

تأثیر تنش خشکی بر بیان ژن‌های درگیر در سنتز و هیدرولیز فروکتان در طی انتقال مجدد ذخایر فتوسنتزی ریشه گندم

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

۱- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

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

۴- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۷)

چکیده

در شرایط تنش خشکی که یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد گندم در مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌شود، انتقال مجدد مواد فتوسنتزی به منظور پر کردن دانه‌های گندم اهمیت بیشتری می‌یابد. در مورد اهمیت ریشه در انتقال مجدد طی پر شدن دانه‌ها تحت تنش خشکی اطلاعات اندکی در دسترس است. لاین موتانت پیشرفته گندم نان (T-65-7-1) به همراه تیپ وحشی آن (رقم طبسی) در دو شرایط رطوبتی (مطلوب و ۴۰-۳۰ درصد ظرفیت مزرعه) به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار کشت شدند. نمونه برداری برای آنالیز بیان ژن‌ها در ۲ مرحله (۷ و ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی) از ریشه انجام شد. در این ژنوتیپ‌ها انتقال مجدد و کارایی انتقال مجدد فروکتان و بیان نسبی ژن‌های درگیر در سنتز و هیدرولیز فروکتان در ریشه طی پر شدن دانه‌ها، تحت تنش خشکی انتهایی مطالعه شدند. نتایج نشان داد که فروکتان ذخیره شده در ریشه در انتقال مجدد آسیمیلات‌ها سهیم بود. بیشتر بودن انتقال مجدد فروکتان از ریشه به دانه، تحت تنش خشکی در لاین موتانت به دلیل بالاتر بودن بیان ژن‌های درگیر در سنتز فروکتان (*I-SST* و *6-SFT*) در ۷ روز پس از گرده‌افشانی و هیدرولیز فروکتان (*6-FEH*) در ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی، نسبت به تیپ وحشی بود. تنش خشکی باعث تغییرات معنی‌داری در بیان ژن‌های *1-FFT* و *1-FEH* در ریشه هر دو ژنوتیپ نشد که تأیید کننده این موضوع است که تنها فرم غالب پیوند فروکتان (2,6) β تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفته است. در برنامه‌های اصلاحی گندم، ژن‌های *I-SST*، *6-SFT* و *6-FEH* می‌توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی برای گزینش ژنوتیپ‌هایی با محتوای فروکتان بالاتر و انتقال مجدد بیشتر مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: انتقال مجدد، بیان ژن، خشکی، ریشه، نشانگر مولکولی، موتانت

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: hpahlevani@gau.ac.ir

مقدمه

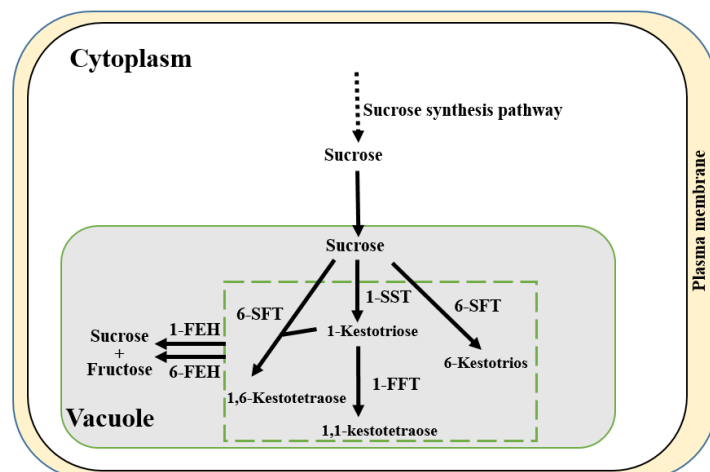
در مناطق خشک و نیمه‌خشک با کاهش بارندگی و افزایش تبخیر از خاک در اواخر فصل رشد، گندم در مراحل زایشی در معرض تنش‌هایی نظیر خشکی و گرما قرار می‌گیرد (Blum, 1998). تنش خشکی یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که رشد و نمو گیاهان را از طریق تغییر در متابولیسم و بیان ژن‌ها تحت تأثیر قرار می‌دهد و به این ترتیب از مهمترین عوامل کاهش عملکرد گندم می‌باشد (Farooq et al., 2014). ایران همواره یکی از کشورهای روبرو بوده است و پیش‌شدیدترین خشکی‌های جهان روبرو بوده است و پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهد که در سال‌های آینده نیز ایران همچنان خشکسالی‌های شدیدی را تجربه کند (Mesgaran et al., 2016). فتوسنتز جاری برگ‌ها و انتقال مجدد مواد ذخیره‌شده در بافت‌های رویشی، دو منبع اصلی تأمین‌کننده کربن در فرآیند پر شدن دانه هستند (Wardlaw and Willenbrink, 2000; Zhang et al., 2016). فتوسنتز جاری برگ‌ها به طور معمول بعد از گلدهی در اثر پدیده پیری ناشی از تنش خشکی کاهش یافته و در نتیجه آن تخصیص آسیمیلات‌های جاری به دانه کاهش می‌یابد (Bazargani et al., 2012). کربوهیدرات‌های محلول در آب می‌تواند در ساقه، غلاف برگ و ریشه گندم طی طویل شدن ساقه تا مراحل اولیه پر شدن دانه‌ها به صورت موقتی تجمع یابند و در پر شدن دانه‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Xue et al., 2013; Lawlor and Paul, 2014). دوره سریع پر شدن دانه‌ها در گندم طی ۱۴ تا ۲۸ روز پس از گرده‌افشانی اتفاق می‌افتد (Shewry et al., 2012). فروکتان بیشترین محتوای کربوهیدرات محلول در آب کل بافت‌های رویشی گندم را تشکیل می‌دهد و از ساکارز مشتق می‌شود (Chalmers et al., 2005; Van den Ende and El-Esawe, 2014). فروکتان، لیگو و پلی ساکاریدهای بر پایه فروکتوز با

