

ارزیابی تغییرات میزان کلروفیل و بیان ژن‌های کاتالاز و DREB1 در ارقام سویا در شرایط تنش خشکی

Evaluation of Chlorophyll Content and Genes Expression (Catalase and DREB1) in Soybean Cultivars Under Drought Stress Condition

ابوالفضل مازندرانی^۱، مهدی رحیم‌ملک^۲، سعید نواب‌پور^{۳*} و ساناز رمضانپور^۴

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۱/۲۴

چکیده

تنش خشکی یکی از عوامل مهم محدودکننده تولید محصولات زراعی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در سراسر جهان است. این آزمایش در ایستگاه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان و به صورت اسپلیت پلات فاکتوریل با طرح پایه بلوک کامل تصادفی در چهار تکرار انجام شد. تنش خشکی به عنوان فاکتور اصلی شامل سه سطح (آبیاری بعد از ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر از سطح تشتک تبخیر کلاس A) بود که ۵۰ میلی‌متر تبخیر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ترکیب فاکتوریل سه رقم سویا شامل DPX، ساری و WE6، و سه مرحله رشد (گلدھی، غلاف‌بندی و پرشدن دانه) به عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شدند. صفات مورد ارزیابی شامل میزان کلروفیل a و b و روند بیان ژن‌های کاتالاز و DREB1 بود. میزان کلروفیل در سطح اول تنش (۱۰۰ میلی‌متر تبخیر) افزایش و در سطح دوم (۱۵۰ میلی‌متر تبخیر) تنش کاهش یافت. بررسی مولکولی بر روی الگوی بیان ژن کاتالاز و DREB1 با استفاده از روش QRT-PCR نشان داد که در طول تنش میزان بیان ژن کاتالاز ابتدا افزایش و سپس کاهش داشت. بیان ژن DREB1 نیز مشابه با ژن کاتالاز بود. رقم DPX بیش‌ترین بیان ژن DREB1 را در سطح اول تنش در مرحله‌ی غلاف‌بندی و کم‌ترین کاهش را در سطح دوم تنش در همین مرحله نشان داد. رقم ساری بیشترین کاهش را در بیان ژن DREB1 در سطح دوم تنش نشان داد. میزان کلروفیل نیز با بیان ژن‌های کاتالاز و DREB1 همبستگی مثبت نشان داد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش خشکی، سویا، کاتالاز، میزان کلروفیل، DREB1

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی، اصفهان
۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی، اصفهان
۳ و ۴. دانشیاران گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان
*: نویسنده مسوول
Email: s.navabpour@yahoo.com

دانه‌های روغنی پس از غلات، دومین ذخایر غذایی جهان را تشکیل می‌دهند. این محصولات علاوه بر دارا بودن ذخائر غنی اسید چرب، حاوی پروتئین نیز می‌باشند شریعتی و قاضی (Shariati and Ghazi, 2000). سویا یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی جهان است که بالاترین میزان تولید در جهان را به خود اختصاص داده است. در ایران این گیاه رتبه دوم را از نظر تولید و سطح زیر کشت داراست (مسعودی و همکاران، ۱۳۹۰). سویا با نام علمی *Glycine max L.* گیاهی دیپلوئید با $2n = 2x = 40$ کروموزوم است. این گیاه دولپه، یک‌ساله و از خانواده فاباسه (لگومینوزه)، زیرخانواده پاپیلیوناسه، تیره فازنوله، جنس گلپسین و گونه ماکس است بورتون (Burton, 1997).

تنش آبی در گیاه یا کمبود آب که به آن تنش خشکی هم اطلاق می‌شود به وضعیتی گفته می‌شود که در آن سلول‌ها از حالت آماس خارج شده باشند. به عبارت ساده‌تر تنش خشکی زمانی رخ می‌دهد که سرعت تعرق بیش از سرعت جذب آب باشد. با کاهش مقدار آب در خاک و عدم جایگزینی آن، پتانسیل آب در منطقه توسعه ریشه‌ها و به تبع آن پتانسیل آب در گیاه کاهش می‌یابد. تنش خشکی زیاد باعث کاهش فتوسنتز، اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی و سرانجام خشک شدن و مرگ گیاه می‌گردد شائو و همکاران (Shao et al., 2005). کم آبی اولین عامل محدودکننده تولید سویا در مناطق نیمه‌خشک می‌باشد مینگ و همکاران (Ming et al., 2007). یکی از راهکارهای افزایش عملکرد سویا انتخاب ارقام مقاوم و سازگار با شرایط اقلیمی خشک یا کم آب می‌باشد آزادبخت و همکاران (Azadbakht et al., 2003). تحمل خشکی یا مقاومت گونه‌های یک گیاه، شامل چندین سازوکار فیزیولوژیکی است نیلسن و اورکات (Nilsen and Orcutt, 1996). بنابراین، درک رفتار فیزیولوژیکی گیاه در واکنش به خشکی برای رسیدن به تحلیل کاملی از مکانیسم مقاوت گیاه ضروری است.

به نظر می‌رسد کاهش محتوای پروتئین تحت تنش خشکی با افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین و نیز تجمع آمینواسیدهای آزاد از جمله پرولین مرتبط می‌باشد کاستریلو و توروجیلو (Castrillo and Turujillo, 1994). پیشنهاد شده است که، خصوصیات بیوشیمیایی از جمله پایداری کلروفیل می‌تواند به‌عنوان معیاری برای گزینش ارقام مقاوم به خشکی مورد استفاده قرار گیرد شین و همکاران (Shin et al., 2005). کاهش محتوای کلروفیل نیز تحت تنش گزارش شده است احمدی و بیکر؛ کاستریلو و توروجیلو (Ahmadi and Baker, 2007).
بررسی‌های مولکولی امکان تحلیل سازگاری متابولیکی و فیزیولوژیکی گیاه را در شرایط تنش خشکی فراهم کرده و منجر به شناخت تعداد زیادی از ژن‌های درگیر در شرایط تنش شده است شینوزاکی و یاماگوچی شینوزاکی (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). در یک سلول متحمل در یک زمان ممکن است تعداد زیادی ژن درگیر در مقاومت فعال شوند، این ژن‌ها ممکن است در فرآیند حفاظت اسمزی، چپرون‌ها، پروتئین‌های کانال آبی، پروتئازها، پروتئین‌های پیام‌رسان، آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل نسخه‌برداری درگیر باشند یاماگوچی شینوزاکی و همکاران (2002). محققان اشاره داشته‌اند که بسیاری از ژن‌های القا شده در تنش شوری در تنش خشکی و دمای پایین نیز القا می‌گردند یاماگوچی شینوزاکی و همکاران (2002). در زمان تنش برای حفظ رطوبت موجود در گیاه روزنه‌ها بسته می‌شوند این موضوع ضمن کاهش تبادل گازی در برگ‌ها منجر به ایجاد H_2O_2 و سایر رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) در بافت‌ها می‌گردد لونا و همکاران (Luna et al., 2004). برای خنثی نمودن اثرات سمی و مخرب ROS، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در سلول‌های گیاه فعال شده و میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌وسیله این سیستم تنظیم می‌شود گیچو و همکاران (Gechev et al., 2002). استالف موریرا و همکاران (Stolf-Moreira et al., 2010) با بررسی صفات فیزیولوژیک و تغییرات بیان ژن‌ها طی دوره خشکی در دو ژنوتیپ متحمل و حساس سویا دریافتند که ژنوتیپ متحمل به‌علت تنظیم زمان‌بندی بیان ژن‌ها سازگاری بهتری دارد. مینگ و همکاران (2007) با بررسی ژن جدید و همولوگ GmDREB2 سویا تحت تنش‌های غیرزنده نشان دادند که این ژن به‌عنوان یک فعال‌کننده‌ی مهم رونویسی، عمل می‌کند و می‌تواند در بهبود تحمل تنش‌های غیرزنده در گیاه مفید واقع شود. در این تحقیق به بررسی روند تغییرات میزان کلروفیل a و b و ژن‌های القایی کاتالاز و DREB طی مرحله رشد زایشی در واریته‌های سویا، تحت تنش خشکی پرداخته شد.

