



بررسی نقش ژن گلوتامین سیننتاز طی مراحل رشد کلزا تحت شرایط تنفس خشکی

س. نواب پور^۱ و ر. حداد^۲

۱- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استادیار دانشگاه بین المللی قزوین

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۱

چکیده

به منظور ارزیابی تاثیر سطوح تنفس خشکی بر الگوی بیان ژن گلوتامین سیننتاز به همراه پروتئین و کلروفیل و شاخص سطح اکسیداسیون سلولی TBARM مطالعه ای روی گیاه کلزا (رقم فالکون) در شرایط گلخانه تحقیقاتی انجام شد. سطح تیمارهای تنفس خشکی شامل مقادیر معادل آبیاری برای حصول پتانسیل ۰/۵، ۱-۲، ۴-۶ و بار بود. هم چنین آبیاری در حد ظرفیت زراعی (FC) به عنوان شاهد لحاظ گردید. اعمال تیمارهای تنفس از زمان انتقال گیاهان پس از بهاره سازی به گلخانه انجام شد. به منظور افزایش دقت از طرح آماری بلوک های کامل تصادفی با ۴ تکرار استفاده شد. نمونه برداری تصادفی از برگ در مراحل مختلف رشد شامل ساقه دهی، گلدهی، غلاف بندی و رسیدگی فیزیولوژیک انجام شد. همچنین نمونه برداری از غلاف سبز و دانه در مراحل پایانی رشد صورت پذیرفت. در مورد کلیه تیمارهای آزمایشی میزان بیان ژن گلوتامین سیننتاز، مقدار کلروفیل، پروتئین و TBARM اندازه گیری شد. نتایج نشان داد با افزایش شدت تنفس خشکی و سن گیاه میزان پروتئین و کلروفیل عموماً کاهش یافت. در اغلب مراحل رشد تفاوت معنی داری بین میزان پروتئین برای تیمارهای شاهد، ۰/۵ و ۱-۲ بار ملاحظه نشد. میزان شاخص اکسیداتیو TBARM با افزایش شدت تنفس خشکی افزایش یافت. میزان فعالیت ژن گلوتامین سیننتاز با افزایش سن گیاه بالا رفت. میزان نسخه برداری ژن گلوتامین سیننتاز در برگ تحت تاثیر تنفس خشکی تا مرز تیمار ۱- بار افزایش و پس از آن عموماً کاهش نشان داد. میزان بیان این ژن در غلاف و دانه در شرایط تیماری مورد مطالعه کمتر از برگ بود.

واژه های کلیدی: کلزا، تنفس خشکی، پروتئین، کلروفیل، ژن گلوتامین سیننتاز

مقدمه

جهانی روغن نباتی را تامین می نماید. روغن کلزا در مقایسه با سایر روغن های ممتاز نظیر آفتتابگردن، ذرت و سویا به دلیل وجود

کلزا از مهمترین دانه های روغنی شناخته شده می باشد که حدود ۱۷ درصد از تولید

مقدار معینی تنش آب در خاک، الزاماً همان مقدار تنش در گیاه ایجاد نخواهد کرد. این تفاوت تابع عواملی چون مقاومت جریان آب در خاک، مقاومت روزنے ای و مهمتر از همه مقاومت در برابر حرکت آب در ریشه ها و سایر بافت ها می باشد. تاثیرگذاری عامل آخر به فاکتورهای فیزیولوژیک و ساختار ژنتیکی بستگی دارد. بنابراین اتكا به پتانسیل ژنتیکی ارقام و تلاش در جهت بهبود و اصلاح ژنتیکی آنها در القای مقاومت به خشکی نقش اساسی ایفا می نماید. در این راستا آگاهی از فعالیت و نحوه اثر ژنهای در حصول موفقیت برنامه های اصلاحی ضروری است. محصول ژن گلوتامین سینتاتاز پروتئینی با فعالیت آنزیمی است. این آنزیم دارای ایزوفرمهای مختلفی منتبه به اجزای سلولی بوده که دارای نقش اختصاصی هستند (۹ و ۱۷). در سلولهای گیاهی اغلب دو ایزوفرم گلوتامین سینتاتاز گزارش شده است. نوع اول گلوتامین سیتوپلاسمی (GSC) و نوع دوم فرم کلروپلاستی (GSL) که در کلروپلاست بیان می شود. فعالیت هر دو ژن شباهت زیادی دارند، آنزیم گلوتامین کلروپلاستی ضمن واکنش با آمونیاک آزاد شده در فرآیند تنفس نوری آنرا پاکسازی می نماید. گلوتامین سینتاتاز سیتوپلاسمی نیز قادر به جذب آمونیاک حاصل از واکنش های تثبیت ازت بوده و در تجزیه و تعدیل اسیدهای آمینه نقش دارد (۹ و ۱). در این تحقیق به بررسی الگوی افتراقی بیان ژن گلوتامین سینتاتاز در اندام ها و مراحل مختلف رشد در گیاه کلزا تحت شرایط تنش خشکی پرداخته