پیوندهای $\beta(2,1)$ یا $\beta(2,6)$ می‌باشد که در واکنش ساخته می‌شود (Verspreet et al., 2013). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، سنتز فروکتان توسط ژن‌های *I-SST* (ساکارز: ساکارز-۱) فروکتوزیل ترانسفراز^۱، *6-SFT* (ساکارز: فروکتان-۶) فروکتوزیل ترانسفراز^۲ و *I-FFT* (فروکتان: فروکتان-۱) فروکتوزیل ترانسفراز^۳ صورت می‌گیرد (Van den Ende et al., 2003; Xue et al., 2008b). فروکتان توسط فروکتان اگزوهیدرولازها^۴ (*FEHs*) به ساکارز و فروکتوز هیدرولیز می‌شوند. *FEHs* شامل فروکتان-۱ اگزوهیدرولازها (*1-FEHs*) و فروکتان-۶ اگزوهیدرولازها (*6-FEHs*) می‌باشند که به ترتیب بیشتر باعث شکست پیوندهای $\beta(2,1)$ و $\beta(2,6)$ فروکتان می‌شوند (Van den Ende et al., 2003; Van Riet et al., 2006; Zhang et al., 2009).

در مورد انتقال مجدد ذخایر ساقه به دانه تحت تنش خشکی در گندم مطالعات متعددی انجام گرفته است (Wardlaw and Willenbrink, 2000; Yang et al., 2000; Yang et al., 2004; Ehdaie et al., 2006a; Ehdaie et al., 2006b; Ehdaie et al., 2008; Xue et al., 2009; Zhang et al., 2015). اما در مورد نقش ریشه در انتقال مجدد آسیمیلات‌ها طی پر شدن دانه‌ها تحت تنش خشکی گزارشات اندکی موجود است (Lopes and Reynolds, 2010; Zhang et al., 2016).

در مطالعات قبلی ما مشخص شد که لاین موتانت T-65-7-1 در مقایسه با رقم تیپ وحشی خود (رقم طبسی) به طور معنی‌داری از نظر انتقال مجدد و کارایی انتقال مجدد کربوهیدرات‌های محلول ساقه، بهتر عمل می‌نماید (Bagherikia et al., 2017). علت این امر عملکرد بالاتر و بروز پیری زودرس در لاین موتانت T-65-7-1 نسبت به رقم تیپ وحشی گزارش شد (Bagherikia et al., 2017).

1- Sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST)
2- Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT)
3- Fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT)
4- Fructan exohydrolase (FEH)



شکل ۱- مسیر متابولیسم فروکتان در سلول‌های بافت‌های رویشی (Xue *et al.*, 2008b).

Figure 1. The pathway of fructan metabolism in vegetative tissues cells (Xue *et al.*, 2008b).

خاک با ترکیب رس، ماسه بادی و کود حیوانی به نسبت ۱:۲:۱ کشت شدند. قطر گلدان‌ها ۲۸ سانتی‌متر و عمق آن ۴۰ سانتی‌متر بود و در هر واحد آزمایشی (گلدان) ۱۰ بوته وجود داشت. گیاهان در محیط کنترل‌شده گلخانه با ۱۶ ساعت روز (دما ۲۸ درجه سانتی‌گراد) و ۸ ساعت در تاریکی (دما ۱۸ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت ۶۰-۵۵ درصد و شدت نور حدود ۲۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه، رشد کردند و تا زمان اعمال تنش به طور منظم آبیاری می‌شدند.

اعمال تنش و نمونه‌برداری: اعمال تنش و قطع آبیاری در مرحله زادوکس ۶۰ (ظهور کامل سنبله) انجام شد (Zadoks *et al.*, 1974). رطوبت گلدان‌ها در شرایط شاهد از طریق آبیاری منظم در محدوده ظرفیت زراعی نگهداری شدند، در شرایط تنش خشکی نیز رطوبت گلدان‌ها به وسیله توزین منظم روزانه در حدود ۴۰-۳۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری گردیدند. نمونه‌برداری به صورت تصادفی از ریشه گیاهان از شروع کرده‌افشانی در فاصله‌های زمانی ۷ روزه (در زمان‌های ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از کرده‌افشانی) انجام گرفت. نمونه‌های مربوط به بیان ژن (۷ و ۲۱ روز پس از کرده‌افشانی) پس از فریز شدن در ازت مایع در فریزر

از آنجایی که تا به حال سابقه‌ای در مورد مطالعه بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم و انتقال مجدد کربوهیدرات، تحت تنش خشکی در ریشه گندم موجود نیست به همین دلیل اطلاعات اندکی در مورد الگوی بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم فروکتان، طی پر شدن دانه‌ها تحت تنش خشکی انتهایی در ریشه گندم وجود دارد. بنابراین این پژوهش با هدف بررسی انتقال مجدد فروکتان از ریشه به دانه گندم به همراه مطالعه بیان نسبی ژن‌های درگیر در سنتز و هیدرولیز فروکتان در ریشه گندم تحت تنش خشکی انتهایی فصل انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۳ اجرا شد. مواد گیاهی این پژوهش شامل لاین موتانت نسل هفتم T-65-7-1 حاصل از برنامه اصلاح موتاسیونی سازمان انرژی اتمی ایران با هدف اولیه مقاومت به ورس (با استفاده از پرتوتابی گاما با منشأ کبالت ۶۰) به همراه رقم گندم طبری به عنوان تیپ وحشی آن (رقم والدی) بود. رقم طبری از گندم‌های بومی ایران و متحمل به خشکی است. بذرها در آزمایشگاه جوانه‌دار شدند و گیاهچه‌های دو ژنوتیپ در سه تکرار در گلدان‌هایی حاوی ۱۰ کیلوگرم

تیمار DNaseI کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین گردید. ساخت cDNA به روش پیشنهادی شرکت Fermentas انجام شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس کمی در زمان واقعی (qPCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از فناوری رنگ SYBR Green I (کیت سایبر بیوپارس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) تهیه شدند و در دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad با سه تکرار بیولوژیک اجرا گردیدند.