بررسی‌های مولکولی امکان تحلیل سازگاری متابولیکی و فیزیولوژیکی گیاه را در شرایط تنش خشکی فراهم کرده و منجر به شناخت تعداد زیادی از ژن‌های درگیر در شرایط تنش شده است شینوزاکی و یاماگوچی شینوزاکی (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). در یک سلول متحمل در یک زمان ممکن است تعداد زیادی ژن درگیر در مقاومت فعال شوند، این ژن‌ها ممکن است در فرآیند حفاظت اسمزی، چپرون‌ها، پروتئین‌های کانال آبی، پروتئازها، پروتئین‌های پیام‌رسان، آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل نسخه‌برداری درگیر باشند یاماگوچی شینوزاکی و همکاران (2002). محققان اشاره داشته‌اند که بسیاری از ژن‌های القا شده در تنش شوری در تنش خشکی و دمای پایین نیز القا می‌گردند یاماگوچی شینوزاکی و همکاران (2002). در زمان تنش برای حفظ رطوبت موجود در گیاه روزنه‌ها بسته می‌شوند این موضوع ضمن کاهش تبادل گازی در برگ‌ها منجر به ایجاد H_2O_2 و سایر رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) در بافت‌ها می‌گردد لونا و همکاران (Luna et al., 2004). برای خنثی نمودن اثرات سمی و مخرب ROS، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در سلول‌های گیاه فعال شده و میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌وسیله این سیستم تنظیم می‌شود گیچو و همکاران (Gechev et al., 2002). استالف موریرا و همکاران (Stolf-Moreira et al., 2010) با بررسی صفات فیزیولوژیک و تغییرات بیان ژن‌ها طی دوره خشکی در دو ژنوتیپ متحمل و حساس سویا دریافتند که ژنوتیپ متحمل به‌علت تنظیم زمان‌بندی بیان ژن‌ها سازگاری بهتری دارد. مینگ و همکاران (2007) با بررسی ژن جدید و همولوگ GmDREB2 سویا تحت تنش‌های غیرزنده نشان دادند که این ژن به‌عنوان یک فعال‌کننده‌ی مهم رونویسی، عمل می‌کند و می‌تواند در بهبود تحمل تنش‌های غیرزنده در گیاه مفید واقع شود. در این تحقیق به بررسی روند تغییرات میزان کلروفیل a و b و ژن‌های القایی کاتالاز و DREB طی مرحله رشد زایشی در واریته‌های سویا، تحت تنش خشکی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در ایستگاه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان و به صورت اسپلیت پلات فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. فاکتور اصلی آزمایش سه رژیم آبیاری شامل: آبیاری بعد از ۵۰mm تبخیر از تشتک کلاس A که به عنوان تیمار شاهد (عدم تنش)؛ آبیاری بعد از ۱۰۰mm تبخیر (سطح اول تنش) و آبیاری بعد از ۱۵۰mm تبخیر که (سطح دوم) تنش محسوب می‌شود صورت گرفت. برای انجام آبیاری میزان تبخیر صورت گرفته از روی تشتک تبخیر کلاس A موجود در کنار مزرعه قرائت شده و براساس تیمارهای موجود آبیاری صورت پذیرفت. فاکتور فرعی شامل ترکیب فاکتوریل ارقام DPX، ساری، WE6 و مراحل رشد گلدهی، غلاف‌بندی و پرشدن دانه بود. ارقام DPX و ساری از ارقام تجاری بوده که به طور وسیع در استان کشت می‌شوند. لاین WE6 از لاین‌های اصلاحی می‌باشد که در مرحله ارزیابی عملکرد قرار دارد. از آنجایی که تاکنون در سویا رقم مقاوم به خشکی شناسایی نشده، انتخاب ارقام براساس خصوصیات ظاهری و میزان عملکرد ارقام صورت گرفت.

در مراحل مختلف نمو، ۵ گرم برگ تیمارهای مختلف برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن کاتالاز برداشته شد و در نیتروژن مایع منجمد و تا مرحله استخراج RNA به فریزر ۸۰- منتقل گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت بایوزول (سیگما، آلمان) 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 به وسیله آغازگرهای ژن خانه‌دار با استفاده از PCR، cDNA سنتز شده تست گردید. عملکرد اختصاصی آغازگرهای مورد استفاده به- وسیله cDNAهای ساخته شده در یک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول حاصل روی ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز گردید. مشاهده تنها یک نوار در محدوده ۲۰۰ جفت‌بازی نشان‌دهنده عملکرد اختصاصی آغازگرها می‌باشد. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌های کاتالاز و DREB1 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 دهد استفاده شد. این دستگاه در هر چرخه از فعالیت می‌تواند مقدار محصول واکنش پلیمرز را نشان دهد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار اکتین که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها می‌باشد استفاده

شد. آغازگرهای مورد نیاز براساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ 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 به وسیله نرم‌افزار آماری SAS 9.1 و در قالب فاکتوریل انجام گرفت.

برای استخراج کلروفیل ۰/۵ گرم از بافت برگ یخ‌زده با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر WAP مدل ۵۲۰۰۰UV/vis، در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر جذب محلول اندازه‌گیری شد و میزان کلروفیل a و b از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

$$\text{chl a (mg/ml}^{-1}\text{)} = 12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6}$$

$$\text{chl b (mg/ml}^{-1}\text{)} = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6}$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسات میانگین به وسیله نرم‌افزار SAS 9.1 و رسم نمودارها با برنامه Excel 2010 انجام شد.

نتایج و بحث

میزان کلروفیل در سه مرحله اندازه‌گیری و تجزیه واریانس به- صورت اسپلیت پلات صورت گرفت. مقادیر میانگین مربعات برای تمام منابع تغییر به جز بلوک و در مورد هر ۲ صفت در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۲).

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

Table1: Properties of Primer Usage

نام آغازگر Primer Name	نوکلئوتید شروع Begin Nucleotide	نوکلئوتید پایان End Nucleotide	توالی آغازگر Primer Sequence	طول محصول واکنش Length of Reaction product	طول توالی Sequence Length	دمای ذوب (°C) Melting Temperature	شماره دسترسی در پایگاه NCBI Access Number in NCBI
<i>GmCAT1</i> , FOR	1338	1358	5'-GATACCGATCCTGGCCCTCT-3'	213	1831	64.89	001250627 NM
<i>GmCAT1</i> , REV	1518	1538	5'-GCTAGGGTTTCCACCACCAA-3'			64.21	
<i>GmDREB1</i> FOR ,	604	624	5'-CGCGCCAAGTACCAACTCTC-3'	214	910	65.47	514908 AF
<i>GmDREB1</i> REV ,	797	718	5'-AAGGGGAAGGGAAGGGGTTA-3'			64.31	
<i>GmActin</i> , FOR	1263	1283	5'-CTGATCGCATGAGCAAGGAA-3'	175	1544	62.53	60500 U
<i>GmActin</i> , REV	1417	1437	5'-GGGGATGTTGAGAATAGCAGGA-3'			64.49	

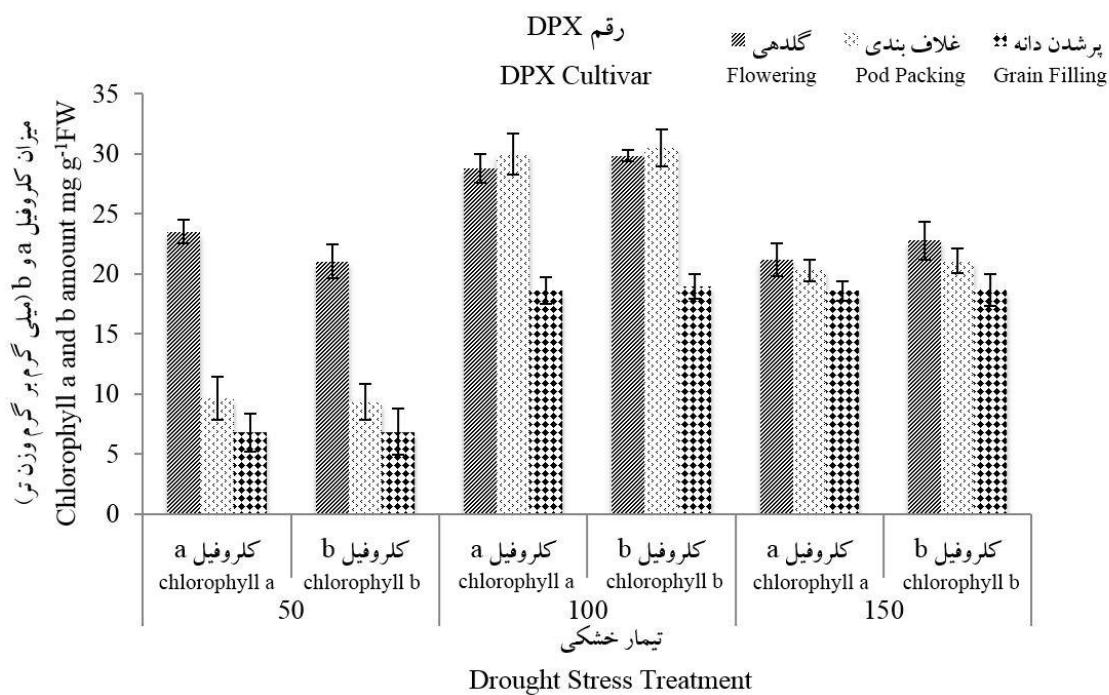
جدول ۲: تجزیه واریانس میزان کلروفیل a و b به صورت اسپلیت پلات