اسیدهای چرب اشباع نشده و فقدان کلسترول از کیفیت بالایی برخوردار است (۱۶). کلزا گیاهی آلوترابلوئید با ۱۹ جفت کروموزوم (2n=38) می باشد. این گیاه با ویژگی های خاص، سازگاری بالایی را با شرایط آب و هوایی مناطق زیادی از کشور نشان می دهد، در عین حال با توجه به اقلیم خشک و نیمه خشک ایران و حجم وسیع واردات روغن انجام مطالعات اصلاحی و ژنتیکی ضروری می نماید. ارقام کلزا دارای تیپ های رشد بهاره و پاییزه می باشند، ارقام بهاره نیازی به بهاره سازی ندارند ولی به دلیل دوره ای رشد کوتاهتر عملکرد کمتری دارند (۱۸).

بروز تنش خشکی در گیاه زمانی حادث می شود که سرعت تعرق بیش از جذب آب باشد. به عبارت دقیق تر افزایش تعرق یا کافی نبودن جذب آب منجر به تظاهر تنش می گردد. در چنین وضعیتی سلولها از حالت آماس طبیعی خارج می شوند. با تداوم تنش، پتانسیل آب در گیاه کاهش بیشتری یافته و به دنبال آن کاهش فتوسنتز و اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک و در نهایت مرگ سلولی حاصل می شود (۱۵). گیاهان زراعی از نظر ظرفیت جذب آب، تعرق و واکنش نسبت به تنش خشکی عکس العمل متفاوتی دارند. این رونداختلاف زمانی که گیاه تحت شرایط تنش خشکی قرار می گیرد بیشتر بروز می کند. فرآیندهای فیزیولوژیک در گیاهان عمدهاً تابع وضعیت آب در گیاه هستند و تنها به طور غیرمستقیم تحت تاثیر تنش آب در خاک و هوا قرار می گیرند (۲). بر این اساس

پذیرفت. آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی (معادل ۶/۸ لیتر) به عنوان شاهد انجام شد.

طرح آماری و نمونه برداری

به منظور افزایش دقت از طرح آماری بلوک کامل تصادفی با ۴ تکرار استفاده شد. نمونه برداری جهت محاسبه شاخص بیوشیمیایی TBARM¹ و میزان کلروفیل به صورت ماهانه و تکراردار انجام شد (۱۳). همچنین نمونه برداری تصادفی و تکراردار جهت انجام مطالعات مولکولی و بررسی بیان ژن گلوتامین سینتتاز نیز به طور همزمان انجام شد.

اندازه گیری کلروفیل

برای اندازه گیری میزان کلروفیل از روش بورا (۱۴) استفاده گردید. مقدار ۵/۰ گرم نمونه برگ (بصورت یخ زده در ۷۰°C - نگهداری شده) کاملاً خرد و با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شد. پس از سانتریفوژ میزان جذب (A) در طول موج های ۶۴۶/۶، ۶۶۳/۶ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (Uvikon watford) ثبت گردید. میزان کلروفیل a و کلروفیل b و کل کلروفیل براساس فرمول های زیر محاسبه گردید (۱۴):

$$\text{chl}_a \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = 12.25A663.6 - 2.55A646.6$$

$$\text{chl}_b \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = 20.31A646.6 - 4.91A663.6$$

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

کل

اندازه گیری TBARM

در این سنجش که معیاری برای اندازه گیری میزان تنش اکسیداسیونی است،

شده است. همچنین روند تغییرات میزان کلروفیل و سطح اکسیداسیون سلولی ارزیابی گردیده است.

