

الگوی بیان ژن‌های القایی در واکنش به تنش خشکی در کلزا (*Brassica napus*)

Induced Genes Expression Pattern in Response to Drought Stress in Repeeed (*Brassica napus*)

سعید نواب‌پور

استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۶

چکیده

نواب‌پور، س. ۱۳۹۲. الگوی بیان ژن‌های القایی در واکنش به تنش خشکی در کلزا (*Brassica napus*). مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۹: ۵۴۹-۵۳۵.

به منظور مطالعه تاثیر سطوح تنش خشکی بر گیاه کلزا آزمایشی در شرایط گلخانه انجام شد. بذر رقم فالکون در بستر سبک کاشته و پس از بهاره‌سازی به گلخانه تحقیقاتی منتقل شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با پنج تکرار انجام شد. سطوح تیمار خشکی شامل ۰، ۱، ۲، ۴، ۶ و ۱۰/۵- بار بر حسب مقدار آب مورد نیاز در تکرارهای هر تیمار محاسبه شد. نمونه‌برداری برای محاسبه شاخص بیوشیمیایی TBARM و میزان کلروفیل به صورت ماهانه و تکراردار انجام شد. نمونه برداری تصادفی و تکراردار برای انجام مطالعات مولکولی و بررسی بیان ژن‌ها نیز در زمان حداکثر رشد رویشی انجام شد. صفات مورفولوژیک مورد بررسی تعداد برگ، سطح برگ، روز تا گلدهی و وضعیت ظاهری بودند. نتایج نشان داد با افزایش میزان تنش خشکی اغلب صفات مورفولوژیک افت قابل توجهی داشتند. میزان کلروفیل نیز وضعیت مشابهی را داشت، در مقابل شاخص TBARM (شاخص اکسیداسیون سلولی) با افزایش میزان تنش افزایش چشمگیری نشان داد. تیمار تنش خشکی ۱۰/۵- بار موجب افت معنی‌داری در میزان صفات و بیان ژن‌های فتوسنتزی نشد. کاهش معنی‌دار میزان صفات، افزایش شاخص TBARM و تغییرات جهت دار بیان ژن‌ها در تنش ۲- بار تشدید شد. فعالیت اغلب ژن‌های القای تحمل به خشکی در تیمار ۱- بار بیشتر شد و با تشدید تنش خشکی افزایش یافت. انطباق قابل توجهی بین واکنش صفات زراعی، شاخص‌های بیوشیمیایی و روند تغییرات بیان ژن‌ها در پاسخ به سطوح تنش خشکی ملاحظه شد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، بیان ژن، تنش خشکی، کلروفیل، شاخص اکسیداسیون سلولی.

مقدمه

دانه‌های روغنی پس از غلات، دومین ذخایر غذایی جهان را تشکیل می‌دهند. این محصولات علاوه بر دارا بودن ذخائر غنی اسیدهای چرب، حاوی پروتئین نیز هستند. در این میان کلزا به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی در سطح جهان مطرح است. آمار منتشره از سوی سازمان خواربار و کشاورزی جهانی نشان می‌دهد کلزا پس از سویا و نخل روغنی، سومین منبع تولید روغن نباتی جهان به شمار می‌رود. روغن کلزا در مقام مقایسه با روغن حاصله از دانه‌های روغنی ممتاز، نظیر آفتابگردان، ذرت و سویا به دلیل حضور اسیدهای چرب اشباع نشده و فقدان کلسترول کیفیت تغذیه‌ای بالایی دارد (Shariati and Ghazi-shahinzadeh, 2000).

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. تنش خشکی زیاد باعث کاهش فتوسنتز، اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی و سرانجام خشک شدن و مرگ گیاه می‌شود (Amiri Oghan et al., 2002)؛ (Shao et al., 2005). گیاهان زراعی از نظر ظرفیت جذب آب، تعرق و واکنش نسبت به تنش خشکی عکس‌العمل متفاوتی دارند. فرایندهای فیزیولوژیکی در گیاهان عمدتاً تابع وضع آب در گیاه هستند و تنها به طور غیر

مستقیم تحت تاثیر تنش آب در خاک و هوا قرار می‌گیرند (Bayoumil et al., 2008). بنابراین مقدار معینی تنش آب در خاک، الزاماً همان مقدار تنش در گیاه ایجاد نخواهد کرد. این تفاوت در میزان تنش تابع عواملی چون مقاومت در برابر جریان آب در خاک که با محتوای آب تغییر می‌کند. مقاومت در برابر حرکت آب از روزنه‌ها به هوا که با شرایط جوی تغییر می‌کند و مهم‌تر از همه مقاومت در برابر حرکت آب در ریشه‌ها و سایر بافت‌های گیاهی که به عوامل فیزیولوژیکی و ساختار ژنتیکی بستگی داشته و به هیچ وجه ثابت نیست. بنابراین، معمولاً پیش‌بینی وضع آب در گیاه، به تنهایی از روی شرایط خاک یا هوا امکان‌پذیر نیست و ممکن است یک گیاه با وجود رطوبت زیاد در خاک پژمرده شود و یا با وجود خشکی نسبی خاک شاداب بماند (Bery, 2007).