Table 2: Variance analysis of Chlorophyll a and b in split plot format

میانگین مربعات Mean Square		درجه آزادی Degree of Freedom	منابع تغییر Sources of Variation
کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a		
0.033 ^{ns}	0.04 ^{ns}	3	بلوک Block
634.8 ^{**}	466.9 ^{**}	2	تنش Stress
0.008	0.017	6	خطای (I) Error (I)
188.7 ^{**}	130.5 ^{**}	2	رقم Cultivar
502.1 ^{**}	428.4 ^{**}	2	مرحله Stage
123.8 ^{**}	81.1 ^{**}	4	تنش × رقم Stress×Cultivar
68.9 ^{**}	74.7 ^{**}	4	تنش × مرحله Stress×Stage
34.1 ^{**}	23.1 ^{**}	4	رقم × مرحله Cultivar×Stage
35.0 ^{**}	39.3 ^{**}	8	تنش × رقم × مرحله Stress×Cultivar×Stage
0.005	0.006	72	خطای (II) Error (II)
0.40	0.44	-	ضریب تغییرات % Coefficient of Variation %

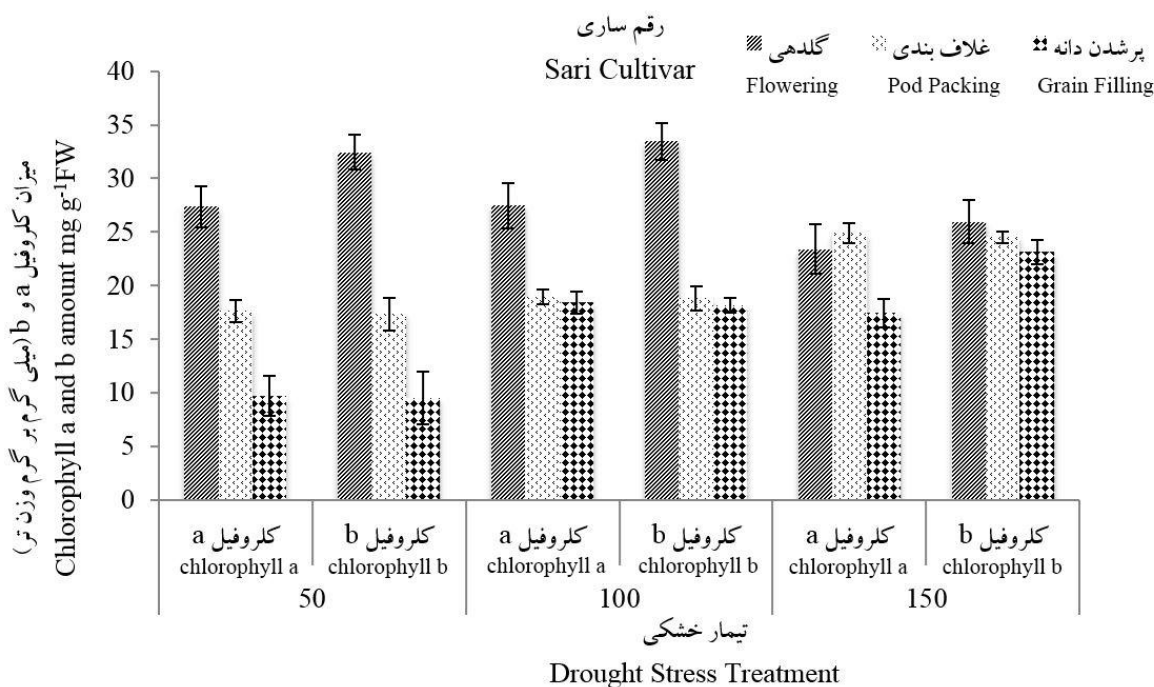
ns و ** به ترتیب، غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

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



شکل ۱: تغییرات میزان کلروفیل a و b در مراحل مختلف رشد تحت تنش خشکی در رقم DPX

Fig. 1: The changes of Chlorophyll a and b amount in different stages of growth under drought stress in DPX Cultivar



شکل ۲: تغییرات میزان کلروفیل a و b در مراحل مختلف رشد تحت تنش خشکی در رقم ساری

Fig. 2: The changes of Chlorophyll a and b amount in different stages of growth under drought stress in Sari Cultivar

نتایج بررسی بیان ژن‌های کاتالاز و DREB1

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن‌ها در هر سه رقم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۳ و ۴).

نتایج حاکی از تغییر بیان ژن‌ها در سطوح مختلف خشکی و در مراحل مختلف نمو بود. نتایج بیان ژن DREB1 حاکی از این است که این ژن در سطوح پایین تنش می‌تواند به‌عنوان یک عامل مؤثر بر افزایش مقاومت به خشکی عمل نماید. همچنین اختلاف میزان بیان این ژن در ارقام مختلف می‌تواند دلیلی بر میزان مقاومت ارقام مختلف به تنش باشد، چنان‌که میزان بیان آن در ارقام مقاوم بیشتر از ارقام حساس بود.

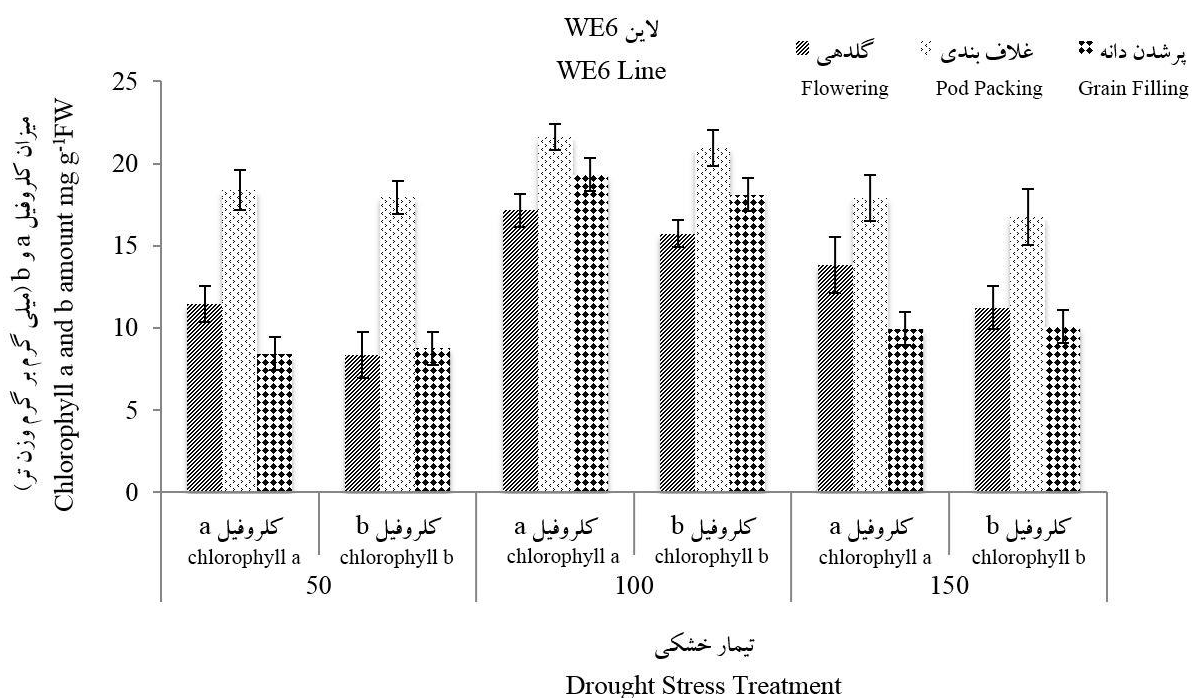
بررسی روابط میان میزان بیان دو ژن کاتالاز و DREB1 تحت تنش خشکی در ارقام مختلف در مراحل مختلف روند جالبی نشان داد (شکل ۴، ۵ و ۶). روند بیان این دو ژن در ارقام و مراحل مختلف در سطوح مختلف تنش تقریباً مشابه بود. در واقع میزان بیان هر دو ژن در سطح اول تنش افزایش و در سطح دوم کاهش نشان داد که علت آن شدت بالای تنش می‌باشد. در واقع زمانی که شدت تنش بسیار زیاد باشد سلول زمان کافی برای پاسخ دفاعی نخواهد داشت. در چنین شرایطی افت معنی‌دار بیان ژن‌ها قابل‌انتظار است. نتایج مشابهی در سایر مطالعات گزارش شده است نواب‌پور و همکاران (Navabpour *et al.*, 2003, 2007). با این حال میزان بیان ژن کاتالاز در لاین WE6 در مراحل گلدهی و غلاف‌بندی در سطوح اول و دوم تنش تقریباً برابر بود حال آن‌که میزان بیان ژن DREB1 در این شرایط در سطح دوم نسبت به سطح اول کاهش یافت.

از آنجایی‌که نقش ژن کاتالاز به‌عنوان یک ژن القاء‌کننده مقاومت به خشکی در نتایج سایر محققین مشخص شده است لونا و همکاران، زیمرمن و همکاران (Luna *et al.*, 2004; Zimmerman *et al.*, 2006)، روند بیان مشابه ژن DREB1 با ژن کاتالاز می‌تواند دلالت بر نقش این ژن در ایجاد مقاومت به خشکی داشته باشد.

