184.
- Blum A (1998). Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica* 100: 77-83.
- Bates LS, Waldern RP, Teare I D (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-208.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanat phenol- chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Dhanda SS, and Sethi GS (1998). Inheritance of excised-leaf water loss and relative water content in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Euphytica* 104: 39-47.
- Ehdaie B, Alloush GA, Madore MA, Waines JG (2006). Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: I. Postanthesis changes in internode dry matter. *Crop Science* 46: 735-746.
- Furbank RT, Scofield GN, Hirose T, Wang XD, Patrick JW, Offler CE (2001). Cellular OsSUT1 in developing rice grains. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 1187-1196.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu K, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-99.
- Hisano H, Kanazawa A, Kawakami A, Yoshida M, Shimamoto Y, Yamada T (2004). Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Science* 167: 861-868.
- Huang LF, Bock P, Davis JM, Koch KE (2007). Regulation of invertase: a 'suite' of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Functional Plant Biology* 34: 499-507.
- Jenks MA, Hasegawa PM, and Jain SM (2007). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer. The Netherlands.
- Jin Y, Ni DA, and Ruan YL (2009). Posttranslational Elevation of Cell Wall Invertase Activity by Silencing Its Inhibitor in Tomato Delays Leaf Senescence and Increases Seed Weight and Fruit Hexose Level. *Plant Cell* 21: 2072-2089.

- Joudi M, (2009). Study on reservation capacity and carbohydrate remobilization in Iranian wheat varieties. Ph.D. Thesis. Agronomy and plant breeding department. Tehran university. Tehran. Iran (In Farsi).
- Joudi M, Ahmadi A, Mohamadi V, Abbasi A, Vergauwen R, Mohammadi H, Van den Ende W (2012). Comparison of fructan dynamics in two wheat cultivars with different capacities of accumulation and remobilization under drought stress. *Physiologia Plantarum* 144: 1-12.
- Karim MA, Nawata E, Shigenaga S (1993). Effect of salinity and temperature on yield, mineral ion concentrations and physiology in hexaploid triticale (X *Triticosecale* Wittmack). *Japanese Journal of Crop Science* 62: 419-428.
- Kawakami A, Yoshida M (2005). Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta* 223: 90-104.
- Kerepesi I, Galiba G (2000). Osmotic and Salt Stress-Induced Alteration in Soluble Carbohydrate Content in Wheat Seedlings. *Crop Science* 40: 482-487.
- Kim JY, Mahe A, Brangeon J, Prioul JL (2000). A Maize Vacuolar Invertase, IVR2, Is Induced by Water Stress. Organ/Tissue Specificity and Diurnal Modulation of Expression. *Plant physiology* 124: 71-84.
- Koch KE (1996). Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540.
- Paknejad F, Magidi A, Noormogammadi GH, Seadat A, Vazan S (2007) Evaluation of drought stress on effective traits at accumulative assimilate of grain in different cultivars of wheat. *Journal of agricultural sciences* 13: 137-149 (In Farsi).
- Paolacci AR, Tanzarella A, Porceddu E, Ciaffi M (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology* 10: 1-27.
- Pfaffi MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002). A proteomics approach to analyzing drought- and salt- responsiveness in rice. *Field Crops Research* 76: 199-219.
- Shiratake K (2007). Genetics of sucrose transporter in plants. *Genes, genomes and genomics* 1: 73-80.
- Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Van Riet L, Van Laere A, Yoshida M, Kawakami A (2003). Fructan 1-exohydrolases. beta-(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant physiology*. 131: 621-631.
- Wardlaw AF, Willenbrin kJ (2000). Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytologist* 148: 413-422.
- Xue GP, McIntyre CL, Jenkins CL, Glassop D, Herwaarden AF, Shorter R (2008). Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat. *Plant Physiology* 146: 441-454.
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L (2004). Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220: 331-343.
- Zhang J, Dell B, Conocono E, Waters I, Setter T, Appels R (2009). Water deficits in wheat: fructan exohydrolase (1-FEH) mRNA expression and relationship to soluble carbohydrate concentrations in two varieties. *New Phytologist* 181: 843-850.

Expression analysis of the key genes of fructan remobilization and some physiological traits in wheat under terminal salinity

Sharbatkhari M.¹, Shobbar Z.S.*², Galeshi S.³, Soltani A.⁴, Nakhoda B.⁵

¹ PhD Student, Agronomy Dept., Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

^{2,5} Assistant Professor, Molecular Physiology Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.

^{3,4} Professor, Agronomy Dept., Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Abstract

Remobilization of water soluble carbohydrates of wheat stem especially fructan play an important role in grain filling and yield production under stress. To study the effect of salt stress on the key genes involved in this mechanism, *1-sst* and *6-sft* genes contributed in fructan biosynthesis, *1-feh* and *ivr* genes involved in degradation of fructan and sucrose, respectively, and *sut1* as a sucrose transporter gene were examined in Bam as salt-tolerant and Ghods as salt-sensitive varieties using Real-Time PCR. Salt stress was applied since anthesis by irrigation water with EC of 15dSm⁻¹. The experiment was done in greenhouse with three replicates using completely randomized design with factorial arrangement. Sampling was done for stem fructan content at five points with 7-day intervals during seed-filling period and for measurement of prolin and relative water content (RWC) from leaf and gene analysis from stem and seed at day 21 after anthesis. Fructan remobilization was estimated by subtraction of maximum and minimum of fructan content. Results showed that salt stress had a significant influence on RWC and prolin content and induced fructan remobilization along with the stem *1-sst*, *1-feh* and *ivr* genes as well as seed *sut1* gene in Bam. There was a significant positive correlation between the *1-feh* and *ivr* expression and fructan remobilization under salinity. Based on the obtained results, Bam had higher capacity to hydrolase and remobilize fructan by up-regulation of the critical genes during seed filling, so it was more efficient to use stem reserve carbohydrates and produced higher grain yield under salt stress.

Keywords: terminal salinity, fructan remobilization, gene expression.

* Corresponding Author: Shobbar Z.S.

Tel: 026- 32703536

E-mail: shobbar@abrii.ac.ir