بر این اساس اتکا به پتانسیل ژنتیکی ارقام و تلاش در جهت بهبود و اصلاح ژنتیکی آن‌ها نقش اساسی در القای تحمل به خشکی ایجاد می‌کند. از آنجا که اصول بنیادی هر برنامه به‌نژادی از طریق مطالعه پارامترهای ژنتیکی تعیین می‌شود، لذا آگاهی از نحوه و اثر ژن‌ها در حصول موفقیت برنامه‌های به‌نژادی ضروری است. در این ارتباط تحقیقات یانگ و همکاران (Yang et al., 2011) در شناسایی ژن‌های درگیر در سنتز پروتئین‌های گروه GRAS در کلزا مبین نقش برجسته این پروتئین‌ها در القای تحمل نسبی به خشکی با افزایش راندمان

مولکول‌های انتقال پیام (Signaling Molecules) در فرآیند بیان ژن‌ها است (Gautam and Stein, 2011)؛ (Larkindale *et al.*, 2005).

با توجه به تحقیقات انجام شده این مطالعه به منظور بررسی اهمیت و ارزیابی الگوی بیان ژن‌های دفاعی مهم در واکنش به تنش خشکی و ارتباط بیان این ژن‌ها و برخی صفات وابسته در کلزا انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذر رقم فالکون (*Brassica napus* cv. Faclon) در شرایط بستر سبک (کوارتز، ماسه، پرلیت و کوکوپیت به نسبت ۳۰، ۳۰، ۲۰ و ۲۰ در صد) کشت و در مرحله چهاربرگی جهت بهاره‌سازی به مدت شش هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن به شرایط گلخانه تحقیقاتی با میزان روشنایی ۱۶ ساعت و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۶ درجه سانتی‌گراد در شب منتقل شد. در ابتدا در هر گلدان بزرگ ۲۰ کیلوگرمی سه بوته و پس از استقرار کامل به یک بوته تنک شد.

سطوح تیمار خشکی مشتمل بر مقادیر ۰/۵-، ۱-، ۲-، ۴-، ۶- بار بر اساس مقدار معادل حجم آب مورد نیاز در تکرارهای هر تیمار آبیاری شد. آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی به عنوان شاهد نیز اعمال شد. دوره آبیاری پس از انتقال به گلخانه تحقیقاتی به طور

فوتوسنتز و تجمع پروتئین‌های محلول بود. بیان ژن‌های مزبور در افزایش نسبی میزان کلروفیل و ثبات آن نیز تاثیر قابل توجهی داشت. مطالعات گسترده چن و همکاران (Chen *et al.*, 2010) در کلزا تحت شرایط تنش سنگین خشکی و شوری نشان دهنده همبستگی قابل توجه تاثیر این تنش‌ها در سطح مولکولی بود. در این راستا گروه‌های مختلفی از ژن‌های درگیر شامل ژن‌های سنتز آنزیمی، فاکتورهای کنترلی (Regulatory Factor)، عوامل رونویسی (Transcription Factor)، هورمون‌ها و پروتئین‌های هموستاتیک شناسایی شدند. از جمله رخدادهای مهم ناشی از تاثیر تنش‌های محیطی و از آن جمله تنش خشکی، افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن است. این رادیکال‌ها به ویژه در غلظت‌های بالا پتانسیل اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی سلول نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها را دارا هستند. این رادیکال‌ها از طرفی با آسیب به غشای سلولی و ایجاد اختلال در تبادلات جذب موجب تغییر پتانسیل اسمزی سلول می‌شوند (Golden *et al.*, 2002). با این حال غلظت‌های متعادل رادیکال‌های اکسیژن در القای سازگاری نسبی گیاه برای ایجاد تحمل در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده حائز اهمیت است. از جمله سازوکارهای شناخته شده در این ارتباط فعالیت مقاومت سیستمیک القایی (Systemic Acquired Resistance: SAR) و عملکرد رادیکال‌های مزبور به عنوان

$$\text{chl b (mgml}^{-1}\text{)} = 20.31A646.6-4.91A663.6$$

$$\text{chl (mgml}^{-1}\text{)} = 16.76A646.6-6.34A663.6$$

برای اندازه‌گیری TBARM که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است مقدار اسید تیوبار بی تیوریک که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ حیاتی است اندازه‌گیری می‌شود. در این خصوص از روش هگگ و همکاران (Hagege *et al.*, 1990) با تغییراتی استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ را هموژنیزه نموده و یک میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (15% w/v) به آن اضافه شد. محلول حاضر را با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به شدت مخلوط کرده (ورتکس) و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب کوچکی که پس از سانتریفوژ حاصل شد را با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو داده، ورتکس و مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر H_3PO_4 1% و یک میلی‌لیتر اسید تیوباریوریتیک (0.6% w/v) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای 100°C قرار داده شد سپس واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف شد. مقدار جذب محلول حاصل با طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Uvikon 930 Watford) اندازه‌گیری شد.

دورگ‌گیری RNA با کاوشگر DNA نشاندار

ثابت و به صورت هفتگی انجام شد.