آغازگرهای مورد استفاده و تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده، جهت ارزیابی الگوی بیان نسبی ژن‌های درگیر در سنتز فروکتان (*1-FEH*، *6-SFT*، *1-SST* و *1-FFT*) و هیدولیز فروکتان (*6-FEH*) و مطالعات پیشین استخراج شدند (جدول ۱) و برخی دیگر با استفاده از نرم افزار AllelID7 طراحی شدند. از ژن *GAPDH* برای کنترل داخلی استفاده شد (Goncalves et al., 2005).

آنالیزهای آماری: ارزیابی سطح بیان نسبی ژن‌ها بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001) نسبت به گیاهان کنترل انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بیان ژن با استفاده از نرم افزار GenEx 6 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1.3 به روش LSD و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای جداسازی ریشه‌ها از خاک چسبیده به آن، ریشه‌ها روی توری سیمی قرار گرفتند و با آب شسته شدند تا خاک از ریشه‌ها به طور کامل جدا شود (Ehdaie et al., 2012).

اندازه‌گیری محتوای فروکتان: به منظور اندازه‌گیری محتوای فروکتان ریشه ابتدا استخراج کربوهیدرات محلول در آب کل با استفاده از اتانول گرم ۸۰ درصد و اندازه‌گیری غلظت کربوهیدرات محلول در آب با روش فنل سولفوریک اسید انجام شد (Dubois et al., 1956). سپس محتوای گلوکز، فروکتوز و ساکارز طبق روش توضیح داده شده توسط حاجی‌رضایی و همکاران (Hajirezaei et al., 2000) اندازه‌گیری شد. با تجزیه فروکتان‌ها و ساکارز توسط اسید پرکلریک ($HClO_4$) میزان افزایش غلظت فروکتوز که نشان‌دهنده غلظت فروکتان‌ها و ساکارز می‌باشد در ادامه با کم کردن سهم ساکارز و فروکتوز اولیه موجود در نمونه غلظت فروکتان‌ها به دست آمد (Hajirezaei et al., 2000).

انتقال مجدد و کارایی انتقال مجدد فروکتان: انتقال مجدد فروکتان ریشه از تفاضل بین حداکثر و حداقل فروکتان پس از گرده‌افشانی محاسبه شد. کارایی انتقال مجدد از نسبت انتقال مجدد به حداکثر محتوای فروکتان به دست آمد (Ehdaie et al., 2006b).

بررسی بیان نسبی ژن‌ها: برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌ها، استخراج RNA کل از ۰/۱ g نمونه‌های تهیه‌شده با استفاده از کیت P-Biozol (Bio Flux) انجام شد. پس از

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در مطالعه انتقال مجدد فروکتان در گندم

Table 1. Specific primer used in the study of fructan remobilization in wheat

نام آغازگر Primer name	توالی (۵' → ۳') Sequence (5' → 3')	دمای ذوب Tm (°C)	طول باند Band size (bp)	منبع Reference
<i>1-SST</i>	F: GCGACTCTGCCTATCACTTC R: CATAGCCCTGTCATCAACAC	60	88	
<i>6-SFT</i>	F: CGATCACTCGTATGTTCAATG R: CACGGATAGATGTTTCTGTTT	60	118	
<i>1-FFT</i>	F: GGTCCGTGGAGCTTCCTTTTAT R: CCGGAACCAAAAACATAAATCAA	60	93	Xue et al., 2008a
<i>1-FEH</i>	R: GCATCACATCCAGAGTTTATCC R: CCCTTCTCCACATTCACCTTG	60	145	
<i>6-FEH</i>	F: GAGCACACGGCTATCTTCTTCA R: CCACTACCGAATGGTCAATCAA	60	193	Khoshro et al., 2014
<i>GAPDH</i>	F: TCACCACCGACTACATGACC R: ACAGCAACCTCCTTCTCACC	60	121	

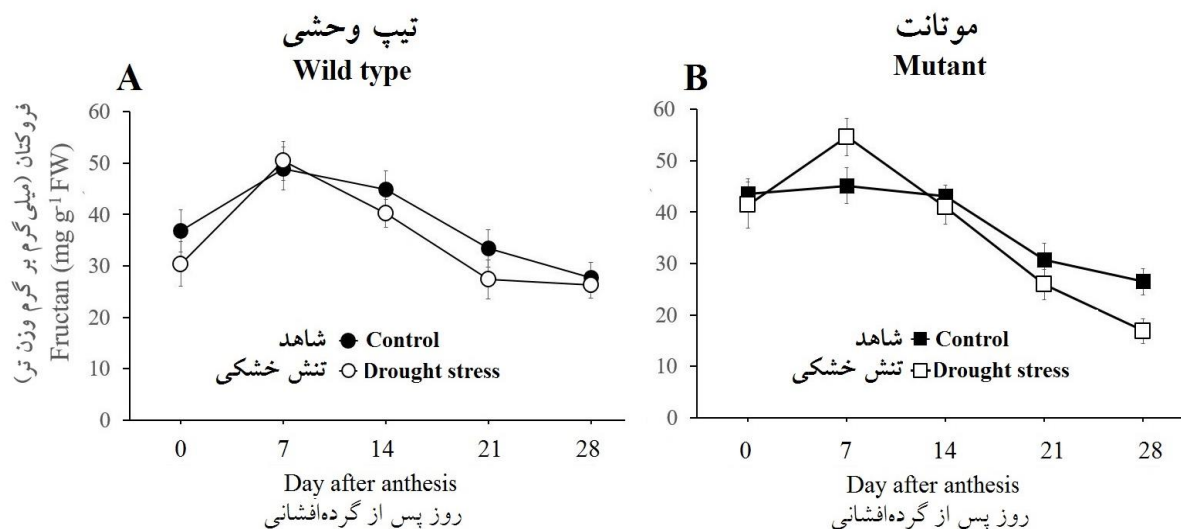
نتایج و بحث

معنی‌دار نبود (جدول ۲). در شرایط شاهد، دو ژنوتیپ از نظر انتقال مجدد و کارایی انتقال مجدد فروکتان ریشه با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند؛ اما در شرایط تنش خشکی در لاین موتانت T-65-7-1 (به ترتیب ۳۸/۶۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و ۶۹/۱۲ درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از رقم تیپ وحشی (به ترتیب ۲۴/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و ۴۷/۸۶ درصد) بود (جدول ۲).

