فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ دوم/ پاییز و زمستان ۹۷
DOI: 10.22084/ab.2018.14152.1354

اثر مصرف کود فسفر و نیتروژن بر بیان ژن‌های *Ta-PHR1* و *Ta-PHO2*، عملکرد دانه و صفات وابسته در گندم نان

The Effect of Nitrogen and Phosphor Fertilizer Usage on *Ta-PHR1, Ta-PHO2* Gene Expression, Yield and Related Traits in Bread Wheat

سعید نواب‌پور[۱*]، آمنه قاسمی مصرمی[۲] و ابوالفضل مازندرانی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۹

چکیده

فسفر یکی از مهم‌ترین عناصر مورد نیاز گیاهان می‌باشد و نقش آن در فرایند تولید و انتقال انرژی است، درنتیجه حفظ و نگهداری فسفر و پاسخ به کمبود مقدار آن در گیاه به‌منظور حفظ و افزایش عملکرد ضروری می‌باشد. به‌منظور بررسی تأثیر مصرف کود فسفر و نیتروژن بر بیان ژن‌های *Ta-PHR1* و *Ta-PHO2* و افزایش عملکرد دانه در برخی از ژنوتیپ‌های گندم، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل- اسپلیت پلات در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل دو سطح کود نیتروژن شاهد (۰) و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار و دو سطح کود فسفر شاهد (۰) و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار به‌عنوان عامل اصلی و چهار ژنوتیپ گندم (رقم مروارید و لاین‌های امید بخش N80-19، T-67-60 و T-65-7-1) به‌عنوان عامل فرعی بودند. به‌منظور اندازه‌گیری عملکرد دانه و اجزای آن در مرحله رسیدگی نمونه‌برداری صورت گرفت و برای ارزیابی میزان بیان ژن‌های موردمطالعه نمونه‌برداری در مرحله پرشدن دانه‌ها صورت گرفت. نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان عملکرد دانه در شرایط مصرف توأم کود نیتروژن و فسفر حاصل گردید و سایر اجزای عملکرد (فاصله میان‌گره، طول سنبله، طول ساقه، تعداد پنجه بارور، تعداد کل پنجه، تعداد دانه، قطر دانه، طول دانه، وزن هزاردانه) نیز در این تیمار بالاترین مقدار را داشتند. هم‌چنین در بین ژنوتیپ‌ها رقم مروارید و لاین N80-19 عملکرد بهتری در هر دو شرایط مصرف و عدم‌مصرف کود داشتند. بیش‌ترین بیان ژن *Ta-PHR1* در رقم مروارید و لاین T-65-7-1 بود. هم‌چنین مصرف کود فسفر و نیتروژن بر روی تمام صفات مورد بررسی به جز قطر دانه تأثیر مثبت و معنی‌داری داشت.

واژه‌های کلیدی: اجزای عملکرد، بیان ژن، پرشدن دانه، تیمار کودی

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشیار و دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
*: نویسنده مسوول Email: s.navabpour@yahoo.com

مقدمه

با افزایش روزافزون جمعیت، تأمین غذا یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش‌رو است *خان* و همکاران (Khan *et al.*, 2009). گندم (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین گیاه زراعی در سطح دنیا است *فائو* (FAO, 2006). فسفر یکی از عناصرضروری است که نقش مهمی را در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و سیستم انتقال انرژی در گیاهان دارد. فسفر و فسفو لیپیدها جزیی از ساختمان ATP، RNA و DNA می‌باشد و کمبود آن می‌تواند منجر به کاهش سطح بسیاری از فرایندهای متابولیک مانند تقسیم و توسعه سلولی، تنفس و فتوسنتز شود. *سیمز و شارپلی* (Sims and Sharpley, 2005). فسفر پس از نیتروژن مهم‌ترین عنصر مورد نیاز گیاهان و ریزجانداران می‌باشد و مهم‌ترین نقش آن در فرایند تولید و انتقال انرژی است. شکل‌های مختلف فسفر مقدار ماده آلی خاک، نوع و pH در خاک به‌وسیله ویژگی‌هایی از قبیل سطح ذرات خاک کنترل می‌شود. فسفر مورد یاز گیاه عموماً از طریق استفاده از کودهای شیمیایی تأمین می‌شود. با این وجود مقدار زیادی از فسفر موجود در کودهای شیمیایی بعد از ورود به خاک نامحلول شده و در خاک‌های آهکی به ترکیبات نامحلول کلسیم‌دار و منیزیم‌دار تبدیل و از دسترس گیاه خارج می‌شود *ویگر* و همکاران (Wagar *et al.*, 2004). بهبود کارآیی استفاده از فسفر با کشت گیاهان تراریخت در برخی از گیاهان زراعی گزارش شده است *راماکرز* و همکاران؛ *تیان* و همکاران (Ramaekers *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2012). تفاوت‌های ژنتیکی در کارآیی استفاده از فسفر میان گونه‌های مختلف گیاهان و حتی ژنوتیپ‌های متفاوت در یک گونه به‌خوبی مشخص شده است و نشان می‌دهد تولید گیاهان تراریخته به شکل کارآمدی استفاده از فسفر را بهبود بخشید. روش‌های انتخاب مرسوم، به شکل موفقیت‌آمیزی در کارآیی استفاده از فسفر مورداستفاده قرار گرفته است. برای مثال، برنامه گندم سیمیت (مرکز بهبود وضعیت ذرت و گندم به صورت بین‌المللی، CIMMYT) ژنوتیپ گندمی را معرفی نموده که می‌تواند فسفر را در شرایط فسفر محدود به شکل کارآمد جذب نماید و هم‌چنین به کاربرد فسفر پاسخ گوید *مانسک* و همکاران (Manske *et al.*, 2000). از آنجاکه ریشه جهت پاسخ به جذب فسفر، قابلیت جابه‌جایی محدود و تثبیت بالایی در خاک دارد. *شاتمن* و *شین* (Schachtman and Shin, 2007)، انتخاب ویژگی‌های ریشه و افزایش سطح تماس خاک-ریشه و افزایش قابلیت جابه‌جایی به‌منظور استفاده از فسفر قابل دسترس اهمیت زیادی در بهبود کارآیی کاربرد فسفر دارد (*مانسک* و همکاران، 2000). بر این اساس انتخاب ژنوتیپ‌های واجد کارآیی جذب فسفر بیش‌تر حائز اهمیت زیادی است. نتایج برخی تحقیقات نشان‌دهنده بهبود کارآیی جذب فسفر، از طریق درک و شناخت شبکه سیگنال‌دهی و ارزیابی بیان ژن‌های درگیر در تثبیت و انتقال فسفر است *لیانگ* و همکاران؛ *رن* و همکاران (Liang *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2012). در شبکه سیگنال‌دهی در تشخیص فسفر قابل دسترس، فاکتور رونویسی *PHR* نقش اصلی را بازی می‌کند *شیو و لین* (Chiou and Lin, 2011). نتایج پژوهش *وانگ* و همکاران (Wang *et al.*, 2013) نشان داد، ژن *Ta-PHR1* به‌عنوان یک فاکتور رونویسی، عامل تنظیم ژن‌های القایی در گرسنگی فسفر می‌باشد. بیان بالای *Ta-PHR1* در گندم افزایش بیان *Ta-PHT1.2* و سایر ژن‌های القایی در گرسنگی فسفر شامل *Ta-IPS1.1* و *Ta-PHT1.6* را سبب شده که تأییدی بر نقش *Ta-PHR1* در سیگنال‌دهی فسفر در گندم است. در برخی منابع گزارش شده است که بیان بیش از حد *PHR1* و همولوگ‌های آن در برنج و کلزا موجب محدود شدن رشد گردید که این تضعیف رشد ناشی از تجمع فسفر در لاین‌های تراریخته می‌باشد *زو* و همکاران؛ *رن* و همکاران (Zhou *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2012). نقش حیاتی ژن *PHO2* در تنظیم سیگنال‌دهی فسفر به‌صورت دقیق در آرابیدوپسیس و برنج مشخص شده است و از ژن *PHO2* موجود در این گونه گیاهان دیپلوئید *هیو* و همکاران (Hu *et al.*, 2011) یک نسخه تک وجود دارد. گندم معمولی یک آلو هگزاپلوئید است که حاوی سه ژنوم همولوگ *پیترسون* و همکاران (Petersen *et al.*, 2006) می‌باشد، به‌طور نظری ممکن است سه ژن هومولوگ *PHO2* داشته باشد. در گیاهان موتانت ژن *PHO2* موجب افزایش انتقال فسفر از ریشه به ساقه و افزایش غلظت در برگ شد و هم‌چنین ثابت شده است که در سطح پس از ترجمه، تنظیم‌کننده انتقال‌دهنده‌های *PHO1* و *PHT1* می‌باشد. *هیو* و همکاران (2011) گزارش کرده‌اند، در گیاهان دیپلوئید مانند آرابیدوپسیس و برنج از دست دادن عملکرد ژن *PHO2* موجب توقف رشد گیاه می‌شود که این نتایج نشان می‌دهد ژن *PHO2* در هومئوستازی فسفر و رشد گیاه ضروری است. بر اساس آنچه ذکر گردید این مطالعه به‌منظور ارزیابی بیان ژن‌های درگیر در تثبیت و انتقال فسفر و صفات مهم زراعی تحت تأثیر رژیم کودی ازت و فسفر در ژنوتیپ‌های گندم انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۹۳-۹۲ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌صورت فاکتوریل-اسپلیت