آزمایش در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با پنج تکرار انجام شد. نمونه‌برداری برای محاسبه شاخص بیوشیمیایی (Thiobarbituric Acid Reactive Material) TBARM و میزان کلروفیل در مورد هر تیمار پنج روز پس از اعمال آبیاری در تیمار مربوطه و در مرحله آغاز گلدهی در پنج تکرار انجام شد. نمونه‌برداری تصادفی و تکراردار برای انجام مطالعات مولکولی و بررسی بیان ژن نیز به در زمان حداکثر رشد رویشی انجام شد. صفات فنوتیپی شامل تعداد برگ، سطح برگ، روز تا ۵۰٪ گلدهی و وضعیت ظاهری ثبت شد. در مورد وضعیت ظاهری رتبه‌دهی بر حسب رتبه ۱ برای شاهد و رتبه ۵ به بدترین وضعیت در تیمار ۶- بار اختصاص داده شد و رتبه‌های ۲ تا ۴ نیز به ترتیب وضعیت نسبی حد واسط را نشان می‌دهند.

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل از روش پورا و همکاران (Porra *et al.*, 1989) استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ (به صورت یخ زده) کاملاً خرد و یکنواخت و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شد. پس از سانتریفوژ میزان جذب (A) در طول موج‌های ۶۴۶/۶، ۶۶۳/۶ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Uvikon watford) ثبت شد. میزان کلروفیل a و کلروفیل b و کلروفیل کل بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شد:

$$\text{chla (mgml}^{-1}\text{)} = 12.25A663.6-2.55A646.6$$

فسفر رادیو اکتیو (لکه‌گذاری نورترن)

تکنیک لکه‌گذاری نورترن از روش‌های مرسوم در اندازه‌گیری میزان نسخه‌برداری ژن است. این روش اگر کمی نیست ولی از تکرارپذیری و دقت قابل قبولی برخوردار است (Butt *et al.*, 1998). در ابتدا انتقال RNA به ژل آگارز و الکتروفورز آن انجام شد. پس از حذف قسمتهای اضافی ژل، RNA به غشای نایلونی (Amersham) Hybond N+ با افزودن ۵٪ NaOH مولار در مدت حداقل ۱۰ ساعت منتقل شد. به منظور انجام دورگ‌گیری ابتدا کاوشگرهای DNA (جدول ۱) به وسیله ستون سفاروز خالص‌سازی شد. مرحله مقدماتی پیش‌هیبرید با قرار دادن غشای نایلونی حامل RNA در بافر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (7%SDS, 250 mM Sodium phosphate pH7.2) به مدت یک شب در شیکر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد تک‌رشته را در محیط بافری به غشاء حامل RNA افزوده و مجدداً به مدت یک شب در شیکر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. غشاء را با محلول 0.2×SSC/1%SDS شستشو و سپس از خشک کردن در کاست فیلم x-ray در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کرده و سپس ظاهر شد.

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیک

وضعیت ظاهری گیاه و میزان تغییرات آن با انجام رتبه‌دهی در اوایل گلدهی صورت پذیرفت. به طور کلی در مورد کلیه صفات مورفولوژیک تفاوت معنی‌داری بین شاهد (آبیاری کامل) و تیمار ۰/۵- بار ملاحظه نشد. این مسئله در مورد میزان کلروفیل، نیز صادق بود. تغییرات محسوس و معنی‌دار صفات مورفولوژیک مورد ارزیابی بین تیمار شاهد و تیمارهای ۲- و ۴- بار کاملاً مشهود بود. در مورد تیمار ۶- بار وضعیت متفاوتی ملاحظه شد، به گونه‌ای که فنوتیپ ظاهری و سایر صفات مورفولوژیک افت چشمگیری نشان دادند. گیاهان زودرس شده و در عین حال زردی برگ‌ها شدیدتر و تعداد برگ‌ها نیز کاهش نشان دادند. در مورد اغلب صفات، تیمارها به سه گروه تقسیم شدند. عموماً تفاوت معنی‌داری بین شاهد و ۰/۵- ملاحظه نشد، همچنین در مورد برخی صفات اختلاف آماری بین تیمار ۰/۵- و ۱- وجود نداشت (جدول ۲).

میزان کلروفیل

تغییرات میزان کلروفیل تحت تاثیر تنش خشکی روند کاهش خطی داشت (شکل ۱). تشابه قابل توجهی در روند تغییرات صفات مورفولوژیک و میزان کلروفیل تحت تاثیر تیمارهای تنش دیده شد و در اغلب موارد همبستگی مثبت و معنی‌داری ملاحظه شد.

جدول ۱ - لیست ژن‌های مورد مطالعه به همراه نقش آن‌ها
Table 1. Gene information and their putative roles

علامت اختصاری	نام همسانه	پروتئین یا نقش مفروض	منابع
code	Clone name	Protein or putative role	References
C7	Cyctein protease	آنزیم تجزیه پروتئین	Navabpour <i>et al.</i> , 2003
C12	Cyctein protease	آنزیم تجزیه پروتئین اختصاصی مرحله پیری برگ	Noh and Amasino, 1999
Mt1	Metallothionein	پروتئین پاداکسیدان	Navabpour <i>et al.</i> , 2003
C94	PR1a Protein Resistance I	پروتئین القای تحمل علیه عوامل بیماریزا Protein resistance gene	Buchanan Wollaston, 1997
Lhcb	Light harvesting complex	پروتئین کمپلکس مانع از تنش تشعشع نوری	Escoubas <i>et al.</i> , 1995
RBCS	Rubisco photosynthetic gene	پروتئین آنزیمی ربیسکو	Mackerness <i>et al.</i> , 1999
CAT1	Catalase gene	پروتئین آنزیمی کاتالاز با نقش کنترل میزان H ₂ O ₂	Buchanan Wollaston, 1997
C6	basic Helix-Loop-Helix (bHLH)	عامل رونویسی	Navabpour <i>et al.</i> , 2007
SOD1	Super oxide gene I	پروتئین آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز با نقش کنترل میزان یون سوپر اکسید SOD protein that control super oxide ion level	Mackerness <i>et al.</i> , 1999