بیان نسبی ژن‌های درگیر در سنتز فروکتان: نتایج نشان داد که تنش خشکی در اوایل دوره پر شدن دانه‌ها باعث افزایش معنی‌داری در سطح بیان نسبی ژن‌های *I-SST*، *6-SFT* در هر دو ژنوتیپ شد، در حالی تنش خشکی تأثیری بر سطح بیان نسبی ژن *I-FFT* در هر دو ژنوتیپ نداشت (شکل ۳). افزایش سطح بیان ژن *I-SST* تحت تنش خشکی در لاین موتانت T-65-7-1 (۸/۷۸ برابر شرایط کنترل) بیشتر از رقم تیپ وحشی (۲ برابر شرایط کنترل) بود. در مورد سطح بیان ژن *6-SFT* نیز همین وضعیت صادق بود، به طوری که افزایش بیان ژن *6-SFT* تحت تنش خشکی در لاین موتانت T-65-7-1 و رقم تیپ وحشی به ترتیب ۴/۲۳ و ۲/۹۷ برابر شرایط کنترل بود (شکل ۳).

دانه‌ها: نتایج نشان داد که در هر دو شرایط رطوبتی روند تغییرات فروکتان ریشه دو ژنوتیپ تقریباً مشابه می‌باشد. به نحوی که پس از گرده‌افشانی با گذشت زمان فروکتان ریشه شروع به افزایش نموده و در ۷ روز پس از گرده‌افشانی، پس از رسیدن به حداکثر، مجدد شروع به کاهش نمود و در ۲۸ روز پس از گرده‌افشانی به مقدار حداقل رسید (شکل ۲). تنش خشکی در لاین موتانت T-65-7-1 باعث افزایش معنی‌دار غلظت فروکتان در ۷ روز پس از گرده‌افشانی شد به طوری که در شرایط تنش خشکی، حداکثر غلظت فروکتان ریشه در لاین موتانت T-65-7-1 بیشتر از رقم تیپ وحشی بود (شکل ۲). در شرایط تنش خشکی غلظت فروکتان ریشه لاین موتانت T-65-7-1 در مقایسه با تیپ وحشی، پس از رسیدن به مقدار حداکثر، با شدت بیشتری کاهش یافت (شکل ۲).

انتقال مجدد و کارایی انتقال مجدد فروکتان ریشه: تنش خشکی در لاین موتانت T-65-7-1 به طور معنی‌داری باعث افزایش انتقال مجدد و کارایی انتقال مجدد فروکتان ریشه شد در حالی که افزایش آن‌ها در رقم تیپ وحشی



شکل ۲- محتوای فروکتان ریشه در (A) تیپ وحشی و (B) لاین موتانت گندم نان در شرایط شاهد و تنش خشکی
Figure 1. Fructan content of the root in bread (A) wild type and (B) mutant line in control and drought stress conditions

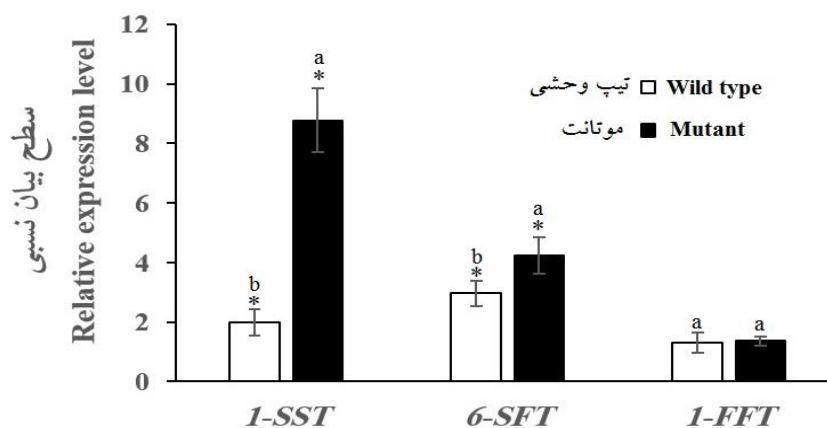
جدول ۲- مقایسه میانگین انتقال مجدد فروکتان و کارایی آن در ریشه ژنوتیپ‌های گندم نان در هر سطح شرایط رطوبتی
Table 2. Mean comparison of fructan remobilization and its efficiency in the root of bread wheat genotypes at each level of moisture conditions

ژنوتیپ Genotype	انتقال مجدد فروکتان (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) Fructan remobilization (mg g ⁻¹ FW)		کارایی انتقال مجدد فروکتان (%) Efficiency of fructan remobilization (%)	
	شاهد Control	تنش Stress	شاهد Control	تنش Stress
تیپ وحشی Wild Type	21.25±2.98 a (a)	24.14±3.24 b (a)	43.42±4.75 a (a)	47.86±3.75 b (a)
موتانت T-65-7-1 T-65-7-1 Mutant	19.10±3.40 a (b)	38.68±4.27 a (a)	41.35±4.01 a (b)	69.12±6.60 a (a)

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

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

Means in each column followed by same letter are not significantly different (LSD 5%).
Same letter in parentheses indicates no significant difference between each genotype under control and stress conditions in that trait (LSD 5%).



