

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

س. نواب پور<sup>۱</sup> و ر. حداد<sup>۲</sup>

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 تنش 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 تنش خشکی شامل مقادیر معادل آبیاری برای حصول پتانسیل ۰/۵-، ۱-، ۲-، ۴- و ۶- بار بود. هم چنین آبیاری در حد ظرفیت زراعی (FC) به عنوان شاهد لحاظ گردید. اعمال تیمارهای تنش 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 تنش 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- بار ملاحظه نشد. میزان شاخص اکسیداتیو TBARM با افزایش شدت تنش خشکی افزایش یافت. میزان فعالیت ژن گلوتامین سیننتاز با افزایش سن گیاه بالا رفت. میزان نسخه برداری ژن گلوتامین سیننتاز در برگ تحت تاثیر تنش 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، تنش خشکی، پروتئین، کلروفیل، ژن گلوتامین سیننتاز

### مقدمه

جهانی روغن نباتی را تامین می نماید. روغن کلزا در مقایسه با سایر روغن های ممتاز نظیر آفتابگردان، 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 روزنه 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 اتکا 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 ی اثر ژنها در حصول موفقیت برنامه های اصلاحی ضروری است. محصول ژن گلوتامین سینتتاز پروتئینی با فعالیت آنزیمی است. این آنزیم دارای ایزوفرمهای مختلفی متناسب به اجزای سلولی بوده که دارای نقش اختصاصی هستند (۹ و ۱۷). در سلولهای گیاهی اغلب دو ایزوفرم گلوتامین سینتتاز 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 سینتتاز سیتوپلاسمی نیز قادر به جذب آمونیاک حاصل از واکنش های تثبیت ازت بوده و در تجزیه و تعدیل اسیدهای آمینه نقش دارد (۱ و ۹). در این تحقیق به بررسی الگوی افتراقی بیان ژن گلوتامین سینتتاز 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 آلوتتراپلوئید 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 ی 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 روند اختلاف زمانی که گیاه تحت شرایط تنش خشکی قرار می گیرد بیشتر بروز می کند. فرآیندهای فیزیولوژیک در گیاهان عمدتاً 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 TBARM<sup>1</sup> 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 پورا (۱۴) استفاده گردید. مقدار ۰/۵ 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):

$$\begin{aligned} \text{chl a} \quad (\text{mgml}^{-1}) &= 12.25A663.6 - 2.55A646.6 \\ \text{chl b} \quad (\text{mgml}^{-1}) &= 20.31A646.6 - 4.91A663.6 \\ \text{chl} \quad (\text{mgml}^{-1}) &= 16.76A646.6 - 6.34A663.6 \end{aligned}$$

### 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

بدور گیاه کلزا، واریته فالکون (*Brassica napus cv. Faclon*) در شرایط کشت بستر سبک (کوارتز- ماسه- پرلیت و کوکوپیت به نسبت ۳۰، ۳۰، ۲۰ و ۲۰ در صد) 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

سطوح تیمار خشکی مشتمل بر مقادیر ۰/۵، ۱-، ۲-، ۴- و ۶- بار برحسب 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، ۶، 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 گلوتامینسننتاز بوسیله ستون سفاروز خالص سازی شد. مرحله مقدماتی پیش هیبرید با قرار دادن غشای نایلونی حامل RNA در بافر ۶۵ درجه سانتی گراد (7% SDS, 250mM Sodium phosphate pH7.2) به مدت یک شب در شیکر ۶۵ درجه سانتی گراد انجام شد.

کاوشگر تک رشته واجد فسفر رادیواکتیو 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 SDS/1%SSC×0.2 شستشو و پس از خشک کردن در کاست فیلم x-ray در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کرده و سپس ظاهر گردید.

### نتایج و بحث

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

مقدار مالون دی آلدئید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول های بزرگ (چربی ها) است اندازه گیری می شود. در این خصوص از روش هگگ و همکاران (۵) با تغییراتی به شرح زیر استفاده گردید. مقدار ۰/۵ 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 سانتریفوژ گردید. رسوب کوچکی که پس از سانتریفوژ حاصل شد را با ۵ میلی لیتر استون شستشو داده، ورتکس و مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نموده و آخرین مرحله مرتبه تکرار شد. سپس مقدار ۳ میلی لیتر (۰/۱ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) و یک میلی لیتر اسید تیوباریوریتیک (۰/۰۶ w/v) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای C° ۱۰۰ قرار داده شد. سپس واکنش با سرد کردن سریع لوله ها 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).