مشترک هستند. از این نظر تنش خشکی نیز استثنا نیست. اساساً با اعمال تنش خشکی میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) افزایش یافته و چنانچه واکنش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی، سطح مناسب این رادیکال‌ها را تعدیل نکند تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد. در پی آن خساراتی نظیر آسیب غشای سلولی، افزایش بیش از حد اکسیداسیون چربی‌ها حاصل می‌شود. با تشدید این امر مولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها و DNA نیز در معرض خطر قرار گرفته و نهایتاً پیری سلولی و پس از آن نکروز و مرگ سلول رخ می‌دهد. با توجه به موارد

(جدول همبستگی نشان داده نشده است). وجود چنین همبستگی بالایی در سایر مطالعات نیز گزارش شده است. بر این اساس میزان کلروفیل به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی با ثبات و قابل اعتماد برای ارزیابی تحمل نسبی به تنش خشکی مد نظر است. نتایج سایر تحقیقات نیز مؤید این مسئله است (Shao *et al.*, 2005؛ Farshadfar and Javadinia, 2011؛ Dhanda *et al.*, 2004).

سنجش TBARM

از دیدگاه مولکولی اغلب تنش‌های محیطی از جنبه افزایش فرآیندهای اکسیداتیو

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک کلزا در تیمارهای تنش خشکی

Table 2. Mean comparison of phenotypic traits of rapeseed in drought stress treatments

وضعیت ظاهری	روز تا ۵۰٪ گلدهی	سطح برگ	تعداد برگ	تیمار خشکی
Visual scoring	Day to 50% flowering	Leaf area (cm ²)	Leaf number	Drought treatment (Water potential-bar)
1.0a	211.7a	712.5a	29.3a	شاهد (آبیاری کامل) Control (Full irrigation)
1.3ab	208.1a	681.3a	27.6ab	-0.5
1.8b	185.7b	547.1b	15.3bc	-1
2.8c	176.5bc	462.8c	23.9c	-2
3.8d	167.1c	301.2d	18.2d	-4
5.0e	148.9d	160.1e	10.1e	-6

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ هستند (آزمون چند دامنه دانکن).

Means in each column with similar letters are not significant different at 5% level of probability (Duncan's multiple range test).

وضعیت ظاهری گیاه بر مبنای رتبه‌دهی یک تا پنج تعیین شد (عدد ۱ برای فنوتیپ شاهد و عدد ۵ برای بدترین فنوتیپ در تیمار ۶- بار و مقادیر حدواسط به طور نسبی در نظر گرفته شد).

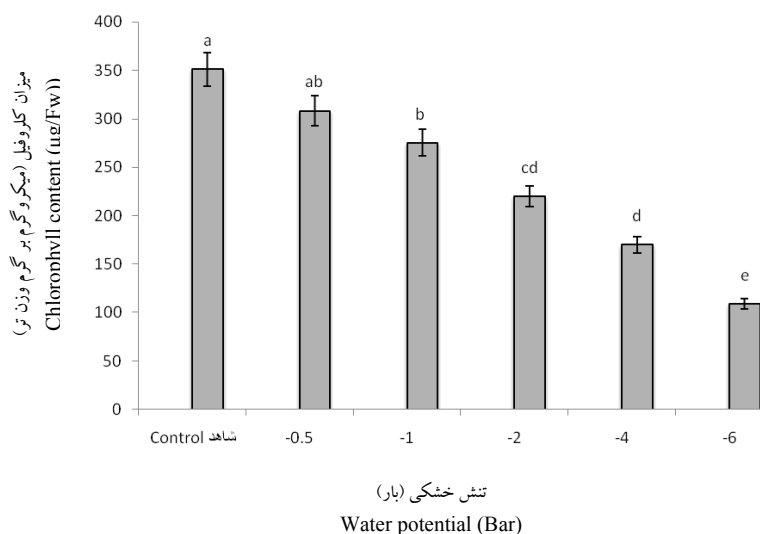
Visual scoring: score 1 shows no significant difference compared with control, score 5 is the worst appearance at -6 bar, score 2-4 are intermediate points between tow extremes.

و کاهش میزان کلروفیل با بالا رفتن شدت تنش انطباق زیادی نشان داد. نتایج برخی آزمایش‌ها نشان می‌دهد که با افزایش تنش، غلظت منیزیم در برگ کاهش می‌یابد. با توجه به این که منیزیم یک عنصر ضروری در ساختمان کلروفیل است، این موضوع می‌تواند کاهش کلروفیل را توجیه نماید. از طرفی انواع رادیکال‌های فعال اکسیژن سبب بی رنگ شدن یا اضمحلال رنگدانه کلروفیل می‌شود (Mauchamp and Methy, 2004). هم‌چنین تنش خشکی با افزایش غلظت انواع اکسیژن فعال، تولید و فعالیت آنزیم‌های کلروفیل‌از و پراکسیداز را در جهت تجزیه کلروفیل تشدید می‌کند (Huber et al., 1998).