شکل ۳- سطوح بیان نسبی ژن‌های سنتز کننده فروکتان *1-SST*، *6-SFT* و *1-FFT* تحت تنش خشکی در اوایل دوره پر شدن دانه‌ها (۷ روز پس از گرده‌افشانی) در لاین موتانت و تیپ وحشی گندم.

حرف مشترک: عدم تفاوت معنی‌دار در هر ژن ($p < 0.05$) * تفاوت معنی‌دار تحت تنش خشکی ($p < 0.05$).

Figure 3. Relative expression levels of fructan synthesis *1-SST*, *6-SFT* and *1-FFT* genes under drought stress in early grain filling stage (7-day after anthesis) in bread mutant line and wild type.
Same letter: not significantly different at each gene ($p < 0.05$), * Significant difference under drought stress ($p < 0.05$).

شرایط کنترل) بود (شکل ۴). هدف بسیاری از برنامه‌های اصلاحی افزایش و پایداری عملکرد تحت تنش‌های محیطی مانند خشکی در طی مراحل انتهایی رشد است (Jagadish *et al.*, 2015). در گیاهانی که استراتژی آن‌ها فرار از خشکی نیست برخی ژنوتیپ‌ها با انتقال مجدد آسیمیلات‌های ذخیره شده در بافت‌های رویشی به تنش خشکی واکنش نشان می‌دهند (Farooq *et al.*, 2014).

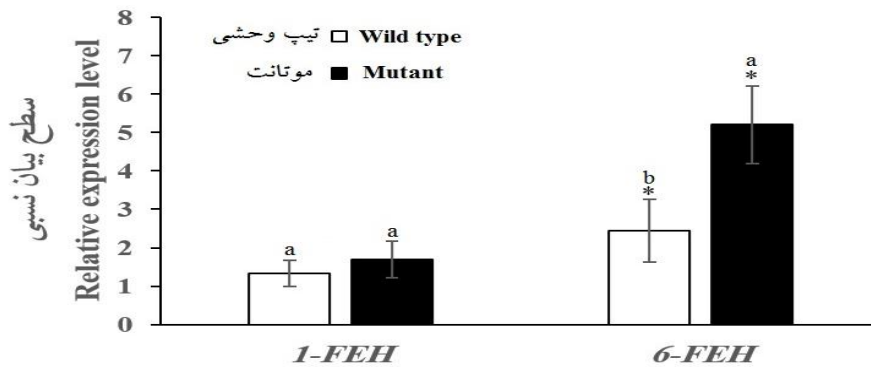
بیان نسبی ژن‌های درگیر در هیدرولیز فروکتان: در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی، تنش خشکی در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها باعث تغییر معنی‌داری در بیان ژن *1-FEH* نشد در حالی که افزایش معنی‌داری در سطح بیان نسبی ژن *6-FEH* مشاهده شد (شکل ۴). افزایش سطح بیان نسبی ژن *6-FEH* در لاین موتانت T-65-7-1 (۵/۲۱ برابر شرایط کنترل) بیشتر از رقم تیپ وحشی (۲/۴۵ برابر

بارندگی) و دمای بالا در اواخر فصل رشد، میزان تبخیر بالاست. بنابراین بارندگی‌های کم احتمالی روی سطح خاک باقی می‌ماند و کمکی به توسعه ریشه نمی‌کند (Zhang *et al.*, 2016). در این حالت انتقال مجدد آسمیلات‌ها از ریشه به دانه، اهمیت بیشتری می‌یابد. بنابراین می‌توان گفت علاوه بر ساقه، ریشه نیز به عنوان ذخیره‌ای از فروکتان، در روند انتقال مجدد آسمیلات‌ها سهمیم است (Zhang *et al.*, 2016).

فروکتان بیشترین محتوای کربوهیدرات محلول در آب کل بافت‌های رویشی گندم را تشکیل می‌دهد که دارای پیوندهای $\beta(2,1)$ و $\beta(2,6)$ می‌باشد (Van den Ende and El-Esawe, 2014). پیوندهای $\beta(2,6)$ با فعالیت *I-FFT* و *SST* و *6-SFT* پیوندهای $\beta(2,1)$ با فعالیت *I-FFT* تشکیل می‌شود؛ با این حال *I-FFT* در ساخت فروکتان گندم نقش کمتری دارد (Verspreet *et al.*, 2013). با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت افزایش بیان ژن‌های *I-SST* و *6-SFT* در لاین موتانت T-65-7-1 به معنای حداکثر تجمع فروکتان تحت تنش خشکی نسبت به رقم تیپ وحشی است (شکل‌های ۲ و ۳). تحت تأثیر قرار نگرفتن *I-FFT* ممکن است به دلیل نقش کمتر آن در سنتز فروکتان باشد. این نتایج به روشنی مشخص می‌کند که غلظت فروکتان در ریشه تابع فعالیت آنزیم‌های کد شده توسط این دو ژن هستند. افزایش بیان ژن‌های *I-SST* و *6-SFT* تحت تنش خشکی و نقش آن در محتوای کربوهیدرات‌های محلول در آب، توسط محققین دیگری نیز گزارش شده است (Xue *et Khoshro et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2008b). یکی از کارکردهای افزایش تجمع فروکتان و ساکارز تنظیم‌کنندگی اسمزی آن‌ها است که باعث تنظیم حفاظت سلولی در مقابل تنش می‌شوند (Xue *et al.*, 2008a; Daloso *et al.*, 2016). بر اساس گزارش سابارو و همکاران (Subbarao *et al.*, 2000) تنظیم اسمزی انتقال مجدد کربوهیدرات‌ها را طی پر شدن دانه‌ها تسهیل می‌کند.