یکی از پیامدهای اجتناب‌ناپذیر تنش خشکی افزایش تولید ROS در اندامک‌های سلولی، نظیر کلروپلاست، پراکسیزوم و میتوکندری است کروز (Cruz, 2008). آنزیم کاتالاز که تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می‌شود از دسته پروتئین‌های

آهن‌دار محسوب می‌شود و هنگامی در سلول‌های گیاهی و جانوری وارد عمل می‌شود که مقدار ماده پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در محیط زیاد باشد. این آنزیم دارای ساختار پروتئینی پورفیرینی چهارتایی با آهن می‌باشد که وظیفه شکستن ترکیبات رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌ویژه پراکسید هیدروژن را دارد دو و همکاران (Du *et al.*, 2007). ژن‌های DREB، تنظیم‌کننده‌های مرکزی پاسخ به تنش‌های محیطی و تحمل شرایط نامطلوبی که گیاه در معرض آن قرار دارد می‌باشند. DREBها با تنظیم بیان تعداد زیادی ژن‌های القاء‌شونده توسط تنش‌های اسموتیک و همچنین تنظیم مسیرهای طبیعی پاسخ به تنش، در مجموع سازگاری فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه ایجاد کرده و آن را قادر می‌سازند خود را با تنش‌های اُسمتیک انطباق دهد. به‌طور کلی DREBها در مقایسه سایر ژن‌های القاء‌شونده توسط تنش باعث افزایش سطح تحمل گیاه خواهد شد، و همین امر موجب شده است آن‌ها اهدافی مطلوب جهت مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخت باشند لاتا و پراساد (Lata and Prasad, 2011).

تغییرات بیان ژن کاتالاز و میزان کلروفیل a و b در ارقام مورد مطالعه روند نسبتاً مشابهی نشان داد، طوری‌که در رقم DPX این روند به‌طور مشابه در سطح اول تنش افزایش و در سطح دوم کاهش یافت (شکل ۷). قابل ذکر است که روند کاهش بیان ژن کاتالاز در سطح دوم تنش، در مرحله گلدهی بیشتر از کلروفیل بود. این مسأله در مرحله پرشدن دانه نیز مشاهده شد؛ به‌طوری‌که میزان کلروفیل در این مرحله در هر دو سطح تنش تقریباً برابر است. در رقم ساری روند تغییرات بیان ژن کاتالاز در مرحله گلدهی با تغییرات میزان کلروفیل همبستگی مثبت نشان داد. میزان کلروفیل در مراحل غلاف‌بندی و پرشدن دانه در سطح دوم تنش افزایش یافت در صورتی‌که میزان بیان ژن کاتالاز کاهش یافت (شکل ۸). در لاین WE6 نیز تفاوت در روند میزان کلروفیل و بیان ژن کاتالاز در سطح دوم تنش و در مراحل گلدهی و غلاف‌بندی دیده شد (شکل ۹). در سطح دوم تنش میزان بیان ژن کاتالاز در لاین WE6 در مرحله گلدهی و غلاف‌بندی ثابت ماند در صورتی‌که میزان کلروفیل در هر دو مرحله گلدهی و غلاف‌بندی کاهش یافت.



شکل ۳: تغییرات میزان کلروفیل a و b در مراحل مختلف رشد تحت تنش خشکی در رقم WE6
 Fig. 3: The changes of Chlorophyll a and b amount in different stages of growth under drought stress in WE6 Cultivar

جدول ۳: تجزیه واریانس میزان بیان ژن کاتالاز به صورت فاکتوریل
 Table 3: Variance analysis of Catalase gene expression in Factorial format

میانگین مربعات Mean Square			درجه آزادی Degr of Freedom	منابع تغییر Sources of Variation
رقم WE6 WE6 Cultivar	رقم ساری Sari Cultivar	رقم DPX DPX Cultivar		
9.402**	4.227**	26.281**	2	تنش Stress
2.882**	5.105**	6.004**	2	مرحله نمونه برداری Sampling Stage
0.072**	0.630**	0.535**	4	تنش×مرحله Stress×Stage
0.015	0.036	0.026	18	خطا Error
2.71	5.40	2.54	-	ضریب تغییرات % Coefficient of Variation

** معنی داری در سطح احتمال یک درصد

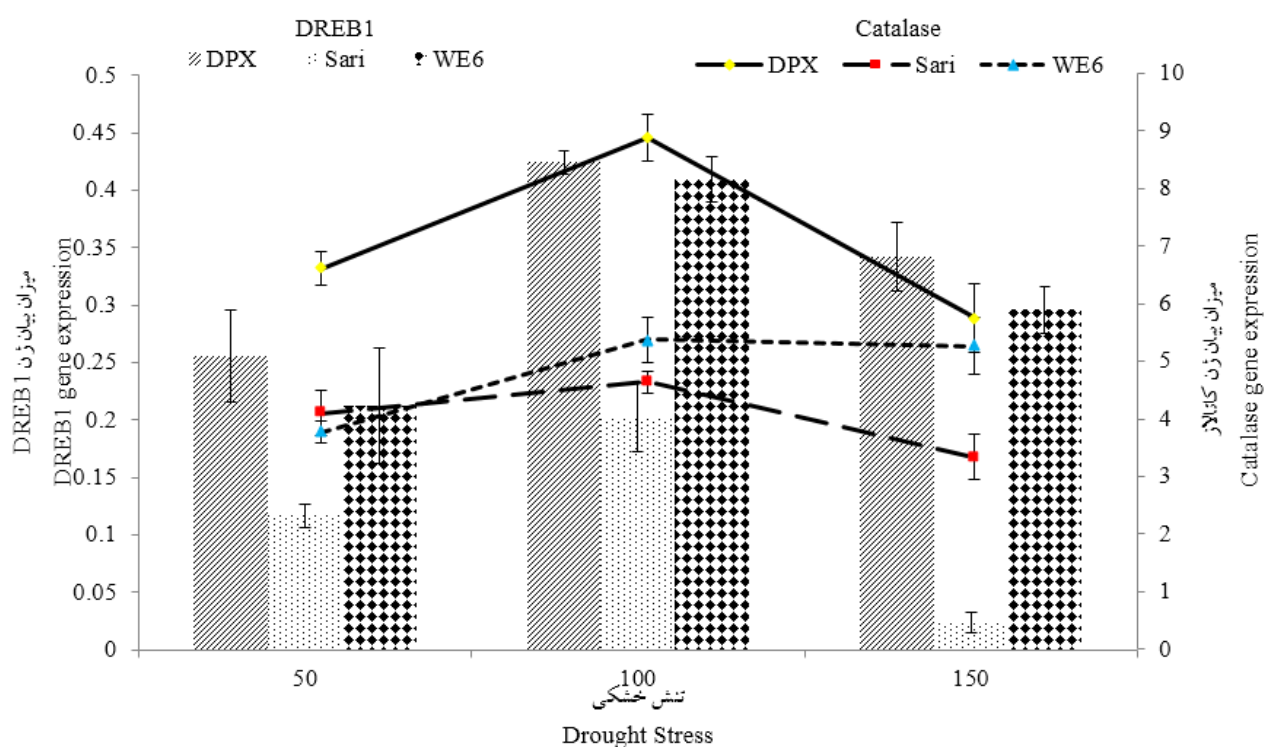
** significant at 1% critical levels

جدول ۴: تجزیه واریانس میزان بیان ژن DREB1 به صورت فاکتوریل
Table 4: Variance analysis of DREB1 gene expression in Factorial Format

میانگین مربعات Mean Square			درجه آزادی Degr of Freedom	منابع تغییر Sources of Variation
رقم WE6 WE6 Cultivar	رقم ساری Sari Cultivar	رقم DPX DPX Cultivar		
0.156**	0.186**	0.365**	2	تنش Stress
0.224**	0.067**	0.661**	2	مرحله نمونه برداری Sampling Stage
0.010**	0.018**	0.068**	4	تنش×مرحله Stress×Stage
0.00031	0.00010	0.00158	18	خطا Errorr
7.63	20.76	11.29	-	ضریب تغییرات % Coefficient of Variation