بیان ژن‌های القایی

الگوی افتراقی بیان برخی ژن‌های مهم

مذکور ارزیابی ساده و سریع میزان تنش اکسیداتیو حایز اهمیت است. در این راستا اندازه‌گیری میزان TBARM به عنوان شاخصی از میزان اکسیداسیون سلولی و پراکسیداسیون چربی‌ها کارآیی قابل قبولی دارد (Hagege et al., 1999). با افزایش شدت تنش خشکی میزان TBARM افزایش یافت، البته کاهش مقدار نسبی آن در تنش ۶- نسبت به ۴- بار تنها استثنا در این روند بود (شکل ۲). به نظر می‌رسد شدت تنش ۶- بار با سرعت بالایی منجر به بروز تنش اکسیداتیو و مرگ سلول‌ها شده و در فاصله پنج روز تا اندازه‌گیری، افت میزان TBARM آن را سبب شده است. در مقابل تفاوت معنی‌داری بین میزان TBARM شاهد (آبیاری کامل) و تیمار ۵/۰- بار دیده نشد. به طور کلی روند افزایش میزان TBARM

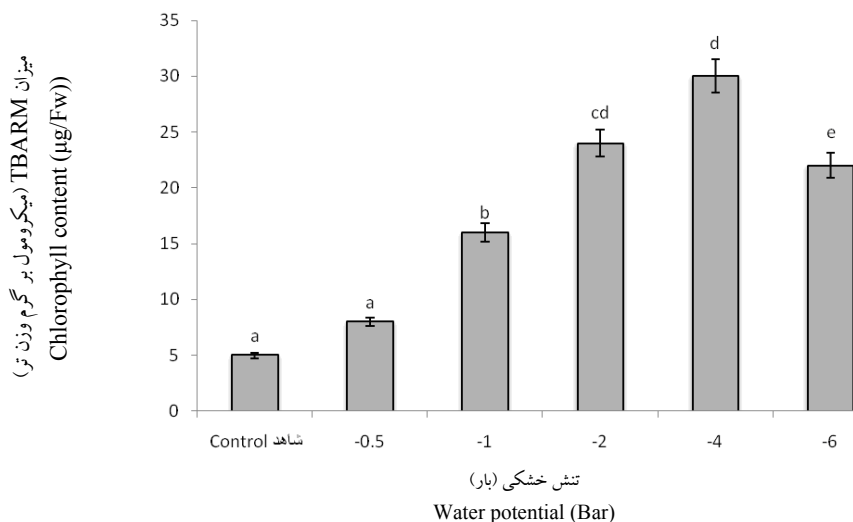


شکل ۱- تغییرات میانگین میزان کلروفیل در بافت برگ کلزا پنج روز پس از انجام آخرین آبیاری در مرحله آغاز گلدهی

Fig. 1. Changes of mean chlorophyll content in leaves of rapeseed at flowering stage five days after the last irrigation

ستون‌ها با حرف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

Bars with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.



شکل ۲- تغییرات میزان TBARM در بافت برگ کلزا پنج روز پس از انجام آخرین آبیاری در مرحله آغاز گلدهی

Fig. 2. Changes of TBARM in leaf tissue of rapeseed at flowering stage five days after the last irrigation

ستون‌ها با حرف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

Bars with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.

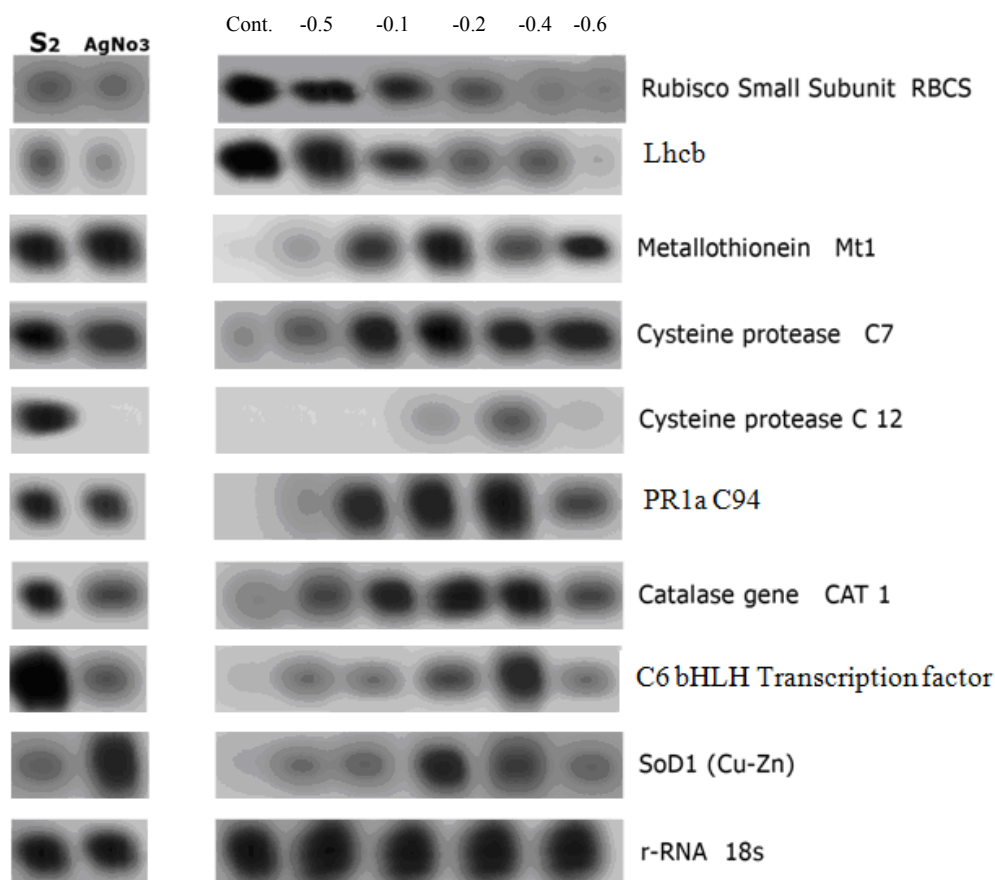
یک نقطه حداکثری (آستانه) نسبت به یک عامل محرک (نظیر تنش) واکنش مثبت نشان داده و از آن پس به دلیل عدم وجود پتانسیل کافی برای واکنش روند کاهش فعالیت قابل انتظار خواهد بود. ژن MTI رمز کننده پروتئین متالوتائینین است و نقش مهم آن سم‌زدایی اثر سوء فلزات سنگین در سلول است (Murphy and Taiz, 1995). از طرفی شواهد انکارناپذیری در نقش این ژن در خلال پروسه پیری وجود دارد به نظر می‌رسد این ژن در کمک به بقای سلول به منظور انتقال کلیه مواد پروتئینی و ذخیره‌ای به دانه و اندام‌های ذخیره‌ای فعالیت مهم و موثری می‌کند (نی‌پور و همکاران، ۲۰۰۳؛ Butt *et al.*, 1998).