مواد و روشها

بذور گیاه کلزا، واریته فالکون (Brassica napus cv. Faclon) در شرایط کشت بستر سبک (کوارتز- ماسه- پرلیت و کوکوبیت به نسبت ۳۰، ۳۰ و ۲۰ درصد) کشت و در مرحله چهاربرگی جهت بهاره سازی به مدت ۶ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن در شرایط گلخانه تحقیقاتی با میزان روشنایی ۱۶ ساعت و دمای ۲۲ درجه سانتی گراد در روز و ۱۶ درجه سانتی گراد در شب منتقل شد. در ابتدا در هر گلدان بزرگ ۲۰ کیلوگرمی سه بوته و پس از استقرار کامل به یک بوته تنک شد.

اعمال تنش خشکی

سطح تیمار خشکی مشتمل بر مقادیر ۵، ۶، ۲، ۱ و ۰/۵ بار بر حسب مقدار معادل آب مورد نیاز در تکرار های هر تیمار آبیاری گردید. میزان مقادیر آب معادل در تیمار های مزبور با اندازه گیری مقدار آب معادل در پتانسیل های مزبور به ترتیب شامل ۶/۵، ۴/۷، ۳ و ۱/۱ لیتر گردید. اعمال تیمارها از زمان انتقال گیاهان در مرحله چهار برگی به گلخانه انجام شد. با توجه به روند رشد گیاهان آبیاری با مقادیر فوق الذکر تا مرحله آغاز گلدهی به صورت هفتگی و پس از آن دو بار در هفته به طور ثابت صورت

ابتدا کلون کاوشگر گلوتامینستاتاز بوسیله استون سفاروز خالص سازی شد. مرحله مقدماتی پیش هیبرید با قرار دادن غشای نایلونی حامل RNA در بافر ۶۵ درجه سانتی گراد ۲۵OmM ۷% SDS، pH7.2) به مدت یک شب در شیکر ۶۵ درجه سانتی گراد انجام شد.

کاوشگر تک رشته واجد فسفر رادیوакتیو در محیط بافری به غشاء حامل RNA افزوده و مجدداً به مدت یک شب در شیکر ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. غشاء را با محلول ۰.۲×SSC/۱% SDS در کاست فیلم x-ray در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کرده و سپس ظاهر گردید.

نتایج و بحث

رونده تغییرات میزان پروتئین برگ طی مراحل نمو تحت تاثیر تنفس خشکی در جدول ۱ آورده شده است. همچنین میزان پروتئین غلاف سبز در مرحله‌ی غلاف بندی و دانه در مرحله‌ی رسیدگی نیز اندازه گیری شد (جدول ۱). بیشترین مقدار پروتئین برگ در مرحله‌ی گلدهی در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار ۶- بار در مرحله‌ی رسیدگی حاصل شد. در اغلب موارد تفاوت معنی داری برای میزان پروتئین در تیمار شاهد و تیمارهای ۱- و بیوژه ۰/۵- بار حاصل نگردید. از طرفی روند کاهش میزان پروتئین با افزایش شدت تنفس در مراحل ساقه دهی و گلدهی نسبت به سایر مراحل رشد محسوس تر بود. چنین به نظر

1- Northern-blot analysis

مقدار مالون دی آلدھید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ (چربی‌ها) است اندازه گیری می‌شود. در این خصوص از روش هگگ و همکاران (۵) با تغییراتی به شرح زیر استفاده گردید. مقدار ۵/۰ گرم نمونه برگ را هموژنیزه نموده و یک میلی لیتر اسید تری کلرواستیک (۰/۱۵ w/v) به آن اضافه شد. محلول حاضر را با افزودن ۱۰ میلی لیتر استون به شدت مخلوط نموده (ورتکس) و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب کوچکی که پس از سانتریفیوژ حاصل شد را با ۵ میلی لیتر استون شستشو داده، ورتکس و مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس مقدار ۳ میلی لیتر H_3PO_4 (۰/۱ w/v) و یک میلی لیتر اسید تیوباربیورتیک (۰/۶ w/v) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای $100^{\circ}C$ قرار داده شد. سپس واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف گردید. مقدار جذب محلول حاصل با طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Uvikon watford) اندازه گیری گردید (۱۳).