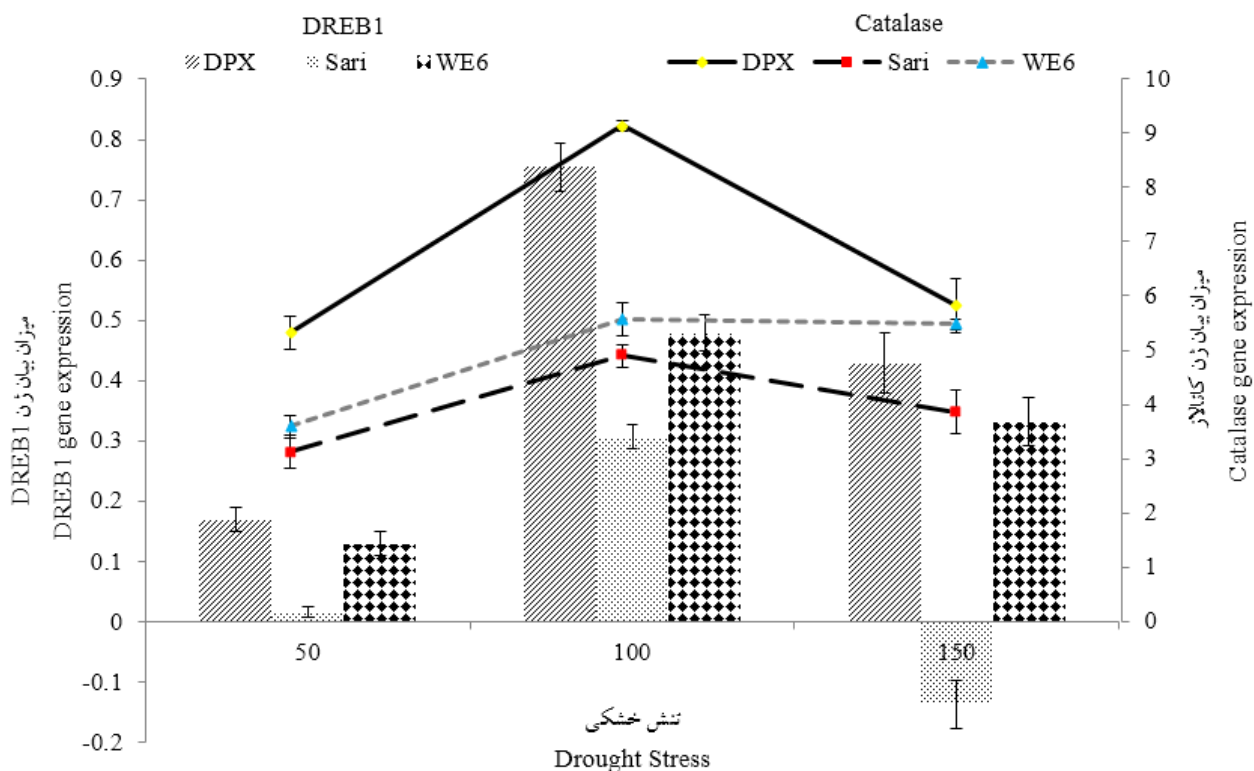
** معنی داری در سطح احتمال یک درصد

** significant at 1% critical levels



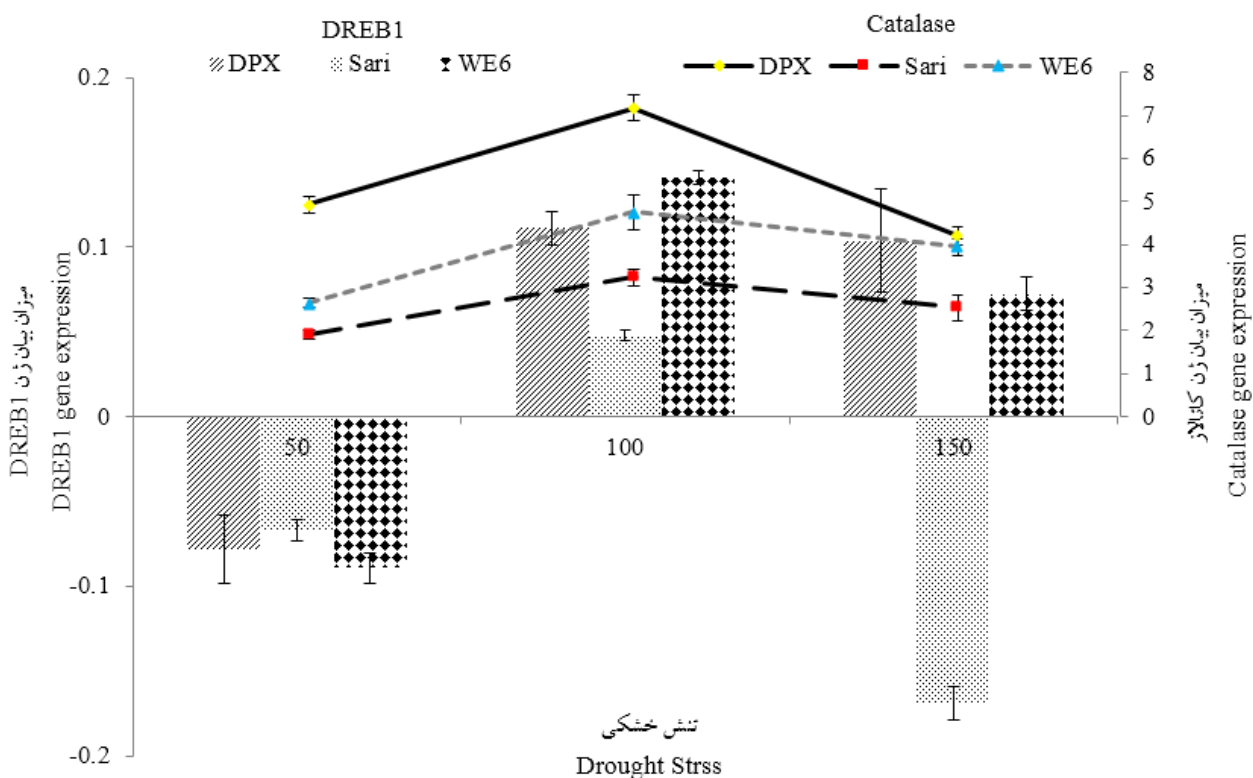
شکل ۴: روند تغییرات میزان بیان ژن کاتالاز و DREB1 در ارقام مختلف تحت تنش خشکی در مرحله گلدهی

Fig. 4: The changes of Catalas and DREB1 genes expression in diffrent cultivars under drought stress in flowering Stage



شکل ۵: روند تغییرات میزان بیان ژن کاتالاز و DREB1 در ارقام مختلف تحت تنش خشکی در مرحله غلاف بندی

Fig. 5: The changes of Catalas and DREB1 genes expression in diffrent cultivars under drought stress in packing pod Stage

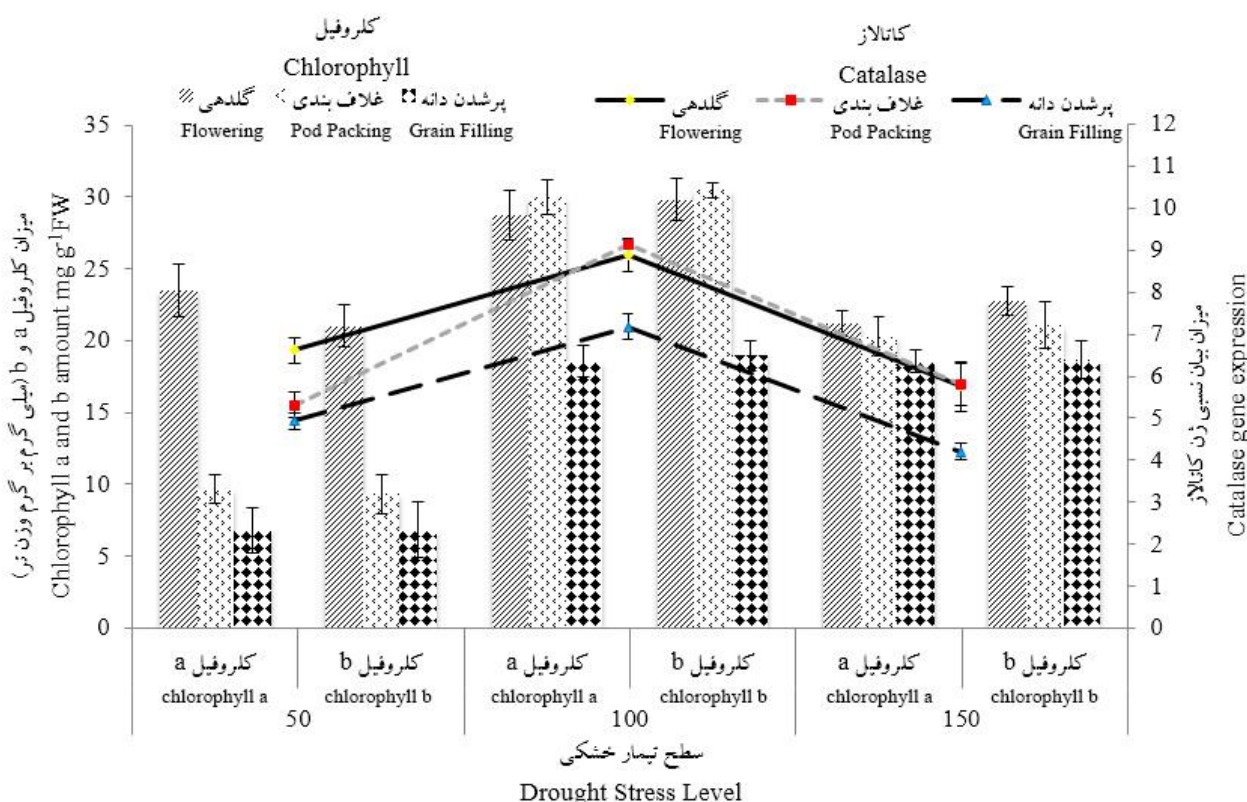


شکل ۶: روند تغییرات میزان بیان ژن کاتالاز و DREB1 در ارقام مختلف تحت تنش خشکی در مرحله پرشدن دانه