نتایج نشان داد که در شرایط شاهد، انتقال مجدد و کارایی انتقال مجدد فروکتان در ریشه دو ژنوتیپ معنی‌دار نیست اما در شرایط تنش خشکی به طور معنی‌داری در لاین موتانت T-65-7-1 بیشتر از تیپ وحشی بود (جدول ۲). در مطالعات قبلی ما نیز مشخص شد که انتقال مجدد و کارایی انتقال مجدد کربوهیدرات‌های محلول ساقه در لاین موتانت T-65-7-1 به طور معنی‌داری بیشتر از رقم تیپ وحشی (رقم طبسی) است (Bagherikia *et al.*, 2017). علت این امر عملکرد بالاتر و بروز پیری زودرس (با توجه به بیان نسبی ژن‌های فتوسنتزی درگیر در چرخه کالوین و محتوای کلروفیل برگ پرچم) در لاین موتانت T-65-7-1 نسبت به رقم تیپ وحشی گزارش شد (Bagherikia *et al.*, 2017). بنابراین به نظر می‌رسد ریشه و ساقه گندم، رفتار مشابهی در پاسخ به پیری گیاه در جهت انتقال مجدد ذخایر از خود نشان می‌دهند. پدیده پیری باعث افزایش انتقال مجدد آسمیلات‌های ذخیره شده در بافت‌های رویشی برای پر شدن دانه در گندم می‌شود (Yang and Zhang, 2006). بازرگانی و همکاران (Bazargani *et al.*, 2011) با مطالعه پروتئومیکس دو لاین گندم متفاوت از نظر انتقال مجدد ساقه، افزایش بیان چندین پروتئین مرتبط با پیری و به دنبال آن تخریب پروتئین‌های سیستم فتوسنتزی را تحت تنش خشکی در ژنوتیپی که انتقال مجدد بالایی داشت گزارش کردند. بیشتر مطالعات در مورد ریشه گندم حول نظام سیستم ریشه^۱ بوده است (Manschadi *et al.*, 2006; Palta *et al.*, 2011; Nakhforoosh *et al.*, 2014). از آنجایی که تنش خشکی باعث توسعه ریشه در عمق پایینی خاک برای جذب رطوبت می‌شود (Nakhforoosh *et al.*, 2015)، در برنامه‌های اصلاحی گندم، ژنوتیپ‌هایی با عمق بیشتر در جهت ایجاد ارقام متحمل به خشکی انتخاب می‌شوند (Wasson *et al.*, 2012). با این حال در مناطقی دیم‌مدیرانه‌ای به خاطر بارندگی بسیار محدود (عدم

1- Root system architecture



شکل ۴- سطوح بیان نسبی ژن‌های هیدرولیز کننده فروکتان *1-FEH* و *6-FEH* تحت تنش خشکی در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها (۲۱ روز پس از گرده‌افشانی) در لاین موتانت و تیپ وحشی گندم
حرف مشترک: عدم تفاوت معنی‌دار در هر ژن ($p < 0.05$), * تفاوت معنی‌دار تحت تنش خشکی ($p < 0.05$).

Figure 4. Relative gene expression levels of fructan hydrolysis *1-FEH* and *6-FEH* under drought stress in rapid grain filling stage (21-day after anthesis) in bread mutant line and wild type. Same letter: not significantly different at each gene ($p < 0.05$), * Significant difference under drought stress ($p < 0.05$).

تنها فرم غالب پیوند فروکتان (2,6) β تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفته است.

در پایان با توجه به نتایج این آزمایش می‌توان گفت کربوهیدرات‌های ذخیره شده در ریشه نیز در روند انتقال مجدد آسیمیلات‌ها مشارکت دارند. افزایش انتقال مجدد فروکتان و کارایی آن از ریشه به دانه تحت تنش خشکی در لاین موتانت T-65-7-1 نسبت به تیپ وحشی به دلیل افزایش قابل توجه در سطح بیان ژن‌های درگیر در سنتز و هیدرولیز فروکتان بود. افزایش بیشتر بیان نسبی ژن‌های *I-SST* و *6-SFT* در اوایل دوره پر شدن دانه‌ها (۷ روز پس از گرده افشانی) باعث سنتز و ذخیره بیشتر فروکتان در واکوئل سلول‌های لاین موتانت T-65-7-1 شده است. همچنین با بیان بیشتر ژن *6-FEH* در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها (۲۱ روز پس از گرده افشانی)، ساکارز بیشتری در واکوئل سلول‌های لاین موتانت T-65-7-1 تولید شده است. امکان استفاده از ژن‌های *I-SST*، *6-SFT*، *6-FEH* به عنوان نشانگرهای مولکولی جهت گزینش ژنوتیپ‌هایی با محتوای فروکتان بالاتر و انتقال مجدد بیشتر در برنامه‌های اصلاحی گندم تحت تنش خشکی وجود دارد و از این طریق می‌توان مانع از کاهش شدید عملکرد گندم در شرایط تنش خشکی در انتهای فصل رشد شد.