همسانه C94 (PR1 a) رمز کننده پروتئین القاء مقاومت نسبت به بیمارگرها، الگوی بیان مشابهی با ژن MTI نشان داد (شکل ۳). این ژن نیز در فرایند پیری و تنش اکسیداتیو (تیمار نیترات نقره) افزایش فعالیت قابل توجهی نشان داد. به نظر می‌رسد این ژن نسبت به اغلب تنش‌های محیطی اعم از زنده و غیر زنده واکنش نشان می‌دهد. نتایج مطالعات مختلف مبین افزایش بیان این ژن تحت تاثیر پرتو فرا بنفش (Jansen *et al.*, 1998)، تیمارهای شیمیایی تنش‌زا (Navabpour *et al.*, 2003)، محرک‌های القای پیری زودرس (Gan and Amasino, 1997) و برخی تیمارهای دیگر شامل هورمون ABA، تاریکی، خشکی و اتیلین است

دفاعی و القایی با استفاده از تکنیک لکه‌گذاری نورترن تحت تاثیر تنش خشکی بررسی شد. میزان بیان ژن‌های فتوسنتزی نظیر RBCS (RUBISCO: Rubisco small sub unit) و (Light harvesting complex binding proteins) Lhcb با افزایش شدت تنش خشکی کاهش نشان دادند. شدت کاهش برای تیمار ۱- و به ویژه ۰/۵- بار چندان زیاد نبود اما کاهش محسوسی در میزان بیان این ژن‌ها در تیمار ۲- بار ملاحظه شد. در مورد تیمارهای تنش ۴- و به طور اخص ۶- بار مقدار کاهش به طور چشمگیری ملاحظه شد (شکل ۳). روند کاهش بیان ژن‌های فتوسنتزی طی تنش خشکی قابل انتظار بود. نتایج مشابهی توسط سایر محققین با کاربرد سایر تیمارهای تنش‌زا گزارش شده است (Navabpour *et al.*, 2003؛ Mackerness *et al.*, 1999).

همسانه MTI (Metallothionein) که سطح بیان بالایی طی پروسه پیری و تحت تیمار اکسیداتیو نیترات نقره داشت الگوی بیان جالب توجهی طی اعمال سطوح تنش خشکی نشان داد (شکل ۳). این ژن در تیمار شاهد هیچ‌گونه فعالیتی نشان نداد و با کاهش پتانسیل آب تا سطح ۲- بار روند افزایشی خطی نشان داد و از آن پس تحت تاثیر تیمارهای ۴- و ۶- بار کاهش نسبی نشان داد. چنین الگوی بیانی در مورد بسیاری از ژن‌ها و فعالیت‌های متابولیکی آرزیم‌ها دیده می‌شود. به نظر می‌رسد عوامل کنترلی بیان ژن‌ها با بیشترین ظرفیت ممکن تا

تنش خشکی Drought stress (bar)



شکل ۳- الگوی بیان همسانه‌های مورد مطالعه با استفاده از تکنیک لکه گذاری نورترن. با استخراج RNA پنج روز پس از اعمال تیمارهای آزمایشی و انتقال آن به غشاء حساس نایلونی پروب رادیواکتیو همسانه‌های فوق انجام و با ظهور فیلم رادیوگرافی نتایج مرتب شد. S₂: مرحله ۲ پیری آغاز زرد شدگی برگ‌ها. AgNO₃ (نیترات نقره) با غلظت ۲mM بر روی برگ‌ها اسپری و پس از دو روز نمونه برداری انجام شد.

Fig. 3. Gene expression pattern based on northern blot analysis technique. RNA was extracted from leaf tissue at flowering stage, five days after irrigation. Then RNA was blotted to Nylon membrane and probed with selective ³²P labelled gene fragments, result has ordered after x-ray film was produced.