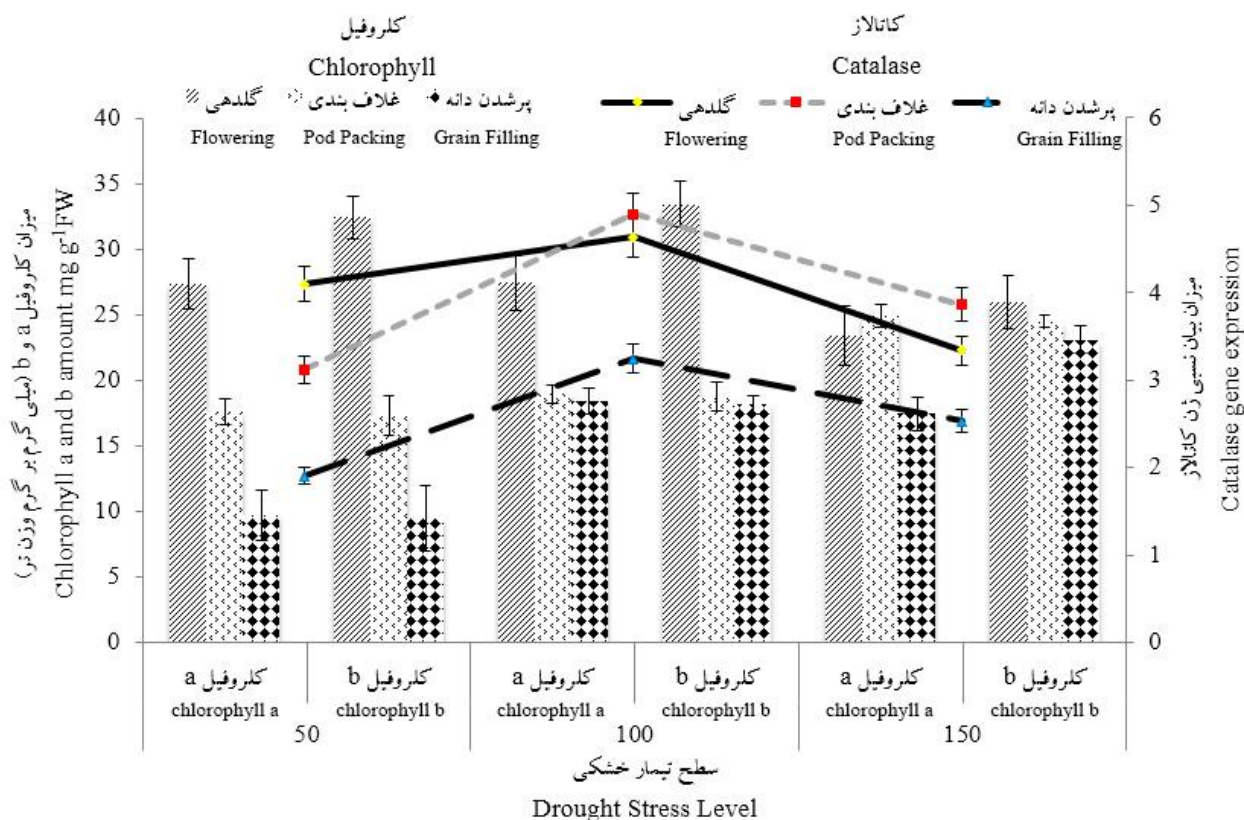
Fig. 6: The changes of Catalas and DREB1 genes expression in diffrent cultivars under drought stress in grain filling Stage

یافت. روند کلی در هر سه رقم به این صورت بود که در سطح اول تنش مقدار کلروفیل افزایش و در سطح دوم تنش مقدار آن کاهش یافت که میزان تغییرات در رقم‌های مختلف متفاوت بود. این موضوع در نتایج تحقیقات سایر محققین نیز بیان شده است فریتسیچ و رای؛ آنتولین و همکاران (Fritschi and Ray, 1995; Antolin et al., 2007). اساساً در اثر تنش خشکی میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد که می‌تواند با تخریب غشاء سلولی و مولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها و DNA سبب مرگ سلول‌ها شوند. میزان کلروفیل تحت تنش خشکی به‌واسطه افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن ردی و همکاران (Reddy et al., 2004)، کاهش جذب عناصر معدنی و کاهش بیوسنتز اسیدهای آمینه شاین و همکاران، تانیز و زایگر (2005, 2006) کاهش می‌یابد. بر این اساس میزان کلروفیل به-عنوان یک شاخص بیوشیمیایی باثبات و قابل‌اعتماد برای ارزیابی مقاومت نسبی به تنش خشکی مدنظر می‌باشد. نتایج سایر تحقیقات نیز مؤید این مسأله است دهاندا و همکاران، شائو و همکاران (Dhanda et al., 2004; Shao et al., 2005).

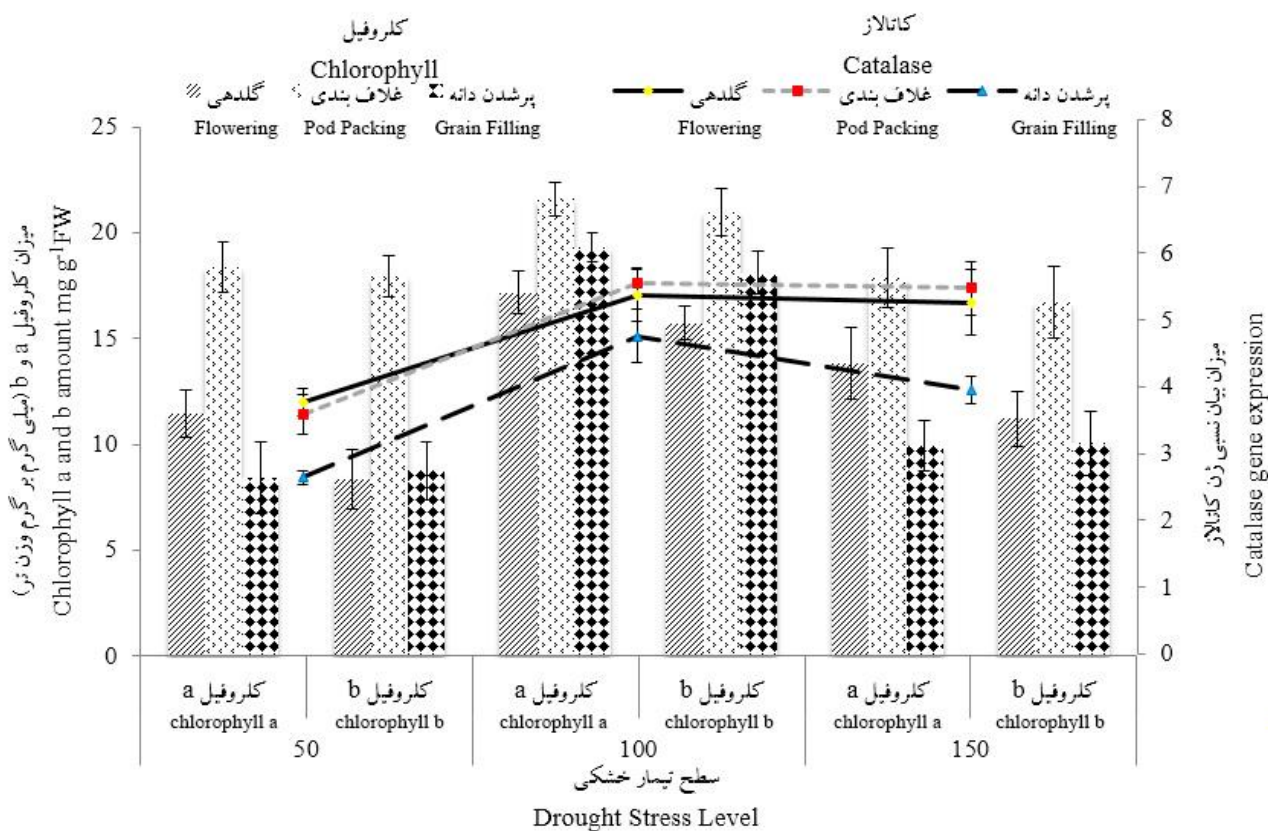
روند تغییرات بیان ژن DREB1 در رقم DPX با تغییرات کلروفیل همبستگی مثبت نشان داد (شکل ۱۰). بیان ژن DREB1 در سطح دوم تنش تقریباً برابر با میزان بیان آن در سطح اول تنش بود حال آن‌که میزان کلروفیل در سطح دوم تنش کاهش چشم‌گیری داشت. در رقم ساری تغییرات بیان ژن DREB1 نسبت به کلروفیل مشابه با ژن کاتالاز بود (شکل ۱۱). روند تغییرات بیان ژن DREB1 در مرحله گلدهی با تغییرات میزان کلروفیل همبستگی مثبتی نشان داد، در صورتی‌که میزان کلروفیل در مراحل غلاف‌بندی و پرشدن دانه در سطح دوم تنش افزایش یافت اما میزان بیان ژن DREB1 کاهش یافت. در لاین WE6 روند تغییرات بیان ژن DREB1 به جز در مرحله غلاف‌بندی در سطح دوم تنش که میزان بیان ژن کاهش ولی میزان کلروفیل افزایش یافته بود، با تغییرات کلروفیل همبستگی مثبت نشان داد (شکل ۱۲). تنش خشکی میزان کلروفیل برگ را تحت تأثیر قرار داد به‌طوری‌که میزان آن در سطوح مختلف تنش و مراحل مختلف رشد (گلدهی، غلاف‌بندی و پرشدن دانه) نسبت به شاهد تغییر