فسفر رادیو اکتیو (آنالیز نورترن بلات^۱)

در ابتدا انتقال RNA به ژل آگارز و الکتروفورز آن انجام شد. پس از حذف قسمتهای اضافی ژل، RNA به غشای نایلونی (Amersham HybondN+) با افزودن ۰/۵ Molar NAOH در مدت حداقل ۱۰ ساعت منتقل گردید. به منظور انجام هیبریداسیون،

سازگاری تدریجی فیزیولوژیک با شرایط محیطی می باشد در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (۱۰ و ۱۱).

می رسد که گیاه پس از مراحل ابتدایی رشد سازگاری بیشتری با شرایط تنش حاصل می کند، این وضعیت که ماحصل

جدول ۱- میزان پروتئین برگ در مراحل نمو برای تیمارهای خشکی (استخراج پروتئین غلاف و دانه از نمونه های مربوطه به ترتیب در مراحل غلاف دهنی و رسیدگی انجام شد)

تیمارهای خشکی (بار)						مراحل نمو
-۶	-۴	-۲	-۱	-۰/۵	شاهد	
۲/۱ ^{opq}	۳/۲ ^{ml}	۵/ ^j	۷/۵ ^{de}	۷/۵ ^{de}	۷/۹ ^{cd}	ساقه دهنی
۲/۱ ^{nml}	۴/ ^k	۶/۱ ^{gh}	۸/۶ ^{bc}	۸/۹ ^{ab}	۹/۷ ^a	گلدهی
۱/۳ ^{rs}	۲/۴ ^{nopq}	۴/ ^k	۶/۱ ^{gh}	۶/۷ ^{gf}	۷/۱ ^{ef}	غلاف بندی
۰/۱ ^t	۱/۰ st	۲ ^{pqr}	۱/۹ ^{qr}	۲/۶ ^{mnop}	۷/۴ ^{ef}	رسیدگی فیزیولوژیک
۲/۱ ^{opq}	۳/۸ ^{kl}	۴/ ^k	۵/۹ ^{hi}	۶ ^{ghi}	۶/۳ ^{gh}	غلاف
۲/۷ ^{mnop}	۳/۸ ^{kl}	۵/۳ ^{ij}	۷/۱ ^{ef}	۷/۲ ^{ef}	۷/۶ ^{de}	دانه

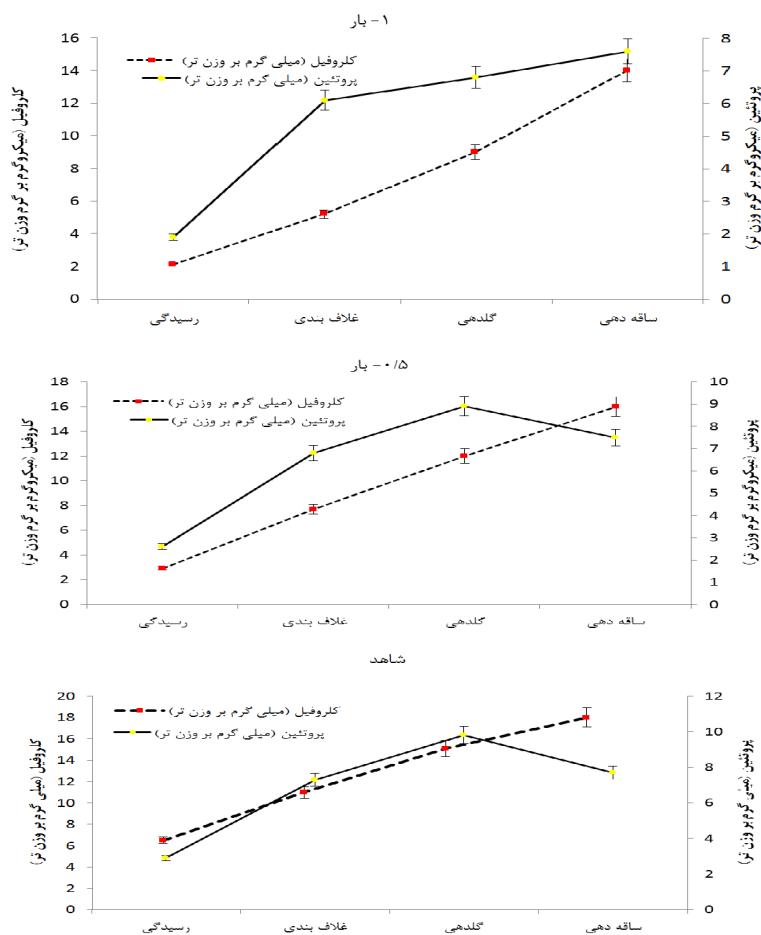
مقایسه میانگین تیمارها توسط آزمون دانکن صورت پذیرفت در کلیه موارد میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف آماری ندارند ($\alpha=0.05$).