S₂: Senescent leaves stage 2

Agno 3: Silver nitrate was sprayed (2mM) on leaves and samples were taken 2 days after spray.

چنین به نظر می‌رسد که این ژن نسبت طیف نسبتاً وسیعی از رادیکال‌ها در جهت افزایش بیان واکنش نشان می‌دهد.

همسانه‌های CAT1 و SOD1 که به ترتیب

(Santamaria et al., 2001)

(Ging et al., 2009). از آن‌جا که اعمال کلیه

تنش‌های مذکور و از آن‌جمله حمله بیمارگرها

با افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن همراه است

نداشت. در مورد همسانه C₇ در سطوح پائین تیمار خشکی از ۰/۵- به ۱- بار افزایش محدود بیان و از آن پس در کلیه تیمارها میزان چشمگیر بیان ژن به طور ثابت دیده شد (شکل ۳). در حالی که همسانه C₁₂ که از ژن‌های اختصاصی بیان شده در خلال فرایند پیری است و نسبت به تیمار اکسیداتیو نترات نقره کوچک‌ترین واکنشی نشان نمی‌دهد. به طور جالب توجهی در سطوح بالای تیمار خشکی به ویژه ۴- بار بیان نسبتاً محسوسی نشان داشت.

همسانه C₆ از ژن‌های همسانه شده با استفاده از تکنیک AFLP- cDNA بود (Navabpour *et al.*, 2007). این همسانه بر اساس اطلاعات پایگاه ژنتیکی توالی‌یابی با ژن کیناز مشابهت کاملی نشان داد. این ژن به عنوان یک فاکتور رونویسی عمل می‌کند و از این جهت که می‌تواند بیان مجموعه‌ای از ژن‌های ساختاری و عملیاتی را کنترل کند حائز اهمیت زیادی است. این ژن الگوی بیان جالب توجهی داشت به طوری که در سطوح پائین تنش خشکی (۱- و ۰/۵-) افزایش بیان زیادی نداشت و پس از آن افزایش فعالیت به طور خطی افزوده و در ۴- بار به حداکثر مقدار رسید و در تیمار ۶- بار کاهش شدیدی نشان داد. از طرفی این ژن در خلال پروسه پیری بیان بالایی داشت. در حالی که تیمار اکسیداتیو نترات نقره واکنش چندان قوی نشان نداد. براساس نتایج حاصله مطالعه و بررسی رفتار این همسانه به ویژه در سطح راه انداز آن موضوع بسیار جالبی تلقی

رمزکننده آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز هستند الگوی بیان نسبتاً مشابهی داشتند هرچند میزان واکنش ژن کاتالاز نسبت به تشدید تیمار خشکی بیشتر بود. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نقش منحصر به فردی در پاکسازی یون سوپراکسید (O₂⁻) و تبدیل آن به آب و پراکسید هیدروژن دارد. در ادامه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز پاکسازی می‌شود. غلظت‌های متعادل رادیکال‌های مذکور به عنوان فاکتورهای سیگنالی حائز اهمیت هستند. از این رو این ژن‌ها که واجد نقش کنترلی و تنظیم تعادل نسبی رادیکال‌های آزاد هستند در سامان‌دهی فعالیت‌های متابولیکی سلول نقش مهمی دارند (Mackerness *et al.*, 1999).

همسانه C₇ و C₁₂ کدکننده پروتئین‌های آنزیمی سیستمین پروتئاز هستند که نقش آن‌ها شکستن زنجیره پلی‌پپتیدی پروتئین‌های بزرگ و تجزیه آن‌ها به اسیدهای آمینه است. اهمیت این مسئله در خلال فرآیند تنش با توجه به تنظیم اسمزی فشار سلولی و انجام تبادلات انتخابی غشاء فوق‌العاده زیاد است. از طرفی از آنجا که تداوم شرایط تنش و یا تشدید مقدار آن منجر به نکروز و در نهایت مرگ سلول می‌شود، انتقال مواد ذخیره‌ای (مولکول‌های بزرگ) تنها از طریق تجزیه و تفکیک آن‌ها به اجزای کوچک‌تر امکان‌پذیر می‌باشد (Munne-Bosh and Alegre, 2004). الگوی افتراقی بیان این دو همسانه شباهت چندان

معنی‌دار صفات مورد بررسی امکان‌پذیر باشد. عموماً کاهش معنی‌دار میزان صفات مطلوب مورد بررسی، افزایش شاخص اکسیداسیون سلولی و تغییرات جهت‌دار بیان ژن‌های مورد ارزیابی در تنش ۲- بار تشدید شود. فعالیت اغلب ژن‌های القایی مقاومت در تیمار ۱- بار بیشتر شد و با تشدید تنش خشکی افزایش یافت. از نتایج قابل ملاحظه فعالیت ژن اختصاصی پیری (همسانه C12) بود که در تیمار تنش ۴- بار افزایش چشمگیری نشان داد، این مسئله که مبین مسیر مشترک ژنتیکی فعالیت این همسانه بود موضوع جالبی برای تحقیقات بعدی به نظر می‌رسد.