پلات در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. فاکتور اصلی در این آزمایش شامل ترکیب فاکتوریل دو سطح کود نیتروژن صفر (۰) و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار اوره *مقدم* و همکاران (Moghaddam *et al.*, 2005) و دو سطح کود فسفر با صفر و ۱۰۰ کیلوگرم سوپر فسفات تریپل *ونگ* و همکاران (Weng *et al.*, 2013) و فاکتور فرعی شامل چهار ژنوتیپ گندم (مروارید، N80-19، T-67-60 و T-65-7-1) بود. رقم مروارید بیش‌ترین سطح کشت را در منطقه دارد و سه لاین دیگر از لاین‌های امیدبخش می‌باشند که داری عملکرد بالا بوده و نسبت به تنش‌های خشکی و شوری محتمل می باشند. یک دوم کود نیتروژن و تمام کود فسفر به‌صورت پایه بعد از دیسک اول در مزرعه توزیع و توسط دیسک دوم با خاک مخلوط گردید. بقیه کود نیتروژن در هر تیمار کودی در مرحلهٔ ساقه رفتن (یک دوم) به‌صورت سرک مصرف شد. به‌منظور تعیین میزان عملکرد دانه و اجزا ی آن، برداشت در مرحله رسیدگی نهایی و پس از حذف نیم متر از ابتدا و انتهای هر کرت از خطوط سوم و چهارم، در سطحی معادل ۱/۲ مترمربع صورت گرفت. نمونه‌برداری از برگ جهت استخراج RNA نیز در مرحله پر شدن دانه (*ونگ* و همکاران، 2013) صورت گرفت و مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ در سطوح مختلف کود برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های *Ta-PHR1* و *Ta-PHO2* تهیه گردید و در ازت مایع منجمد و تا مرحله استخراج RNA جهت نگهداری به فریزر ۸۰- منتقل گردید. این نمونه‌ها درون نیتروژن مایع کوبیده شد و از آن‌ها برای استخراج RNA استفاده گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت پی بایوزول (بیوفولکس ژاپن) صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 28S و 18S در روی ژل نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده بود. سپس سنتز cDNA با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز صورت گرفت و به‌وسیله آغازگرهای ژن خانه‌دار با استفاده از PCR، cDNA سنتز شده تست گردید. عملکرد اختصاصی آغازگرهای مورداستفاده به‌وسیله cDNAهای ساخته شده در یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول حاصل روی ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز گردید. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌های مزبور از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد استفاده شد. این دستگاه در هر چرخه از فعالیت می‌تواند مقدار محصول واکنش پلی‌مراز را نشان دهد. به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *GAPDH* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها می‌باشد استفاده شد. آغازگرهای مورد نیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر۳ و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR طراحی گردیدند. اطلاعات مربوط به آغازگرها در جدول شماره ۱ آورده شده است. در پایان واکنش و پس از دریافت نمودارها، اطلاعات به نرم‌افزار REST منتقل شده و تجزیه داده‌ها انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌های حاصل بیان ژن‌ها و داده‌های صفات مورفولوژیک به‌وسیله نرم‌افزار آماری SAS 9.1 انجام گرفت.