کلروفیل حساسیت بیشتری به شرایط تنش نشان می دهد. برخی محققین دیگر نیز تغییرات کلروفیل را به عنوان شاخصی برای مقاومت به تنش معرفی نموده اند (۴). سنجش TBARM به منظور تکمیل اطلاعات بیوشیمیایی از روند تاثیر سطوح تنش خشکی شاخص TBARM صورت پذیرفت. این سنجش اطلاعاتی از میزان اکسیداسیون سلولی و بویژه پراکسیداسیون چربی ها را فراهم می آورد. از نقاط مشترک اغلب تنش های زنده و غیرزنده افزایش سطح رادیکالهای آزاد اکسیژن^۱ (AOS) است (۱۱). چنانچه واکنش های آنزیمی و غیر آنزیمی، سطح مناسب این رادیکالها را تعديل ننمایند تنش اکسیداتیو رخ می دهد. در پی آن خساراتی نظیر آسیب غشای سلولی، افزایش

تیمار خشکی -۶ بار علاوه بر تاثیر شدید بر کاهش پروتئین موجب بروز آثار منفی در رشد و نمو گردید. تیمار -۲ بار اثرات سوء شدیدی بر ظاهر گیاه نداشت ولی موجب افت معنی داری در کاهش پروتئین نسبت به شاهد و حتی تیمار ما قبل خود -۱ بار داشت. با توجه به تشابه نسبی قابل توجه میزان پروتئین در تیمارهای شاهد، -۰/۵ و -۱ بار مقایسه ای در الگوی تغییرات میزان پروتئین در کنار کلروفیل برای تیمارهای مذبور در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که روند کاهشی پروتئین برای هر سه تیمار شباهت زیادی داشت، این مسئله در مورد کلروفیل نیز صادق بود. مقایسه ای الگوی تغییرات پروتئین و کلروفیل طی مراحل رشد برای تیمارهای مورد اشاره نشان داد که با افزایش شدت تنش

اکسیداتیو و در پی آن اختلال در فعل و انفعالات سلولی می‌شوند و دوم اینکه غلظت‌های پائین این رادیکال‌ها به عنوان فاکتورهای سیگنالی^۱ در فعال نمودن ژنهای دفاعی ایفای نقش می‌نمایند. چنین نقشی به طور معمول از طریق تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم بر پروموتور ژن‌های مزبور صورت می‌پذیرد (۷). نتایج این تحقیق نشان داد با افزایش تنش خشکی میزان TBARM افزایش پلکانی نشان داد (شکل ۲).