به نظر می‌رسد T-65-7-1 از هر دو مکانیسم تنظیم اسمزی و انتقال مجدد ریشه استفاده می‌کند. در این مطالعه سطح بیان نسبی ژن *6-FEH* در ریشه به طور معنی‌داری در هر دو ژنوتیپ تحت تنش خشکی افزایش یافت و در لاین موتانت T-65-7-1 بیشتر از رقم تیپ وحشی بود (شکل ۴). افزایش بیان ژن *6-FEH*، نشان دهنده افزایش انتقال مجدد فروکتان تحت تنش خشکی در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها بخصوص در لاین موتانت T-65-7-1 می‌باشد (جدول ۲). به طور کلی وقتی که تقاضا برای پر شدن دانه بالا است، ساکارز محدود شده و فروکتان توسط فروکتان اگزوهیدرولازها (*FEHs*) به ساکارز و فروکتوز هیدرولیز می‌شوند (Van den Ende *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009). به نظر می‌رسد که عملکرد بالاتر لاین موتانت T-65-7-1 (Bagherikia *et al.*, 2017) باعث محدود شدن ساکارز شده و افزایش بیان ژن *6-FEH* را در جهت تأمین ساکارز به دنبال داشته است. سطح بیان نسبی ژن *1-FEH* در هر دو ژنوتیپ، تحت تأثیر تنش خشکی قرار نگرفت (شکل ۴). در مطالعه ژو و همکاران (Xue *et al.*, 2008a) نیز بیان ژن *1-FEH* در برگ پرچم گندم تحت تأثیر خشکی قرار نگرفت در حالی که *6-FEH* به طور معنی‌داری افزایش یافت. عدم تغییرات معنی‌دار در هر دو ژنوتیپ از نظر سطح بیان ژن‌های *1-FEH* و *1-FFT* در اثر تنش خشکی (شکل‌های ۳ و ۴)، بیانگر این است که

References

- Bagherikia, S., Pahlevani M.-H., Yamchi, A., Zenalinezhad, K. and Mostafaie, A.** (2017). Molecular and physiological analysis of flag leaf senescence and remobilization of assimilates in bread wheat under terminal drought stress. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **8**: 1-16 (In Persian).
- Bazargani, M.M., Hajirezaei, M.-R., Salekdeh, G.H., Bushehri, A.-A.S., Falahati-Anbaran, M., Moradi, F., Naghavi, M.-R. and Ehdaie, B.** (2012). A view on the role of metabolites in enhanced stem reserves remobilization in wheat under drought during grain filling. *Australian Journal of Crop Science*, **6**: 1613-1623.
- Bazargani, M.M., Sarhadi, E., Bushehri, A.A.S., Matros, A., Mock, H.-P., Naghavi, M.R., Hajihoseini, V., Mardi, M., Hajirezaei, M.R. and Moradi, F.** (2011). A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *Journal of Proteomics*, **74**: 1959-1973.
- Blum, A.** (1998). Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica*, **100**: 77-83.
- Chalmers, J., Lidgett, A., Cummings, N., Cao, Y., Forster, J. and Spangenberg, G.** (2005). Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal*, **3**: 459-474.
- Daloso, D.M., Anjos, L. and Fernie, A.R.** (2016). Roles of sucrose in guard cell regulation. *New Phytologist*, **211**: 809-818.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. and Smith, F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**: 350-356.
- Ehdaie, B., Alloush, G., Madore, M. and Waines, J.** (2006a). Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: I. postanthesis changes in internode dry matter. *Crop Science*, **46**: 735-747.
- Ehdaie, B., Alloush, G., Madore, M. and Waines, J.** (2006b). Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: II. Postanthesis Changes in Internode Water-Soluble Carbohydrates. *Crop Science*, **46**: 2093-2103.
- Ehdaie, B., Alloush, G. and Waines, J.** (2008). Genotypic variation in linear rate of grain growth and contribution of stem reserves to grain yield in wheat. *Field Crops Research*, **106**: 34-43.
- Ehdaie, B., Layne, A.P. and Waines, J.G.** (2012). Root system plasticity to drought influences grain yield in bread wheat. *Euphytica*, **186**: 219-232.
- Farooq, M., Hussain, M. and Siddique, K.H.** (2014). Drought stress in wheat during flowering and grain-filling periods. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **33**: 331-349.
- Goncalves, S., Cairney, J., Maroco, J., Oliveira, M.M. and Miguel, C.** (2005). Evaluation of control transcripts in real-time RT-PCR expression analysis during maritime pine embryogenesis. *Planta*, **222**: 556-563.
- Hajirezaei, M.R., Takahata, Y., Trethewey, R.N., Willmitzer, L. and Sonnewald, U.** (2000). Impact of elevated cytosolic and apoplasmic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *Journal of Experimental Botany*, **51**: 439-445.
- Jagadish, K.S., Kavi Kishor, P.B., Bahuguna, R.N., von Wiren, N. and Sreenivasulu, N.** (2015). Staying Alive or Going to Die During Terminal Senescence-An Enigma Surrounding Yield Stability. *Frontiers in Plant Science*, **6(1070)**: 1-14.
- Khoshro, H.H., Taleei, A., Bihamta, M.R., Shahbazi, M., Abbasi, A. and Ramezanpour, S.S.** (2014). Expression analysis of the genes involved in accumulation and remobilization of assimilates in wheat stem under terminal drought stress. *Plant Growth Regulation*, **74**: 165-176.
- Lawlor, D.W. and Paul, M.J.** (2014). Source/sink interactions underpin crop yield: the case for trehalose 6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat. *Frontiers in Plant Science*, **5(418)**: 1-14.
- Lopes, M.S. and Reynolds, M.P.** (2010). Partitioning of assimilates to deeper roots is associated with cooler canopies and increased yield under drought in wheat. *Functional Plant Biology*, **37**: 147-156.
- Manschadi, A.M., Christopher, J., deVoil, P. and Hammer, G.L.** (2006). The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Functional Plant Biology*, **33**: 823-837.