هیبریداسیون RNA با کاوشگر DNA نشاندار فسفر رادیواکتیو (آنالیز نورترن بلات<sup>۱</sup>)

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

1- Northern-blot analysis

می رسد که گیاه پس از مراحل ابتدایی رشد سازگاری بیشتری با شرایط تنش حاصل می کند، این وضعیت که ماحصل سازگاری تدریجی فیزیولوژیک با شرایط محیطی می باشد در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (۱۰ و ۱۱).

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

تیمارهای خشکی (بار)					مراحل نمو	
۶-	۴-	۲-	۱-	۰/۵-	شاهد	
۲/۱ <sup>opq</sup>	۳/۳ <sup>ml</sup>	۵/۰ <sup>j</sup>	۷/۵ <sup>de</sup>	۷/۵ <sup>de</sup>	۷/۹ <sup>cd</sup>	ساقه دهی
۳/۱ <sup>nml</sup>	۴/۰ <sup>k</sup>	۶/۱ <sup>gh</sup>	۸/۶ <sup>bc</sup>	۸/۹ <sup>ab</sup>	۹/۷ <sup>a</sup>	گلدهی
۱/۳ <sup>rs</sup>	۲/۴ <sup>nopq</sup>	۴/۰ <sup>k</sup>	۶/۱ <sup>gh</sup>	۶/۷ <sup>ef</sup>	۷/۱ <sup>ef</sup>	غلاف بندی
۰/۳ <sup>t</sup>	۱/۰ <sup>st</sup>	۲ <sup>pqr</sup>	۱/۹ <sup>qr</sup>	۲/۶ <sup>mnp</sup>	۷/۲ <sup>ef</sup>	رسیدگی فیزیولوژیک
۲/۱ <sup>opq</sup>	۳/۸ <sup>kl</sup>	۴/۰ <sup>k</sup>	۵/۹ <sup>hi</sup>	۶ <sup>ghi</sup>	۶/۳ <sup>gh</sup>	غلاف
۲/۷ <sup>mnp</sup>	۳/۸ <sup>kl</sup>	۵/۳ <sup>zj</sup>	۷/۱ <sup>ef</sup>	۷/۲ <sup>ef</sup>	۷/۶ <sup>de</sup>	دانه

مقایسه میانگین تیمارها توسط آزمون دانکن صورت پذیرفت در کلیه موارد میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف آماری ندارند ( $\alpha=0/05$ ).

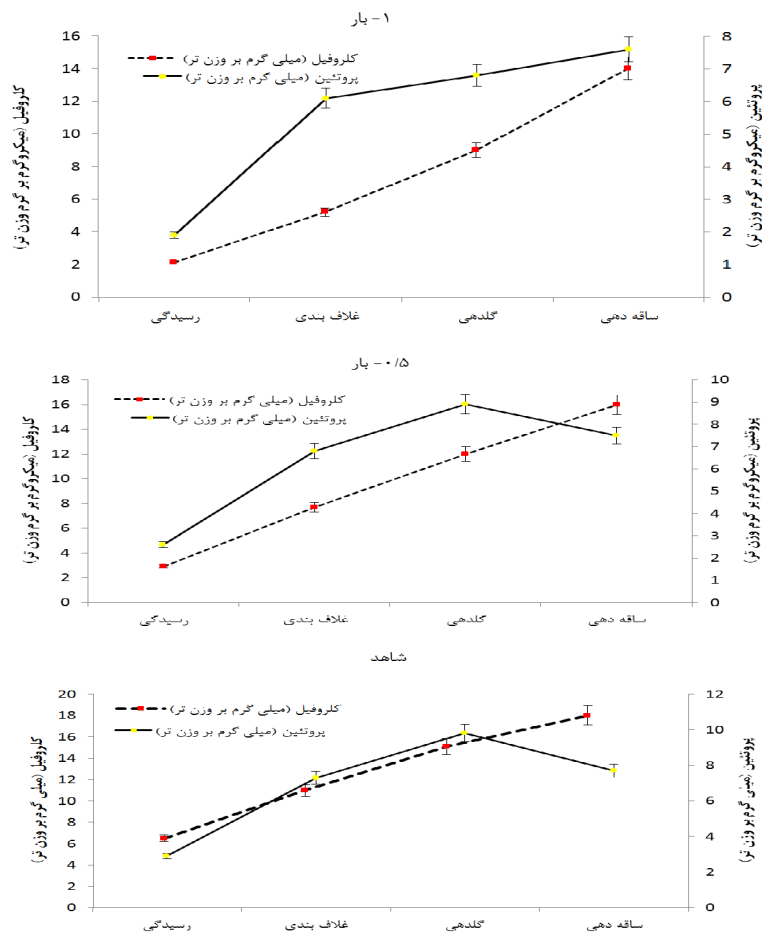
کلروفیل حساسیت بیشتری به شرایط تنش نشان می دهد. برخی محققین دیگر نیز تغییرات کلروفیل را به عنوان شاخصی برای مقاومت به تنش معرفی نموده‌اند (۴). سنجش TBARM به منظور تکمیل اطلاعات بیوشیمیایی از روند تاثیر سطوح تنش خشکی شاخص TBARM صورت پذیرفت. این سنجش اطلاعاتی از میزان اکسیداسیون سلولی و بویژه پراکسیداسیون چربی ها را فراهم می آورد. از نقاط مشترک اغلب تنش های زنده و غیرزنده افزایش سطح رادیکالهای آزاد اکسیژن<sup>۱</sup> (AOS) است (۱۱). چنانچه واکنش های آنزیمی و غیرآنزیمی، سطح مناسب این رادیکالها را تعدیل نمایند 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 ی الگوی تغییرات میزان پروتئین در کنار کلروفیل برای تیمارهای مزبور 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 ی الگوی تغییرات پروتئین و کلروفیل طی مراحل رشد برای تیمارهای مورد اشاره نشان داد که با افزایش شدت تنش