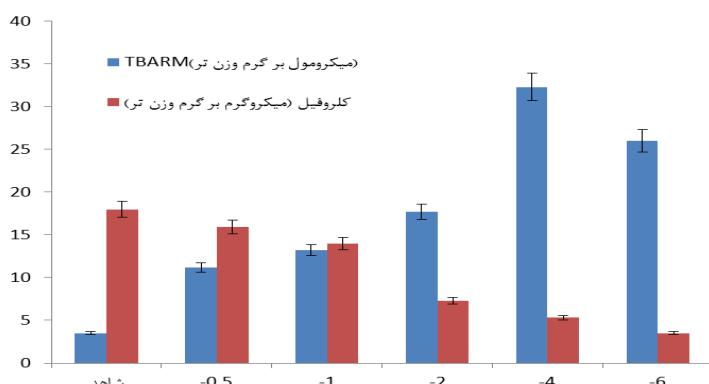
می‌گردد (۸) با مطالعات انجام شده روی گیاه کلزا افزایش میزان فلاونوئیدها و نقش آنتی اکسیدانی آنها تحت تاثیر تنفس اکسیداتیو ثابت شده است (۱۲). به لحاظ مولکولی و در سطح سلولی خسارات ناشی از استرس‌های محیطی به دلیل بروز تنفس اکسیداتیو می‌باشد. تنفس‌های محیطی از مهمترین محدودکننده‌های رشد و تولید گیاهان زراعی می‌باشند. بررسی میزان این رادیکال‌ها از دو جهت حائز اهمیت است اول اینکه این رادیکال‌ها در غلظت‌های بالا منجر به بروز تنفس



شکل ۱- روند تغییرات میزان پروتئین و کلروفیل در مراحل نمو در شرایط تیماری شاهد، -۰/۵ و -۱- بار (میزان خطای معیار با علامت میله نشان داده شده است (n=۴).

TBARM حادث شده است. روند تغییرات شاخص TBARM عکس العمل کاملاً متضادی را با میزان کلروفیل در سطوح تیمار تنفس نشان داد. در عین حال شبی افزایش میزان TBARM از شدت کاهش کلروفیل در سطوح خشکی بیشتر بود (شکل ۲).

البته کاهش مقدار نسبی آن در تنفس ۶- بار نسبت به ۴- بار تنها استثنای در این روند بود. به نظر می‌رسد شدت تنفس ۶- بار با سرعت بالایی منجر به بروز تنفس اکسیداتیو و مرگ سلولها گردیده و در فاصله ۵ روز پس از آخرین دوره ی آبیاری تیمار ۶- بار افت میزان



شکل ۲- متوسط مقادیر کلروفیل و شاخص پراکسیداسیون سلولی (TBARM) در شرایط تیمارهای تنفس خشکی (مقادیر خطای معیار با علامت میله نشان داده شده است $n=4$).

دارد (۶). در این راستا ژن گلوتامین سینتتاز واجد اهمیت زیادی است و در تجزیه ی پروتئین‌ها و تعدیل اسیدهای آمینه نقش دارد (۹ و ۱۱). الگوی تغییرات میزان پروتئین در برگ طی مراحل نمو و میزان آن در دانه موید نتایج مورد اشاره است (جدول ۱).

میزان بیان ژن گلوتامین سینتتاز با افزایش شدت تنفس خشکی تا مرز ۱- بار افزایش و پس از آن روند کاهشی نشان داد (شکل ۳). چنین الگوی بیانی در مورد بسیاری از ژنهای و فعالیت متابولیکی آنزیم‌ها دیده می‌شود. به نظر می‌رسد عوامل کنترلی بیان ژنهای با بیشترین ظرفیت ممکن تا یک نقطه‌ی حداکثری (آستانه) نسبت به یک عامل محرك