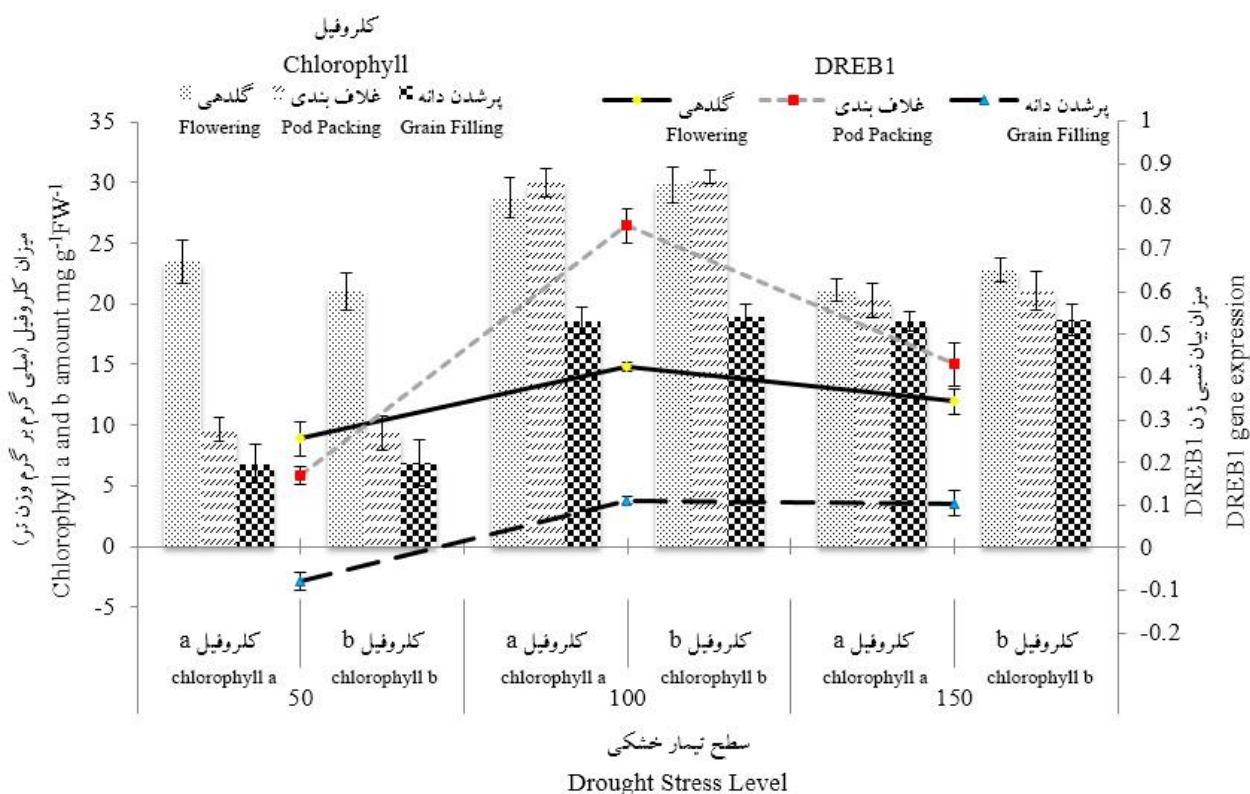
شکل ۷: روند تغییرات میزان بیان ژن کاتالاز و کلروفیل در مراحل مختلف تحت تنش خشکی در رقم DPX
 Fig. 7: The changes of Catalase expression and Chlorophyll in Different stages under drought stress in DPX cultivar



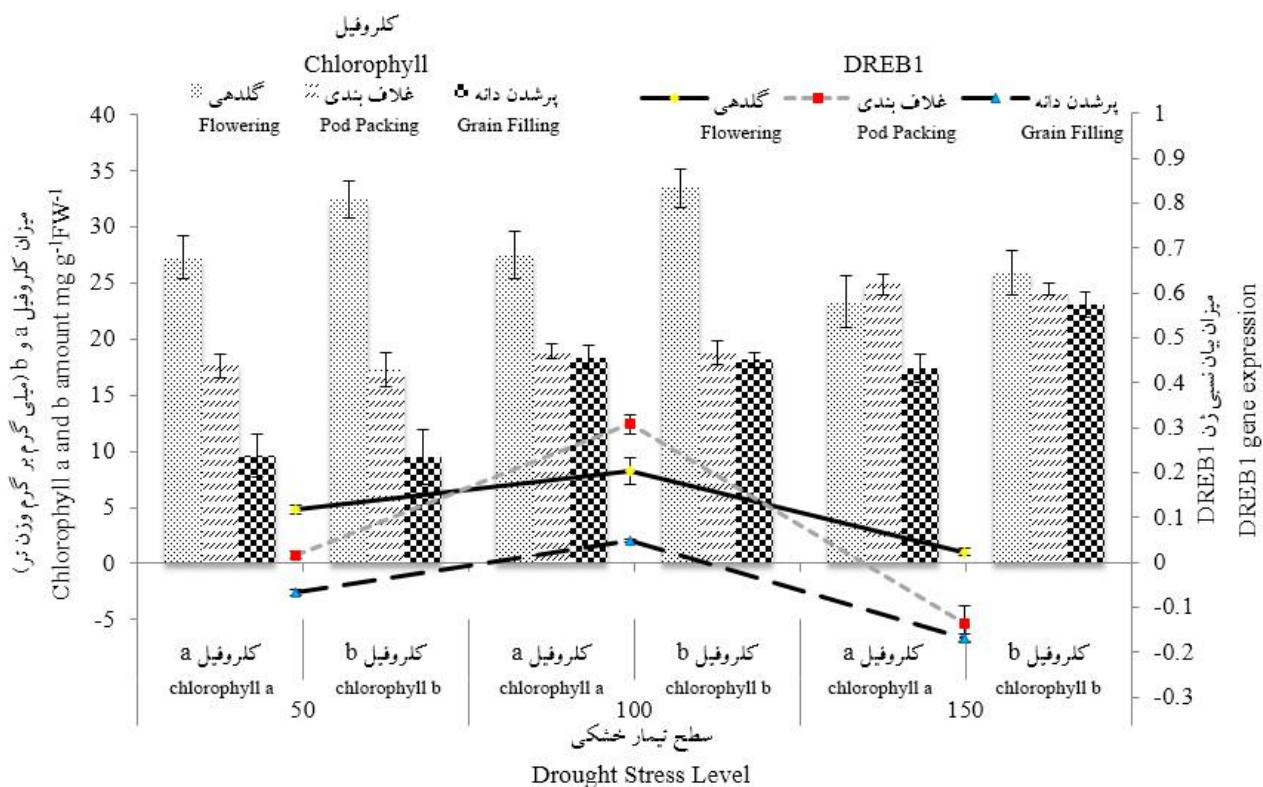
شکل ۸: روند تغییرات میزان بیان ژن کاتالاز و کلروفیل در مراحل مختلف تحت تنش خشکی در رقم ساری
 Fig 8: The changes of Catalase expression and Chlorophyll in Different stages under drought stress in Sari cultivar