نتایج و بحث

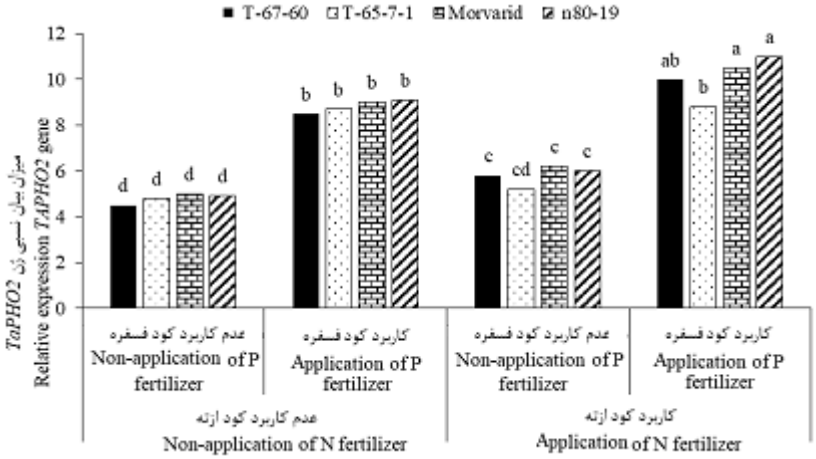
بیان ژن‌ها

نتایج بررسی میزان بیان ژن *Ta-PHO2* نشان داد که کم‌ترین میزان بیان این ژن در شرایط عدم کاربرد کود مشاهده شد و بین ژنوتیپ‌ها در شرایط بدون کود اختلاف معنی‌داری در بیان این ژن وجود نداشت (شکل ۱). بیش‌ترین مقدار بیان ژن *T-aPHO2* در شرایط کاربرد توأم کود فسفر و نیتروژن در ژنوتیپ مروارید و N80-19 مشاهده شد. یکی از راهبردهای افزایش بهره وری فسفر خاک وجود سیتم ریشه‌ای قوی و گسترده می‌باشد که نقش نیتروژن در افزایش رشد رویشی ثابت شده است (*فائو*، 2006) و علت افزایش بیان ژن *Ta-PHO2* را در شرایط کاربرد توأم نیتروژن و فسفر را می‌توان همین مسئله به‌شمار آورد. در شرایط کاربرد فسفر بدون استفاده از نیتروژن، بیان این ژن در تمام ژنوتیپ‌ها افزایش نشان داد. این نتایج با نتایج *اویانگ* و همکاران (Ouyang *et al.*, 2016) که حاکی از افزایش میزان بیان این ژن در شرایط افزایش میزان فسفر بود مطابقت داشت. آن‌ها بیان داشتند ژن *Ta-PHO2* در حفظ مقدار و پایداری فسفر در سلول نقش داشته، در شرایطی که بیان این ژن کاهش یافته و یا متوقف شود سبب کاهش و توقف رشد در گندم می‌گردد. نقش ژن *PHO2* در حفظ مقدار و پایداری فسفر در سلول در آرابیدوپسیس توسط *کیم* و همکاران (Kim *et al.*, 2011) نیز بیان شده است. تحقیقات بر روی عملکرد ژن *PHO2*، نقش این ژن را در تنظیم ژن‌های انتقال‌دهنده *PHO1* و *PHT1* در سطح پس از ترجمه به اثبات رسانده است به‌طوری‌که در موتانت‌هایی که ژن *PHO2* حذف شده بود میزان فسفر در برگ نسبت به ریشه افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت *لیو* و همکاران؛ *هوانگ* و همکاران (Liu *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013).

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

Table 1: Primers used and details

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	طول محصول واکنش (تعداد باز) Product length (bp)	دمای ذوب (سانتی‌گراد) Melting temperature (C°)	منبع یا شماره دسترسی در پایگاه NCBI Reference or Access number at NCBI database
Ta-PHO2, FOR	5′-CTCGGCGGTGATCTCATTG-3′	181	59	(Oyang *et al*., 2016)
Ta-PHO2, REV	5′-AGGCGATCCCAGCTTCGC-3′		59	
Ta-PHR1, FOR	5′-GGTCCTGCTGTGACATCTGA-3′	154	59	KC 218925
Ta-PHR1, REV	5′-AGCTGCCACGATGACTCTTT-3′		60	
GAPDH, FOR	5′-TCACCACCGACTACATGACC-3′	121	60	EF592180
GAPDH, REV	5′-ACAGCAACCTCCTTCTCACC-3′		60	



شکل ۱: اثر متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر میزان بیان ژن *Ta-PHO2* در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

Fig. 1: Interaction of phosphorus (P) and nitrogen (N) fertilizers on the expression of *Ta-PHO2* gene in studied genotypes

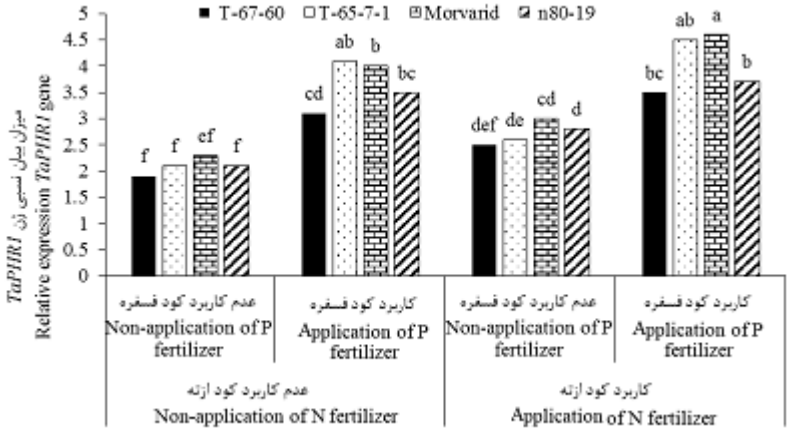
الگوی بیان ژن *Ta-PHR1* در برگ به گونه‌ای بود که در شرایط کاربرد کود فسفر عموماً نسخه‌برداری به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. چنین به نظر می‌رسد که این ژن در روند فرآیند جذب فسفر نقش دارد (شکل ۱). تحقیقات گذشته نشان داده ژن *Ta-PHR1* و همولوگ‌های آن نقش کلیدی در پاسخ به کمبود فسفر بازی می‌کنند *نیلسون* و همکاران (Nielsson *et al*., 2007). در همین راستا نتایج *وانگ* و همکاران (2013) نشان داد میزان بیان ژن *Ta-PHR1* در زمان پرشدن دانه در اندام هوایی بیش‌تر از ریشه بود و با افزایش میزان فسفر نیز هم در ریشه و هم در اندام هوایی مقدار بیان آن افزایش یافت. همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود بیش‌ترین میزان بیان این ژن در شرایط کاربرد توأم کود نیتروژن و فسفر و در رقم مروارید مشاهده گردید که این مقدار با میزان بیان این ژن در لاین T-657-1 در هردو شرایط کاربرد توأم کود نیتروژن و فسفر و کاربرد کود فسفر به‌تنهایی معنی‌دار نگردید. کم‌ترین میزان بیان این ژن مربوط به شرایط عدم کاربرد کود بود که اختلاف بین تیمارها معنی‌دار نگردید. با توجه به نقش ژن *Ta-PHR1* در سیگنال‌دهی کاهش فسفر، انتظار بر این بود در شرایط عدم کاربرد کود فسفر مقدار بیان این ژن بیش‌تر از بیان آن در شرایط کاربرد کود فسفر باشد ولی نتایج عکس این موضوع بود و با نتایج *وانگ* و همکاران (2013) نیز مطابقت داشت که دلیل این موضوع را افزایش وزن خشک ریشه بیان کردند. *گئورگ* و همکاران (Georg *et al*., 2011) گزارش کردند توسعه ریشه توانایی ریشه را در استفاده از فسفر خاک افزایش می‌دهد. از آنجایی که کاربرد کود نیتروژن موجب توسعه ریشه می‌گردد و در این آزمایش کاربرد کود نیتروژن به تنهایی و توأم با کود فسفر نیز موجب افزایش بیان ژن *Ta-PHR1* گردید می‌توان نتیجه گرفت کود نیتروژن نیز موجب استفاده بهینه از فسفر خاک می شود.