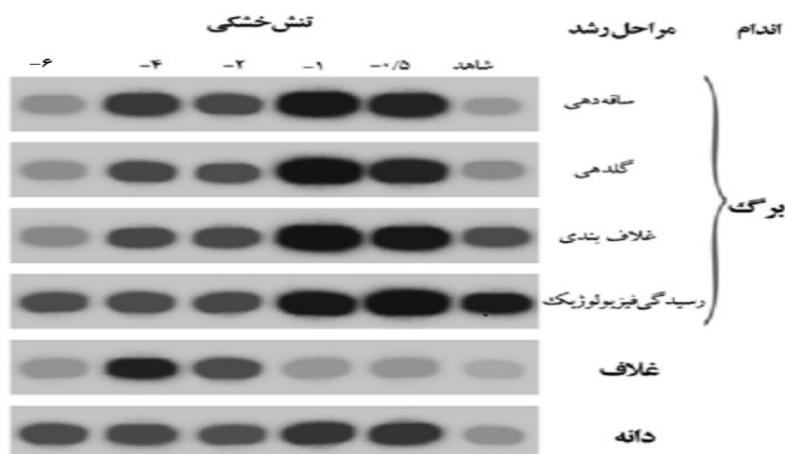
الگوی بیان ژن

روند تغییرات بیان ژن گلوتامین سینتتاز در شکل ۳ نشان داده شده است. الگوی بیان ژن مذبور در برگ به گونه‌ای بود که با افزایش سن عموماً افزایش نسخه برداری به طور قابل توجهی حاصل گردید. چنین به نظر می‌رسد که این ژن در روند فرآیند پیری برگ نقش دارد. پیری برگ مرحله‌ای فعال است که به لحاظ فیزیولوژیک و ژنتیکی حائز اهمیت می‌باشد. از مشخصه‌های بارز پیری برگ روند انتقال مواد آلی از برگ‌های مسن به اندام‌های جوان و ذخیره‌ای بویژه دانه است (۱۱). بدین منظور شکسته شدن مولکولهای حیاتی بزرگ نظیر پروتئین‌ها اهمیت زیادی

حساس سلولزی انجام گرفت. هیبریداسیون غشاء با کلون رادیواکتیو گلوتامین سینتتاز انجام و با ظهور کاست رادیوگرافی نتایج تنظیم RNA گردید. در مورد غلاف و دانه استخراج از نمونه های مربوطه صورت پذیرفت.

(تنش) واکنش مثبت نشان داده و پس از آن به دلیل عدم وجود پتانسیل کافی برای واکنش روند کاهشی فعالیت قابل انتظار خواهد بود. این موضوع در برخی مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۱۰ و ۱۱).

انتقال RNA به ژل و پس از آن به غشاء



شکل ۳- هیبریداسون نورترن بلات: استخراج RNA از نمونه برگ در مراحل مختلف نمو به طور جداگانه برای هر تیمار صورت پذیرفت.

این ژن در غلاف مطالعه‌ی روند فرآیند پیری و تاثیر تنش‌های شدیدتر محیطی در غلاف در مقایسه با برگ می‌تواند اطلاعات مفیدی را فراهم آورد. این موضوع توسط چایلد و همکاران (۳) نیز مورد تأکید قرار گرفته است. تغییرات بیان ژن گلوتامین سینتتاز در دانه بیشترین ثبات را تحت تاثیر سطوح تنش خشکی نشان داد و با توجه به فعالیت این ژن دانه انجام مطالعات تکمیلی در این ارتباط حائز اهمیت می‌باشد.

از نتایج قابل توجه در این تحقیق بیان ژن گلوتامین در غلاف سبز بود. با توجه به تعداد نسبتاً زیاد غلاف در کلزا به نظر می‌رسد غلاف سهم عمده‌ای در فتوسنتز، ماده سازی و در ادامه‌ی انتقال مواد به دانه را دارد. بیان ژن گلوتامین در غلاف تحت تاثیر تنش خشکی در مقایسه با بیان آن در برگ تغییرات کمتری نشان داد. همچنین بیشترین مقدار بیان ژن در تیمار ۴- بار حاصل گردید. در حالیکه در برگ در این تیمار سطح پایینی از بیان ژن ملاحظه شد (شکل ۳). با توجه به شباهت نسبی بیان