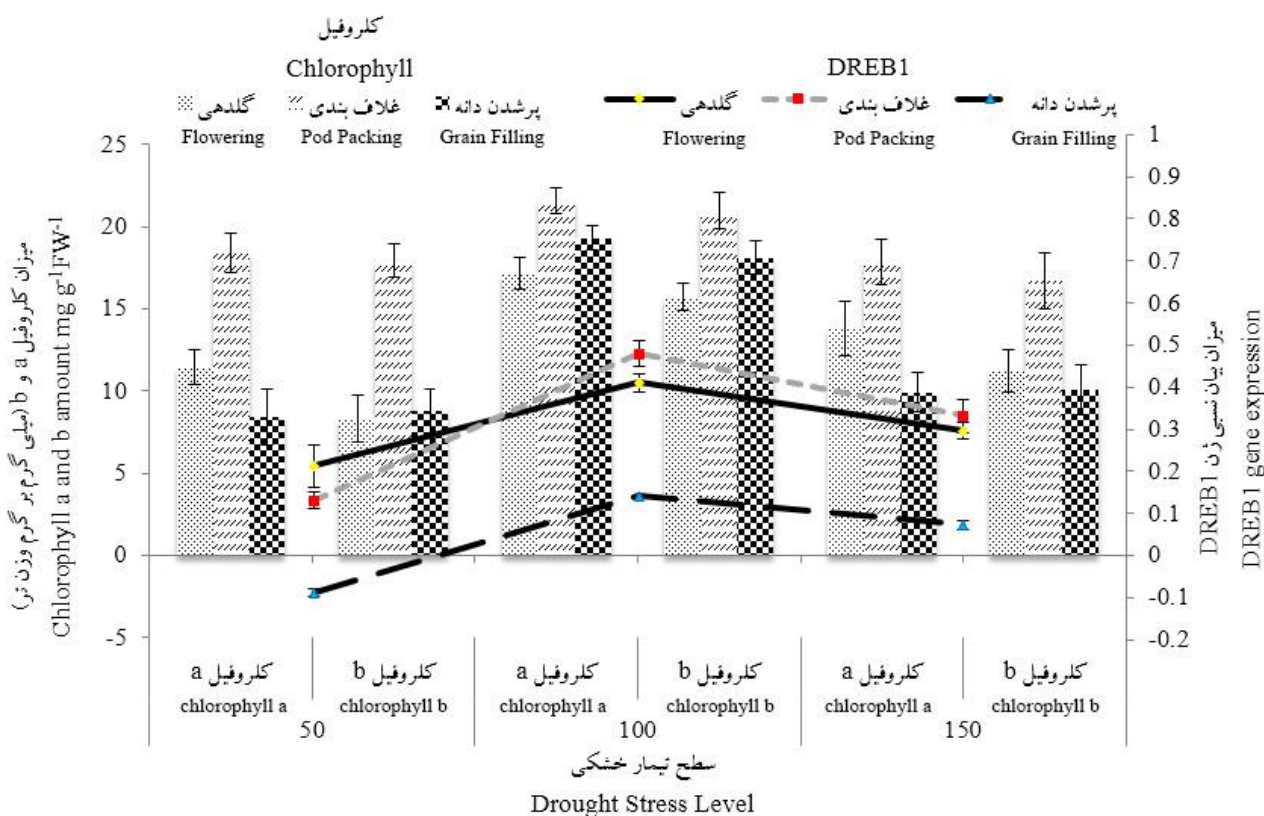
شکل ۹: روند تغییرات میزان بیان ژن کاتالاز و کلروفیل در مراحل مختلف تحت تنش خشکی در لاین WE6
 Fig. 9: The changes of Catalase expression and Chlorophyll in Different stages under drought stress in WE6 cultivar



شکل ۱۰: روند تغییرات میزان بیان ژن DREB1 و کلروفیل در مراحل مختلف تحت تنش خشکی در رقم DPX
 Fig. 10: The changes of DREB1 expression and Chlorophyll in Different stages under drought stress in DPX cultivar



شکل ۱۱: روند تغییرات میزان بیان ژن DREB1 و کلروفیل در مراحل مختلف تحت تنش خشکی در رقم ساری
 Fig. 11: The changes of DREB1 expression and Chlorophyll in Different stages under drought stress in Sari cultivar



شکل ۱۲: روند تغییرات میزان بیان ژن DREB1 و کلروفیل در مراحل مختلف تنش خشکی در لاین WE6

Fig. 12: The changes of DREB1 expression and Chlorophyll in Diffrent stages under drought stress in WE6 cultivar

به خشکی می‌توان گفت، از آنجایی که آنزیم کاتالاز نقش تعدیل‌کننده در میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در گیاه دارد و در سطح اول تنش (۱۰۰ میلی‌متر تبخیر از سطح تشک تبخیر) میزان آن افزایش یافته است، در نتیجه به‌نظر می‌رسد در ایجاد مقاومت به خشکی نقش مهمی را بازی می‌کند. از طرف دیگر همبستگی مثبت و معنی‌دار ژن کاتالاز با میزان کلروفیل a ($r = 0.518$) و b ($r = 0.487$) و انطباق روند تغییرات آن‌ها در اکثر موارد مبین نقش ژن کاتالاز در ایجاد مقاومت به تنش خشکی می‌باشد. در رابطه با میزان بیان ژن DREB1 نیز نتایج نشان داد که میزان بیان این ژن در همه رقم‌ها در مرحله گلدهی در سطح اول تنش افزایش و در سطح دوم کاهش یافت. بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به رقم DPX در سطح اول تنش و در مرحله غلاف‌بندی می‌باشد. میزان بیان این ژن در هر سه رقم در مرحله پرشدن دانه در شاهد منفی بود و تحت تنش مقدار بیان آن افزایش یافت. کاهش شدید مقدار این ژن در رقم ساری و در سطح دوم تنش نشان‌دهنده حساسیت این رقم به سطوح بالای خشکی می‌باشد. تغییرات افزایش بیان این ژن در ارقام مختلف توسط سایر محققین نیز گزارش شده است چن و همکاران؛ دوبوزت و همکاران (Chen *et al.*, 2006; Doubuzet *et al.*, 2003).

به‌طور کلی بیان ژن کاتالاز در همه ارقام در سطح اول تنش افزایش یافت که با روند افزایشی میزان کلروفیل مطابقت داشت. میزان افزایش ژن کاتالاز در سطح اول تنش در ارقام مختلف متفاوت بود و در این میان رقم DPX بیشترین میزان بیان ژن را نشان داد. در لاین WE6 نیز میزان افزایش قابل‌توجه بود ولی در رقم ساری کم‌ترین میزان افزایش مشاهده شد. میزان بیان ژن کاتالاز در دو رقم DPX و ساری در سطح دوم تنش کاهش یافت که میزان کاهش آن در رقم ساری بیش‌تر از رقم DPX بود. نکته جالب‌توجه در هر دو رقم در این بود که میزان کاهش بیان ژن کاتالاز در هر دو رقم در مرحله گلدهی بیش‌تر از مراحل غلاف‌بندی و پرشدن دانه بود. حساسیت بالای مرحله گلدهی به تنش می‌تواند دلیل این امر باشد که توسط سایر محققین نیز ذکر شده است (Desclaux *et al.*, 2000; همکاران، کوکوبان و همکاران (Kokuban *et al.*, 2001). میزان بیان ژن کاتالاز در لاین WE6 در سطح دوم تنش کاهش چندانی پیدا نکرد که می‌تواند دلیلی بر وجود مقاومت به تنش خشکی در این لاین باشد. به‌طور کلی خصوصیات مورفولوژیکی این لاین به رقم DPX که برتری قابل‌ملاحظه‌ای در تمامی صفات مورد مطالعه داشت، بسیار نزدیک بود. در رابطه با نقش ژن کاتالاز در القای مقاومت

ارزیابی تغییرات میزان کلروفیل و بیان ژن‌های کاتالاز و ...

به‌طور کلی ژن‌های DREB از مسیر غیروابسته به اسیدآبسیزیک در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند. ژن DREB1 به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در واکنش‌های بیوشیمیایی که موجب افزایش ثبات غشاء می‌شود نقش دارد چن و همکاران (2006). از این‌رو ثبات در تمامیت غشاء موجب کاهش از دست‌دادن آب و افزایش مقاوت به خشکی می‌شود. از طرف دیگر همبستگی مثبت و معنی‌دار ژن DREB1 با میزان کلروفیل a ($r = 0/446$) و b ($r = 0/422$) و انطباق روند تغییرات آن‌ها در اکثر موارد می‌تواند بیانگر نقش ژن DREB1 در القای مقاوت به تنش خشکی باشد. همبستگی مثبت و معنی‌دار میان میزان بیان ژن‌های کاتالاز و DREB1 ($r = 0/725$) (= نشان می‌دهد هر دو ژن تحت تنش خشکی القاء شده و در ایجاد مقاوت به تنش خشکی واجد نقش احتمالی هستند. به‌طور کلی رقم DPX و لاین WE6 با داشتن خصوصیات مطلوب مورفولوژیک و شرایط بهینه بیان ژن تحت تنش خشکی وضعیت بهتری نسبت به رقم ساری نشان دادند که بیانگر مقاوت بیشتر آن‌ها به تنش خشکی بود.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱۲-۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.