عملکرد دانه و صفات وابسته

نتایج حاصل از تجزیهٔ واریانس (جدول ۲) نشان داد اثر کود نیتروژن و فسفر به تنهایی بر روی تمام صفات اندازه‌گیری شده به جز قطر دانه درسطح احتمال یک درصد معنی‌داری شد. ولی اثر متقابل نیتروژن و فسفر به جز در رابطه با صفات فاصله میان‌گره و طول ساقه که در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار

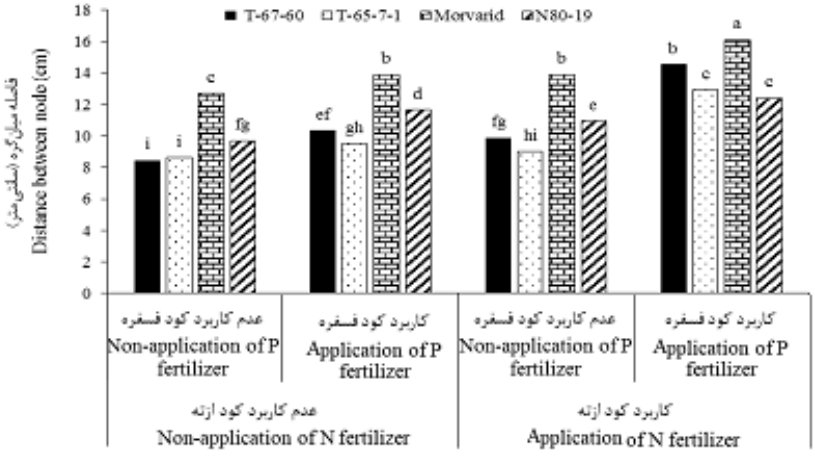
شد، برای سایر صفات معنی‌دار نگردید. اثر ژنوتیپ برای قطر دانه و طول دانه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار گردید، اما برای سایر صفات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل نیتروژن و ژنوتیپ برای صفات طول سنبله، تعداد پنجه بارور، قطر و طول دانه معنی‌دار نگردید ولی برای سایر صفات معنی‌دار شد. اثر متقابل فسفر و ژنوتیپ برای صفات طول سنبله، قطر دانه، طول دانه و عملکرد دانه غیرمعنی‌دار و برای سایر صفات در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار گردید. همان‌طورکه در جدول ۲ نیز مشاهده می‌شود اثر متقابل سه جانبه نیتروژن، فسفر و ژنوتیپ برای صفات طول سنبله، تعداد پنجه بارور، تعداد کل پنجه، قطر دانه و طول دانه غیرمعنی‌دار و برای سایر صفات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید.

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمار کودی (نیتروژن-فسفر) بر فاصله میان‌گره (شکل ۳) نشان داد در تمامی ژنوتیپ‌ها با کاربرد کود (فسفر یا نیتروژن و یا کاربرد توأم آن‌ها) فاصله میان‌گره افزایش یافت و در تیمار کاربرد کود فسفر به‌تنهایی این افزایش بیش‌تر از کاربرد کود نیتروژن به تنهایی بود. با این وجود کاربرد توأم کود فسفر و نیتروژن بیش‌ترین تأثیر را در افزایش میزان فاصله میان‌گره داشت. در تمامی تیمارها بیش‌ترین فاصله میان‌گره مربوط به رقم مروارید بود و اختلاف معنی‌داری با سایر ژنوتیپ‌ها داشت. بیش‌ترین مقدار افزایش فاصله میان‌گره مربوط به لاین T-67-60 بود که در شرایط کاربرد توأم کود فسفر و نیتروژن مشاهده شد که ۴/۵ سانتی‌متر نسبت به کاربرد کود فسفر به تنهایی افزایش یافت.



شکل ۲: اثر متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر میزان بیان ژن *Ta-PHR1* در ژنوتیپ‌های موردمطالعه

Fig. 2: Interaction of phosphorus (P) and nitrogen (N) fertilizers on the expression of *Ta-PHR1* gene in studied genotypes



شکل ۳: مقایسه میانگین‌های سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر فاصله میان‌گره

Fig. 3: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on distance between node

جدول ۲: تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف فسفر و نیتروژن بر صفات موردبررسی در ژنوتیپ‌ها گندم موردمطالعه

Table 2: Variance analysis of different phosphorus and nitrogen levels on wheat genotypes traits