- Mesgaran, M., Madani, K., Hashemi, H. and Azadi, P. (2016). Evaluation of Land and Precipitation for Agriculture in Iran. Working Paper 2, Stanford Iran 2040 Project, Stanford University, December 2016, available at: <https://purl.stanford.edu/vf990qz0340>.
- Nakhforoosh, A., Grausgruber, H., Kaul, H.-P. and Bodner, G. (2014). Wheat root diversity and root functional characterization. *Plant and Soil*, **380**: 211-229.
- Nakhforoosh, A., Grausgruber, H., Kaul, H.-P. and Bodner, G. (2015). Dissection of drought response of modern and underutilized wheat varieties according to Passioura's yield-water framework. *Frontiers in Plant Science*, **6(570)**: 1-13.
- Palta, J.A., Chen, X., Milroy, S.P., Rebetzke, G.J., Dreccer, M.F. and Watt, M. (2011). Large root systems: are they useful in adapting wheat to dry environments? *Functional Plant Biology*, **38**: 347-354.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29(9)**: 2002-2007.
- Shewry, P.R., Mitchell, R.A., Tosi, P., Wan, Y., Underwood, C., Lovegrove, A., Freeman, J., Toole, G.A., Mills, E.C. and Ward, J.L. (2012). An integrated study of grain development of wheat (cv. Hereward). *Journal of Cereal Science*, **56**: 21-30.
- Subbarao, G.V., Nam, N.H., Chauhan, Y.S. and Johansen, C. (2000). Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water deficits. *Journal of Plant Physiology*, **157**: 651-659.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere, A., Yoshida, M. and Kawakami, A. (2003). Fructan 1-exohydrolases. β -(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.
- Van den Ende, W. and El-Esawe, S.K. (2014). Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses? *Environmental and Experimental Botany*, **108**: 4-13.
- Van Riet, L., Nagaraj, V., Van den Ende, W., Clerens, S., Wiemken, A. and Van Laere, A. (2006). Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*, **57**: 213-223.
- Verspreet, J., Cimini, S., Vergauwen, R., Dornez, E., Locato, V., Le Roy, K., De Gara, L., Van den Ende, W., Delcour, J.A. and Courtin, C.M. (2013). Fructan metabolism in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels. *Plant and Cell Physiology*, **54**: 2047-2057
- Wardlaw, I. and Willenbrink, J. (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.
- Wasson, A., Richards, R., Chatrath, R., Misra, S., Prasad, S.S., Rebetzke, G., Kirkegaard, J., Christopher, J. and Watt, M. (2012). Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 3485-3498.
- Xue, G.P., Drenth, J., Glassop, D., Kooiker, M. and McIntyre, C.L. (2013). Dissecting the molecular basis of the contribution of source strength to high fructan accumulation in wheat. *Plant Molecular Biology*, **81**: 71-92.
- Xue, G.P., McIntyre, C.L., Glassop, D. and Shorter, R. (2008a). Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology*, **67**: 197-214.
- Xue, G.P., McIntyre, C.L., Rattey, A.R., van Herwaarden, A.F. and Shorter, R. (2009). Use of dry matter content as a rapid and low-cost estimate for ranking genotypic differences in water-soluble carbohydrate concentrations in the stem and leaf sheath of *Triticum aestivum*. *Crop and Pasture Science*, **60**: 51-59.
- Xue, G.P., McIntyre, C.L., Jenkins, C.L.D., Glassop, D., van Herwaarden, A.F. and Shorter, R. (2008b). Molecular Dissection of Variation in Carbohydrate Metabolism Related to Water-Soluble Carbohydrate Accumulation in Stems of Wheat. *Plant Physiology*, **146**: 441-454.
- Yang, J. and Zhang, J. (2006). Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist*, **169**: 223-236.

- Yang, J., Zhang, J., Huang, Z., Zhu, Q. and Wang, L.** (2000). Remobilization of carbon reserves is improved by controlled soil-drying during grain filling of wheat. *Crop Science*, **40**: 1645-1655.
- Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Zhu, Q. and Liu, L.** (2004). Activities of fructan-and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta*, **220**: 331-343.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. and Konzak, C.F.** (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, **14**: 415-421.
- Zhang, J., Dell, B., Conocono, E., Waters, I., Setter, T. and 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.
- Zhang, J., Dell, B., Ma, W., Vergauwen, R., Zhang, X., Oteri, T., Foreman, A., Laird, D. and Van den Ende, W.** (2016). Contributions of Root WSC during Grain Filling in Wheat under Drought. *Frontiers in Plant Science*, **7(904)**: 1-11.

Effect of Drought Stress on the Expression of Genes Involved in Synthesis and Hydrolysis of Fructan During Remobilization of Assimilates in Wheat Root

Saeed Bagherikia¹, Mohammadhadi Pahlevani^{2,*}, Ahad Yamchi³, Khalil Zenalinezhad³
and Ali Mostafaie⁴

- 1- Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- 4- Professor, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received: March 15, 2017 – Accepted: May 7, 2017)

Abstract

Under drought stress conditions, as one of the most important limiting factors of grain yield in wheat at arid and semi-arid regions, the remobilization of assimilates gain would be more valuable to grain filling. There are a few reports on the importance of remobilization of the root during the grain filling period under drought stress conditions. An advanced mutant line of bread wheat (T-65-7-1) along with its wild type (cv. Tabasi), were planted at two moisture conditions (normal and 30-40% of field capacity) as a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. Sampling for gene expression analysis was conducted from the root in two stages (7 and 21 days after anthesis). In these genotypes, fructan remobilization, efficiency of fructan remobilization, and relative expression of genes involved in the synthesis and hydrolysis of fructan during the grain filling period, in root, were studied under terminal drought stress. The results showed that the stored fructan in the root participated in the assimilate remobilization. Higher fructan remobilization through root to grain in mutant line under drought stress conditions was due to over-expression of genes involved in the synthesis of fructan (*1-SST* and *6-SFT*) at 7-days after anthesis and in hydrolysis of fructan (*6-FEH*) at 21-days after anthesis, compared to wild type. Drought stress did not cause a significant change in gene expression of *1-FFT* and *1-FEH* genes in the root of both genotypes, which confirms the only β (2,6) linkages as predominant form of fructan has affected under drought stress conditions. In wheat breeding programs, *1-SST*, *6-SFT* and *6-FEH* can be used as molecular markers for selecting genotypes with high fructan content and more remobilization.

Keywords: Remobilization, Gene expression, Drought, Root, Molecular marker, Mutant

* Corresponding Author, E-mail: hpahlevani@gau.ac.ir