منابع

- Alaoui, S.E.J., L. Diez, F. Humanes, F. Toribio, J. Partensky and F. Manuel. 2001. In vivo regulation of glutamine synthetase activity in the marine chlorophyll b-containing Cyanobactrium prochlorococcus sp. Strain pcc 9511 (oxyphotobacteria). Appl. And environ. Microbial. 67: 2202-2207.
- Bayoumi, T.Y., H.E. Manal and E.M. Metwali. 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.
- Child, R.D., N. Chauvaux, K. John, H.A. Van Onckelen and P. Ulvskov. 1998. Ethylene biosynthesis in oilseed rape pods in relation to pod shatter. Journal of Experimental Botany. 49: 322.
- Du, Y.Y., P.C. Wang, J. Chen and C.P. Song. 2007. The comprehensive functional analysis of catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. National Natural Science Foundation of China. 121(1): 16-23.
- Hagage, D., A. Nouvelot, J. Boucard and T. Gaspar. 1990. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. Phytochem Anal., 1: 86-89.
- Hörtensteiner, S. and U. Feller. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. J Exp Bot 53: 927-937.
- Mackerness, S.A.H., B.R. Jordan and B. Thomas. 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.). J Photochem and Photobiol B-Biol., 48: 180-188.
- Mackerness, S.A.H., C.F. John, B. Jordan and B. Thomas. 2001. Early signaling components in ultraviolet- B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. FEBS Lett., 489: 237-242.
- McNally, S.F., B. Hirel, P. Gadal, A.F. Mann and G.R. Stewart. 1983. Glutamine synthetase of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. Plant physiol. 72: 22-25.
- Metraux, J.P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. European J. of Plant Pathology, 107: 13-18.
- Navabpour, S., K. Morris, R. Allen, E. Harrison, S. Mackerness and V. Buchanan-Wollaston. 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress .Experimental Botany. 54(391): 2285 -2292.
- Olsson, L.C., M. Veit, G. Weissenbock and J.F. Bornman. 1998. Differential flavonoids response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. Phytochemistry. 49(4): 1021-1028.
- Page, T., G. Griffiths and V. Buchanan-Wollaston. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. Plant Physiol., 125: 718-727.
- Porra, R.J., W.A. Thompson and P.E. Kriedmann. 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. Biochem. Biophys. Acta., 975: 384-394.

15. Shao, H.B., M.A. Liang, M.A. Shao and B.C. Wang. 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.
16. Shariati, S. and P. Ghazi-shahinzadeh. 2000. Kolza. Agricultural Information Affair., 115 pp.
17. Stewart, G.R., A.F. Mann and P.A. Fentem. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine syntheses, and glutamate synthesis. In: B. J. miflin (ed.), *The Biochem. Plant*, 5: 271-327.
18. Vafabakhsh, J., M. NassiriMahallati, A. Koocheki and M. Aziz. 2009. Effects of water deficit on water use efficiency and yield of Canola cultivars (*Brassica napus* L.). Iranian Agricultural Research. Ferdosi Univercity Mashhad. 7(1): 25-33.

Evaluation of Glutamine Syntetase Gene Role in Growth Stage of Brassica Napus at and Drought Stress Condition

S. Navabpour¹ and R. Haddad²

1- Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Assistant Professor, University of IKIU, Qazvin

Abstract

In order to evaluate on Glutamine Syntetase gene expression as well as amount of protein, chlorophyll and oxidative index of TBARM the experiment has been carried out using *Brassica napus* (Falcon cv.) in research greenhouse condition. The drought stress treatments were included -0.5, -1, -2, -4 and -6 bar that by using of equivalent water (6.5, 6, 4.7, 3, 1.1 litr respectively) have been irrigated, also field capacity (FC) irrigation (6.8 litr) has been used as control. The drought stress treatment has been carried out after plant vernalization and transferred to greenhouse. To increase accuracy, the statistical design of Randomized Complete Block (RBC)has been used whit 4 replicates. In order to measure gene activity, chlorophyll, protein and TBARM amount leaf samples have been collected at different growth stages (stem elongation, flowering, pod stage, physiologic maturity) for all treatments. The results showed, the amount of protein and chlorophyll decreased by drought stress intensity as well as plant age. In most growth stages there were not significant different for protein amount at control, -0.5 and -1 bar drought treatments. The amount of TBARM was built up by drought stress increase. The glutamine syntetase transcript intensified by plant age increase. The gene activity was gone up by increase drought stress up to -1 and declined by higher stress. The gene activity in pod and grain was lower than its amount in leaf.

Keywords: *Brassica napus*, Drought stress, Protein, Chlorophyll, Glutamine syntetase gene