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات Traits Mean square									
		فاصله میان‌گره Distance between node	طول سنبله Spike length	طول ساقه Shoot length	تعداد پنجه بارور Fertile tiller number	تعداد کل پنجه Total tiller number	تعداد دانه Seed number	قطر دانه Seed diameter	طول دانه Seed length	وزن هزاردانه 1000 seed weight	عملکرد دانه Seed yield
بلوک Block	2	0.16^{ns}	0.07^{ns}	0.98^{ns}	3.08^{ns}	1.02^{ns}	4.52^{ns}	0.058^{ns}	0.011^{ns}	2.58^{ns}	38.14^{ns}
نیتروژن Nitrogen	1	42.7^{**}	46.0^{**}	123^{**}	58.5^{**}	56.3^{**}	243^{**}	0.200^{ns}	1.435^{**}	168^{**}	255208^{**}
فسفر Phosphorus	1	64.6^{**}	117^{**}	282^{**}	196^{**}	108^{**}	884^{**}	0.110^{ns}	1.050^{**}	456^{**}	366101^{**}
نیتروژن × فسفر Nitrogen × phosphorus	1	8.58^{**}	4.20^{ns}	30.0^{**}	1.68^{ns}	0.07^{ns}	14.0^{ns}	0.130^{ns}	0.0002^{ns}	1.33^{ns}	225^{ns}
خطا Error	6	0.25	0.80	0.61	2.13	0.74	3.07	0.055	0.693	1.30	241
ژنوتیپ Genotype	3	39.3^{**}	8.86^{**}	9.53^{**}	12.2^{**}	4.02^{**}	79.0^{**}	0.076^{*}	0.254^{*}	11.1^{**}	4758^{**}
نیتروژن × ژنوتیپ Nitrogen × genotype	3	1.43^{**}	0.76^{ns}	6.54^{**}	0.85^{ns}	1.94^{**}	14.8^{**}	0.032^{ns}	0.054^{ns}	3.63^{*}	2769^{**}
فسفر × ژنوتیپ Phosphorus × genotype	3	1.49^{**}	0.68^{ns}	12.9^{**}	2.46^{**}	2.05^{**}	13.0^{**}	0.002^{ns}	0.052^{ns}	10.3^{**}	285^{ns}
نیتروژن × فسفر× ژنوتیپ Nitrogen × phosphorus × genotype	3	1.65^{**}	0.08^{ns}	5.84^{**}	0.35^{ns}	0.91^{ns}	11.5^{**}	0.003^{ns}	0.025^{ns}	7.55^{**}	4751^{**}
خطا Error	24	0.18	0.78	0.55	1.37	0.34	2.35	0.023	0.0683	0.93	69.5
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	3.7	10.1	2.2	13.7	5.4	2.9	5.2	3.6	2.4	2.6

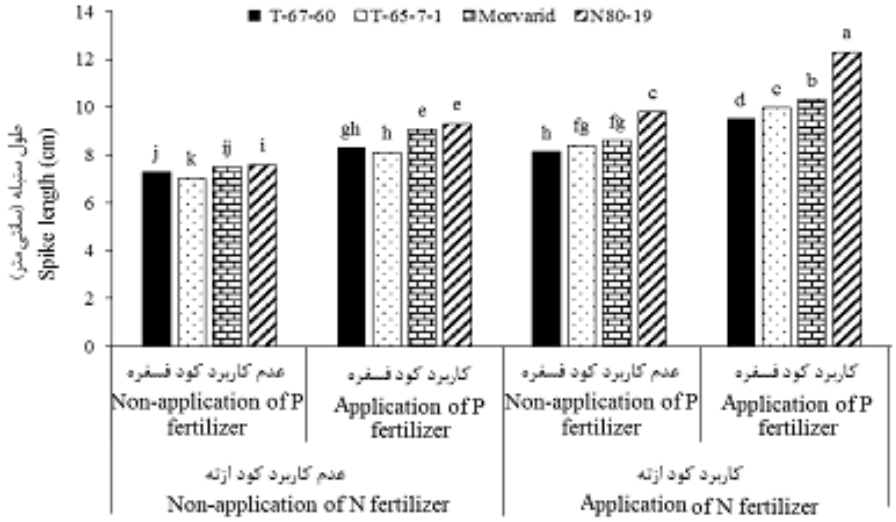
ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

ns, * and **: Non-significant, significant at 5% and 1% critical levels, respectively

به‌طور معمول، ارتفاع بوته با کاربرد کود نیتروژن افزایش می‌یابد که این امر ممکن است به دلیل افزایش شاخ و برگ و طول میان‌گره در گیاه باشد (مقدم و همکاران، 2005). نتایج یک پژوهش مزرعه‌ای نشان داد که مصرف ۱۲۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن نسبت به تیمار شاهد ارتفاع گیاه تریتیکاله را ۲۵ درصد افزایش داد. *باسبگ* و همکاران (Basbag *et al.*, 2006).

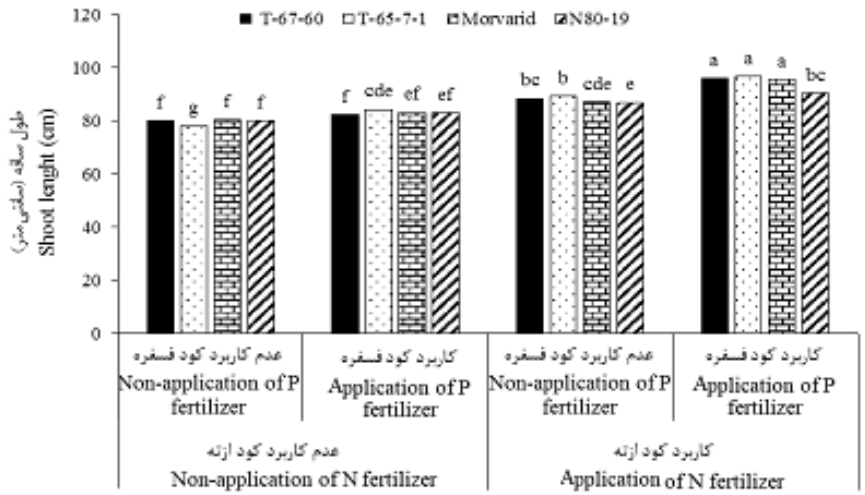
مقایسه میانگین اثر تیمار کودی (نیتروژن-فسفر) بر طول سنبله (شکل ۴) نشان داد بیش‌ترین طول سنبله مربوط به لاین N80-19 بود که به جز در تیمار عدم کاربرد کود و کاربرد کود فسفر که اختلاف آن با رقم مروارید معنی‌دار نشد در دو شرایط تیماری دیگر اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود. در شرایط عدم‌کاربرد کود کم‌ترین مقدار طول سنبله ۷/۰۳ سانتی‌متر بود که در لاین T-65-7-1 مشاهده گردید.در شرایط کاربرد توأم نیتروژن و فسفر بیش‌ترین مقدار طول سنبله ۱۲/۳ سانتی‌متر بود که در لاین N80-19 مشاهده شد و در تمامی ژنوتیپ‌ها در این شرایط طول سنبله افزایش یافت. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها در شرایط کاربرد کود فسفر و نیتروژن به‌تنهایی نشان داد به جز لاین N80-19 که در شرایط کاربرد کود نیتروژن طول سنبله بیش‌تر از شرایط کاربرد کود فسفر بود برای سایر ژنوتیپ‌ها عکس این مسئله صدق می‌کرد.