1- Active Oxygen Species (AOS)

اکسیداتیو و در پی آن اختلال در فعل و انفعالات سلولی می شوند و دوم اینکه غلظت های پائین این رادیکالها به عنوان فاکتورهای سیگنالی<sup>۱</sup> در فعال نمودن ژنهای دفاعی ایفای نقش می نمایند. چنین نقشی به طور معمول از طریق تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم بر پروموتور ژن های مزبور صورت می پذیرد (۷). نتایج این تحقیق نشان داد با افزایش تنش خشکی میزان TBARM افزایش پلکانی نشان داد (شکل ۲).

می گردد (۸) با مطالعات انجام شده روی گیاه کلزا افزایش میزان فلاونوئیدها و نقش آنتی اکسیدانی آنها تحت تاثیر تنش اکسیداتیو ثابت شده است (۱۲). به لحاظ مولکولی و در سطح سلولی خسارات ناشی از استرس های محیطی به دلیل بروز تنش اکسیداتیو می باشد. تنش های محیطی از مهمترین محدودکننده های رشد و تولید گیاهان زراعی می باشند. بررسی میزان این رادیکال ها از دو جهت حائز اهمیت است اول اینکه این رادیکالها در غلظت های بالا منجر به بروز تنش



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)).

البته کاهش مقدار نسبی آن در تنش ۶- بار نسبت به ۴- بار تنها استثنا در این روند بود. به نظر می رسد شدت تنش ۶- بار با سرعت بالایی منجر به بروز تنش اکسیداتیو و مرگ سلولها گردیده و در فاصله ی ۵ روز پس از آخرین دوره ی آبیاری تیمار ۶- بار افت میزان TBARM حادث شده است. روند تغییرات شاخص TBARM عکس العمل کاملاً متضادی را با میزان کلروفیل در سطوح تیمار تنش نشان داد. در عین حال شیب افزایش میزان TBARM از شدت کاهش کلروفیل در سطوح خشکی بیشتر بود (شکل ۲).

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



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

الگوی بیان ژن  
روند تغییرات بیان ژن گلوتامین سیننتاز در شکل ۳ نشان داده شده است. الگوی بیان ژن مزبور در برگ به گونه ای بود که با افزایش سن عموماً افزایش نسخه برداری به طور قابل توجهی حاصل گردید. چنین به نظر می رسد که این ژن در روند فرآیند پیری برگ نقش دارد. پیری برگ مرحله ای فعال است که به لحاظ فیزیولوژیک و ژنتیکی حائز اهمیت می باشد. از مشخصه های بارز پیری برگ روند انتقال مواد آلی از برگ های مسن به اندام های جوان و ذخیره ای بویژه دانه است (۱۱). بدین منظور شکسته شدن مولکولهای حیاتی بزرگ نظیر پروتئین ها اهمیت زیادی دارد (۶). در این راستا ژن گلوتامین سیننتاز واجد اهمیت زیادی است و در تجزیه ی پروتئین ها و تعدیل اسیدهای آمینه نقش دارد (۱ و ۹). الگوی تغییرات میزان پروتئین در برگ طی مراحل نمو و میزان آن در دانه موید نتایج مورد اشاره است (جدول ۱).