می‌شود. در این تحقیق تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر برخی خصوصیات مهم زراعی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌های القایی در کلزا بررسی شد. نتایج نشان داد که تنش ۰/۵- بار تاثیر منفی زیادی بر صفاتی چون تعداد و سطح برگ، زمان گلدهی و میزان کلروفیل نداشت. میزان شاخص اکسیداسیون سلولی نیز در تیمار مزبور در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. به همین ترتیب افت بیان ژن‌های فتوسنتزی مورد مطالعه نیز در تیمار ۰/۵- بار محسوس نبود. بر اساس این نتایج چنین به نظر می‌رسد که صرفه‌جویی در میزان آب آبیاری بدون بروز افت

References

- Amiri Oghan, H., Moghadam, M., Ahmadi, M. R., Valizadeh, M., and Shakiba, M. R. 2002.** Heritability of seed yield and yield components in rapeseed (*Brassica napus*) under drought stress and normal conditions. *Seed and Plant* 18: 179-199 (in Persian).
- Bayoumil, T. Y., Manal, H. E., and Metwali, E. M. 2008.** Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology* 7(14): 2341-2352.
- Bery, E. A. 2007.** *Molecular and Physiological Responses to Water Deficit Stress.* Department of Genetics and Cell Biology, University of Chicago, USA.
- Buchanan-Wollaston, V. 1997.** The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 48: 181-199.
- Butt, A., Mousley, K., Morris, K., Beynon, J., Can, C., Holub, E., Greenberg, J. T., and Buchanan-Wollaston, V. 1998.** Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* 16(2): 209-221.

- Chen, L., Ren, F., Zhong, H., Jiang, W., and Li, X. 2010.** Identification and expression analysis of genes in response to high-salinity and drought stresses in *Brassica napus*. *Biochimica Biophysica Acta* 42(2): 154-164.
- Dhanda, S. S., Sethi, G. S., and Behl, R. K. 2004.** Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. *Journal of Agronomy and Crop Science* 190(1): 6–12.
- Escoubas, P., Lajide, L. and Mizutani, J. 1995.** Termite antifeedant activity in *Aframomum melegueta*. *Phytochemistry* 40: 1097-1099.
- Farshadfar, E., and Javadinia, J. 2011.** Evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes for drought tolerance. *Seed and Plant Improvement Journal* 27-1 (4): 517-537.
- Gan, S., and Amasino, R. M. 1997.** Making sense of senescence. *Plant Physiology* 113: 313-319.
- Gautam, P., and Stein, J. 2011.** Induction of systemic acquired resistance to *Puccinia sorghi* in Corn. *International Journal of Plant Pathology* 2(1): 43-50.
- Ging, S. H., Zhou, X., Song, Y., and YU, D. 2009.** Heterologous expression of OsWRKY23 gene enhances pathogen defense and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation* 58: 181-190.
- Golden, T. A., Hinerfeld, D., and Melov, S. 2002.** Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* 1(2): 117–123.
- Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J., and Gaspar, T. 1990.** Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis* 1: 86-89.
- Huber, S. C., Israel, D. W., Valadier, M. H., Migge, A., and Becker, T. W. 1998.** Drought induced effects on nitrate reductase activity on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology* 177: 283-292.
- Jansen, M. A. K., Gaba, V., and Greenberg, B. M. 1998.** Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3: 131-135.
- Larkindale, J. D., Hall, J. R., Knight, M., and Vierling, E. 2005.** Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* 138: 882–897.

- Mackerness, S. A. H., Jordan, B. R., and Thomas, B. 1999.** Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet-B radiation (UV-B: 280-320 nm) in green and etiolated buds of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology* 48: 180-188.
- Mauchamp, A., and Methy, M. 2004.** Submergence-induced damage of photosynthetic apparatus in *phragmite saustralis*. *Environmental and Experimental Botany* 51: 227-235.
- Munne-Bosh, S., and Alegre, L. 2004.** Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought atress. *Functional Plant Biology* 31: 203-216.
- Murphy, A., and Taiz, L. 1995.** Comparison of metallothionein gene expression and non-protein thiols in 10 ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiology* 109: 1-10.
- Navabpour, S., Morris, K., Harrison, E., Makerness, S., and Buchanan- Wollaston, V., 2003.** Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 54: 2285-2292.
- Navabpour, S., Bagherieh-Najjar, M.B., and Soltanloo, H. 2007.** Identification of novel genes expressed in *Brassica napus* during leaf senescence and in response to oxidative stress. *International Journal of Plant Production* 1: 35-44.
- Noh, Y. S., and Amasino, R. M. 1999.** Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology*. 41: 181-194.
- Porra, R. J., Thompson, W. A., and Kriedmann, P. E. 1989.** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384-394.
- Santamaria, M., Thomson, C. J., Read, N. D., and Loake, G. J. 2001.** The promoter of a basic PR1-like gene, AtPRB1, from Arabidopsis establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate. *Plant Molecular Biology* 47(5): 641-652.
- Shao, H. B., Liang, M. A., Shao, M. A., and Wang, B. C. 2005.** Changes of some physiological and biochemical indices for soil water deficits among 10 wheat

(*Triticum aestivum*) genotypes at seedling stage. Colloids Surf, B. Biointerfaces 42(2): 107-113.

Shariati, S., and Ghazi-shahinzadeh, P. 2000. Canola. Agricultural Information Affairs, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. 115 pp. (in Persian).

Yang, M., Yang, Q., Fu, T., and Zhou, Y. 2011. Overexpression of *Brassica napus* *BnLAS* gene in Arabidopsis affects plant development and increases drought tolerance. Plant Cell Reports 30: 373-388.