مقایسه میانگین اثر تیمار کودی (نیتروژن-فسفر) بر طول ساقه نشان داد، کاربرد کود فسفر فقط برای لاین T-65-7-1 باعث افزایش معنی‌دار طول ساقه نسبت به شرایط عدم کاربرد کود گردید (شکل ۵). کاربرد کود نیتروژن منجر به افزایش طول ساقه بیش‌تری شد که با تیمار عدم کاربرد کود و کاربرد کود فسفر به تنهایی برتری معنی‌داری داشت. کاربرد توأم نیتروژن و فسفر بیش‌ترین تأثیر را بر روی افزایش طول ساقه داشت. در این شرایط لاین T-65-7-1 با میانگین طول ساقه ۳۹/۷ سانتی‌متر بیش‌ترین مقدار طول ساقه را داشت که اختلاف آن با رقم مروارید و لاین T-67-60 معنی‌دار نگردید.



شکل ۴: مقایسه میانگین ها سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر طول سنبله

Fig 4: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on spike length



شکل ۵: مقایسه میانگین‌های سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر طول ساقه

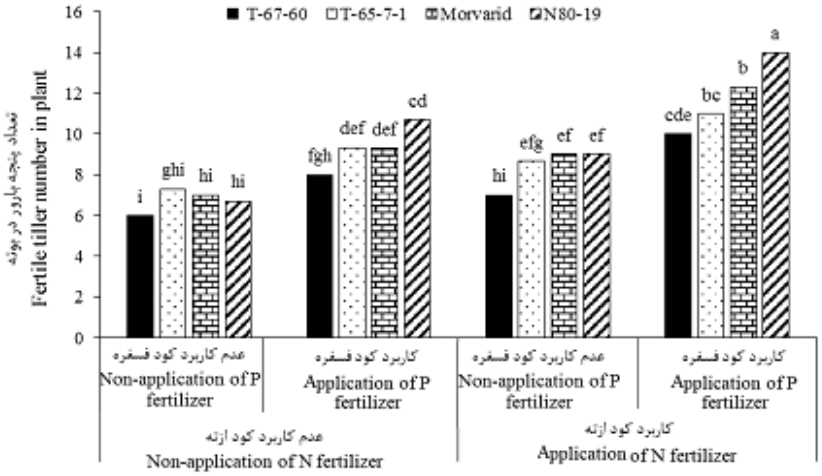
Fig. 5: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on stem length

نتایج مقایسه میانگین تعداد پنجه بارور و کل پنجه (شکل‌های ۶ و ۷) روند معکوسی را در شرایط تیمار کود نیتروژن و فسفر به تنهایی نشان داد. لاین N80-19 در شرایط کاربرد توأم کود فسفر و نیتروژن بیش‌ترین تعداد پنجه بارور (۱۴ عدد) و تعداد کل پنجه (۱۵/۳ عدد) را داشت که اختلاف آن با سایر ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود. در شرایط عدم کاربرد کود هر دو صفت تعداد پنجه بارور و تعداد کل پنجه کم‌ترین مقدار را داشتند و اختلاف بین ژنوتیپ‌ها معنی‌دار نبود. با کاربرد فسفر به‌تنهایی تعداد پنجه بارور بیش‌تر از کاربرد نیتروژن به‌تنهایی بود. درحالی‌که برای صفت تعداد کل پنجه در بوته با کاربرد نیتروژن به‌تنهایی تعداد پنجه بیش‌تری مشاهده گردید. این موضوع مبین تأثیر مثبت فسفر در افزایش تعداد پنجه‌های بارور است.

نتایج مقایسه میانگین اثر مصرف کود بر روی صفت تعداد دانه (شکل ۸) نیز با افزایش سطوح کوددهی افزایش یافت به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار در زمانی که هر دو کود استفاده شد و کم‌ترین میزان در عدم استفاده از کودها مشاهده گردید (شکل ۸). در شرایط استفاده توأم کود نیتروژن و فسفر اختلاف بین لاین‌های T-67-60، T-65-7-1 و رقم مروارید معنی‌دار نبود ولی اختلاف آن‌ها با لاین N80-19 که تعداد دانه کم‌تری داشت معنی‌دار گردید. در سایر شرایط تیماری کم‌ترین تعداد دانه در بوته مربوط به لاین T-67-60 بود، که به‌جز در شرایط عدم استفاده از کود که اختلاف آن با رقم مروارید معنی‌دار نگردید در دو تیمار دیگر اختلاف آن با سایر ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود. مصرف صحیح و متناسب کودهای نیتروژن، عملکرد دانه گندم را به‌طور عمده از طریق افزایش تعداد سنبله در واحد سطح بالا می‌برد و افزایش تعداد دانه در سنبله نقش کم‌تری در بالا بردن عملکرد دانه دارد. *جیووانی* و همکاران؛ *فولر* و *برایان* (Giovanni *et al.*, 2004; Fowler and Brydon, 2001).

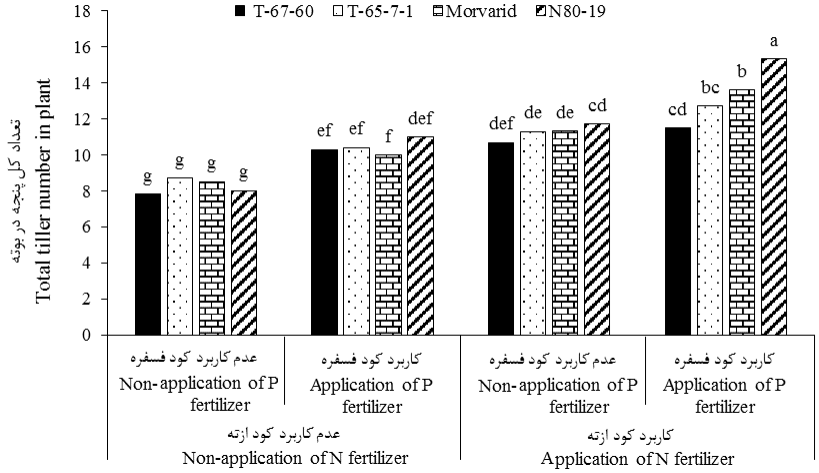
نتایج مقایسه میانگین (شکل‌های ۹ و ۱۰) نشان داد با افزایش سطوح کود قطر دانه و طول دانه نیز افزایش یافت. به‌طوری‌که کم‌ترین قطر دانه و طول دانه مربوط به عدم استفاده از کود و بیش‌ترین قطر دانه و طول دانه مربوط به استفاده توأم تیمار کودی بود. واکنش ژنوتیپ‌های مختلف به افزایش سطح کود فسفر و نیتروژن متفاوت بود، به‌طوری‌که قطر دانه در لاین T-67-60 و طول دانه در لاین T-65-7-1 بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها تحت تأثیر کوددهی بود (شکل‌های ۹ و ۱۰). طول و قطر دانه رقم مروارید و لاین N80-19 کم‌تر تحت تأثیر مصرف کود قرار گرفت و اختلاف این صفات در شرایط تیماری مختلف معنی‌دار نشد.