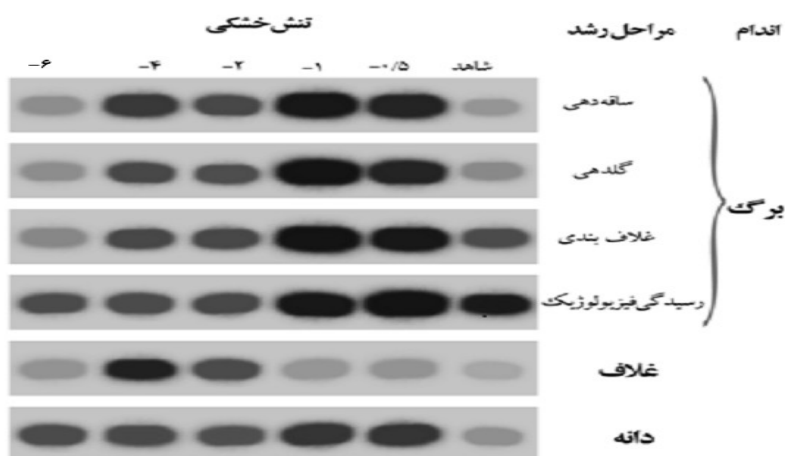
میزان بیان ژن گلوتامین سیننتاز با افزایش شدت تنش خشکی تا مرز ۱- بار افزایش و پس از آن روند کاهشی نشان داد (شکل ۳). چنین الگوی بیانی در مورد بسیاری از ژنها و فعالیت متابولیکی آنزیم ها دیده می شود. به نظر می رسد عوامل کنترلی بیان ژنها با بیشترین ظرفیت ممکن تا یک نقطه ی حداکثری (آستانه) نسبت به یک عامل محرک

میزان بیان ژن گلوتامین سیننتاز با افزایش شدت تنش خشکی تا مرز ۱- بار افزایش و پس از آن روند کاهشی نشان داد (شکل ۳). چنین الگوی بیانی در مورد بسیاری از ژنها و فعالیت متابولیکی آنزیم ها دیده می شود. به نظر می رسد عوامل کنترلی بیان ژنها با بیشترین ظرفیت ممکن تا یک نقطه ی حداکثری (آستانه) نسبت به یک عامل محرک

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

(تنش) واکنش مثبت نشان داده و پس از آن به دلیل عدم وجود پتانسیل کافی برای واکنش روند کاهش 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 مطالعه ی روند فرآیند پیری و تاثیر تنش های شدیدتر محیطی در غلاف در مقایسه با برگ می تواند 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 می باشد.

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 می رسد غلاف سهم عمده ای در فتوسنتز، ماده سازی و در ادامه ی 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

1. 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 Cyanobacterium prochlorococcus sp. Strain pcc 9511 (oxyphotobacteria). *Appl. And environ. Microbial.* 67: 2202-2207.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Hörtensteiner, S. and U. Feller. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot* 53: 927-937.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Metraux, J.P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European J. of Plant Pathology,* 107: 13-18.
11. 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.
12. Olsson, L.C., M. Veit, G. Weissenböck and J.F. Bornman. 1998. Differential flavonoids response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry.* 49(4): 1021-1028.
13. Page, T., G. Griffiths and V. Buchanan-Wollaston. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol.* 125: 718-727.
14. 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 synthetases, and glutamate synthesis. In: B. J. Mifflin (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 University Mashhad*. 7(1): 25-33.

## Evaluation of Glutamine Syntetase Gene Role in Growth Stage of Brassica Napusat and Drought Stress Condition

S. Navabpour<sup>1</sup> and R. Haddad<sup>2</sup>

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 liter respectively) have been irrigated, also field capacity (FC) irrigation (6.8 liter) 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 with 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