نتایج مقایسه میانگین تیمار کودی برای صفت وزن هزاردانه (شکل ۱۱) نشان داد بیش‌ترین وزن هزاردانه مربوط به مصرف هم‌زمان کود نیتروژن و فسفر بود. کم‌ترین میزان وزن هزاردانه در تیمار عدم استفاده از فسفر و نیتروژن مشاهده شد اما اختلاف بین ژنوتیپ‌ها در این شرایط معنی‌دار نبود. بین ژنوتیپ‌ها در پاسخ به کاربرد توأم کود نیتروژن و فسفر تفاوت معنی‌داری وجود داشت به‌طوری‌که لاین N80-19 بیش‌ترین میزان و T-67-60 کم‌ترین مقدار وزن هزاردانه را نشان دادند. *کلیم* و همکاران (Kaleem *et al.*, 2009) طی پژوهشی گزارش کردند با افزایش میزان کود فسفر وزن هزاردانه افزایش معنی‌داری یافت.



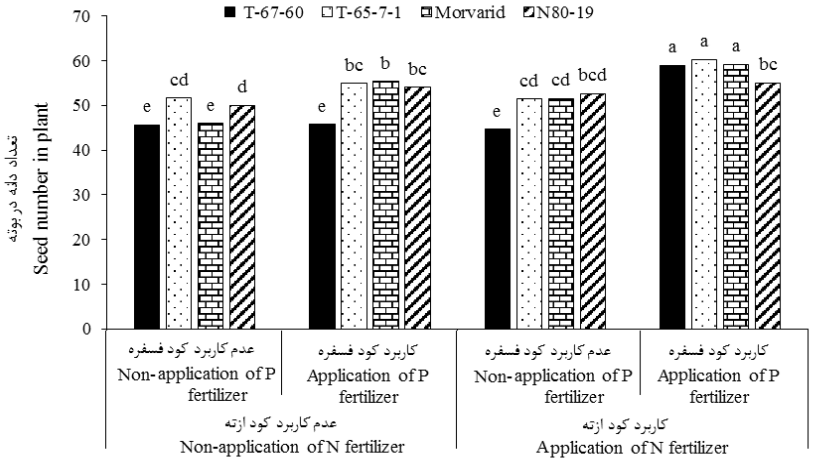
شکل ۶: مقایسه میانگین‌های سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر تعداد پنجه بارور در بوته

Fig. 6: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on fertile tiller number in plant



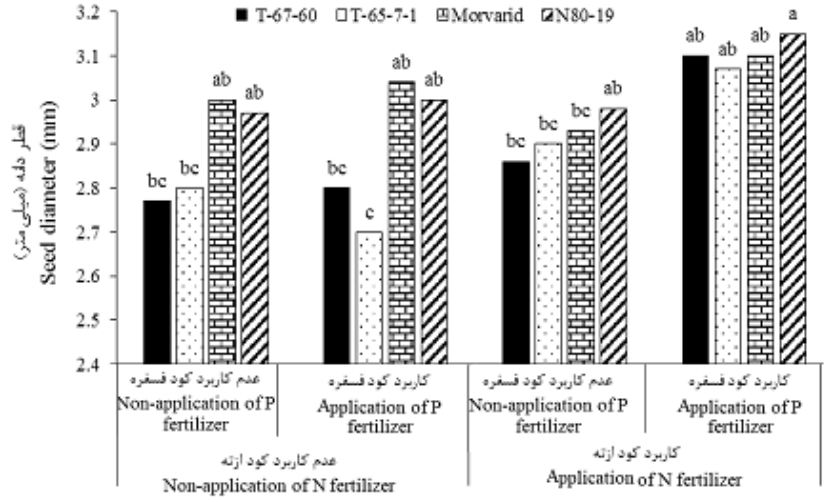
شکل ۷: مقایسه میانگین‌های سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر تعداد کل پنجه در بوته

Fig. 7: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on total tiller number in plant



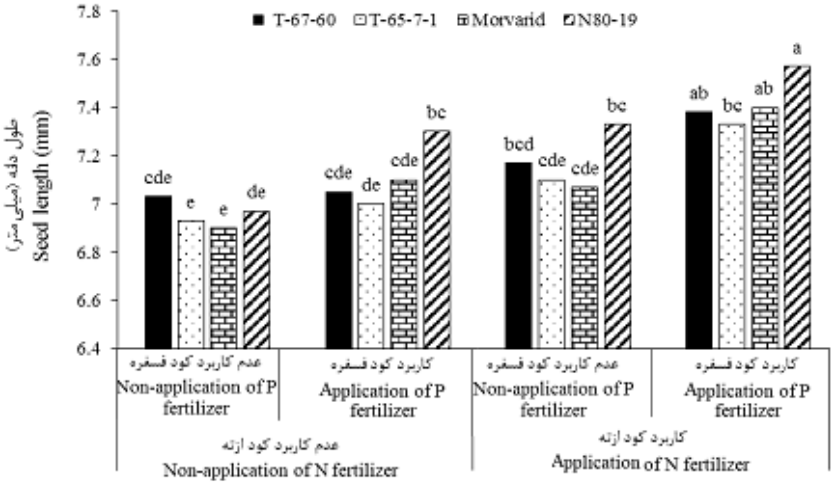
شکل ۸: مقایسه میانگین‌های سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر تعداد دانه بوته

Fig. 8: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on seed number in plant



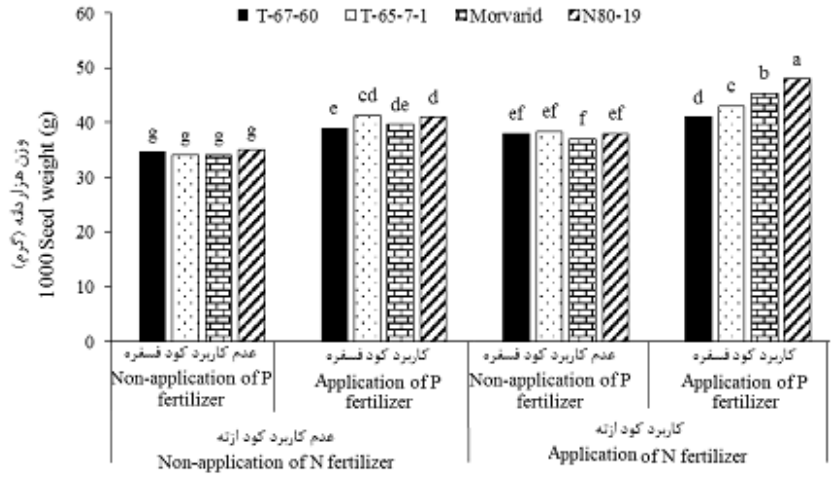
شکل ۹: مقایسه میانگین‌های سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر قطر دانه

Fig. 9: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on seed diameter



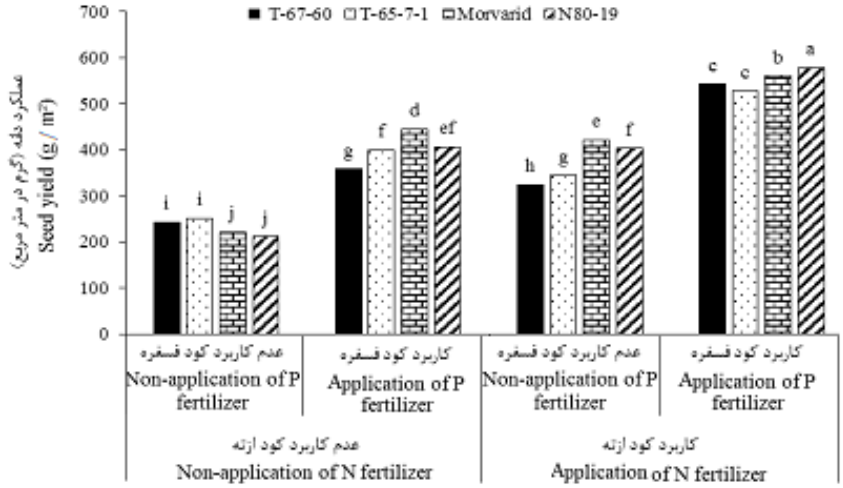
شکل ۱۰: مقایسه میانگین‌های سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر طول دانه

Fig. 10: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on seed length



شکل ۱۱: مقایسه میانگین‌های سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر وزن هزاردانه

Fig. 11: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on 1000 seed weight



شکل ۱۲: مقایسه میانگین‌های سطوح اثرات متقابل کودهای فسفره و نیتروژن بر عملکرد دانه

Fig. 12: Means comparison of interaction between different levels of phosphorus (P) and nitrogen (N) on seed yield

نتایج مقایسه میانگین عملکرد دانه (شکل ۱۲) نشان داد بیش‌ترین عملکرد دانه در ژنوتیپ‌ها مربوط به شرایط تیماری کاربرد توأم نیتروژن و فسفر بود. لاین N80-19 بالاترین عملکرد دانه را نشان داد و اختلاف آن با سایر ژنوتیپ‌ها نیز معنی‌دار گردید. این در شرایطی بود که در تیمار کاربرد نیترژن و فسفر به‌تنهایی رقم مروارید بالاترین عملکرد دانه را داشت و اختلاف آن با سایر ژنوتیپ‌ها معنی‌دار شد.

نتایج تحقیقات *عالم* و همکاران (Alam *et al.*, 2002) در بررسی پاسخ سه واریته گندم به مصرف فسفر و نیز روش مصرف آن، در خاکی با میزان فسفر قابل استفاده ۳/۹ میلی‌گرم در کیلوگرم، نشان داد که مصرف فسفر منجر به افزایش معنی‌دار عملکرد دانه و کاه نسبت به تیمار شاهد بدون مصرف فسفر شده است. نتایج *مانسک* و همکاران (Manske *et al.*, 2001) حاکی از آن است که مصرف ۳۵ کیلوگرم کود فسفر در هکتار نسبت به تیمار شاهد (بدون مصرف فسفر) در یک خاک آهکی عملکرد دانه را بیش از یک تن در هکتار افزایش داد. *نمیکسین* و همکاران (Nemeikšienė *et al.*, 2011) نتیجه گرفتند که به ازای هر یک کیلوگرم افزایش نیتروژن خاک در اثر مصرف کود سبز لگوم، میزان عملکرد دانه گندم ۱۰ کیلوگرم در هکتار افزایش یافت.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی بیان ژن‌های *Ta-PHO2* و *Ta-PHR1* نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها با استفاده توأم کود فسفر و نیتروژن و کاربرد فسفر به‌تنهایی افزایش بیان داشتند. با توجه به این‌که کاربرد نیتروژن موجب گسترش و توسعه ریشه می‌گردد این افزایش بیان را می‌توان به دلیل افزایش توانایی ریشه در دریافت فسفر خاک دانست که به موجب آن سبب افزایش بیان ژن‌ها شده است. براساس نقش این ژن‌ها در انتقال و کاربرد فسفر در گیاه و با توجه به نقش فسفر در فرآیندهای حیاتی گیاه مانند فرآیندهای متابولیک و انتقال انرژی می‌توان بیان نمود ژنوتیپ‌هایی که بیان بالاتری برای این ژن‌ها دارند کارآیی بالاتری در استفاده از کود فسفر خواهند داشت. مطابق با این نتایج، نتایج صفات مورفولوژیک نیز نشان داد، ژنوتیپ‌هایی که بیان بالاتری برای این ژن‌ها داشتند به‌طورکلی عملکرد دانه و صفات عملکردی بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان دادند که دلالت بر نقش مؤثر این ژن‌ها در بالابردن کارآیی مصرف کود فسفر و افزایش عملکرد دانه دارد. ژن *Ta-PHR1* سبب افزایش ریشه‌های موئین شده که باعث جذب و استفاده بهینه از فسفر خاک شده و ژن *Ta-PHO2* در انتقال فسفر از ریشه به اندام‌های هوایی نقش دارد و موجب افزایش متابولیسم سلول و درنهایت افزایش عملکرد و اجزای عملکرد می شود. هم‌چنین با توجه به نقش کود نیتروژن در افزایش رشد رویشی گیاه، کاربرد توأم آن با کود فسفره موجب افزایش بهره‌وری گیاه از فسفر شده و همان‌طورکه در نتایج نیز مشاهده گردید در شرایط کاربرد توأم نیتروژن و فسفر تمامی ژنوتیپ‌ها بیش‌ترین عملکرد دانه و صفات وابسته را داشته که با افزایش میزان بیان ژن‌ها مطابقت داشت.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۷-۸ متن انگلیسی مراجعه شود.