



بیان ژن‌های درگیر در متابولسیم فروکتان در ساقه گندم تحت تنش کم‌آبی

سعید باقری کیا^۱، محمدهادی پهلوانی^۲، احد یامچی^۳، خلیل زینلی‌نژاد^۳ و علی مصطفایی^۴

۱- دانش‌آموخته دکتری و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسئول: hpahlavani@yahoo.com)
۳- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
۴- تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۹

چکیده

تنش کم‌آبی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید گندم در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان از جمله ایران محسوب می‌شود. در شرایط تنش کم‌آبی فتوسنتز محدود شده و انتقال مجدد آسیمیلات‌های ذخیره شده در ساقه برای پر شدن دانه‌ها اهمیت بیشتری می‌یابد. به منظور آنالیز مولکولی انتقال مجدد فروکتان در ساقه گندم (پنالتیمیت) تحت تنش کم‌آبی انتهایی، لاین موتانت T-65-7-1 (نسل هفتم و حاصل از پرتوتابی گاما) به همراه رقم تیپ وحشی آن (رقم طبعی) از نظر بیان نسبی ژن‌های درگیر در بیوسنتز و هیدرولیز فروکتان و انتقال ساکارز مورد مطالعه قرار گرفتند. اعمال کم‌آبی (۴۰-۳۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه) در مرحله ظهور کامل سنبله (زادوکس ۶۰) آغاز شد و نمونه‌برداری‌ها در ۲ مرحله (۷ و ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی) انجام شد. در لاین موتانت T-65-7-1 افزایش قابل توجهی در سطوح بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز فروکتان (1-SST و 6-SFT)، هیدرولیز فروکتان (6-FEH) و همچنین انتقال ساکارز (SUT1 و SUT2) نسبت به تیپ وحشی (رقم طبعی) مشاهده شد. همین امر علت انتقال مجدد بیشتر موتانت T-65-7-1 در مقایسه با تیپ وحشی می‌باشد. در موتانت T-65-7-1 در اوایل دوره پر شدن دانه‌ها 1-SST و 6-SFT فروکتان بیشتری در ساقه ذخیره می‌کنند. همچنین طی مرحله سریع پر شدن دانه‌ها، 6-FEH ساکارز بیشتری تولید می‌کند و در نهایت SUT1 و SUT2 ساکارز بیشتری از ساقه به دانه منتقل می‌نمایند. در برنامه‌های اصلاحی گندم، ژن‌های 1-SST، 6-SFT، 6-FEH و SUT1 می‌توانند به عنوان معیاری برای گزینش ژنوتیپ‌هایی با محتوای فروکتان بالاتر و انتقال مجدد بیشتر مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: خشکی، موتانت، انتقال مجدد، ساکارز

مقدمه

گندم در ایران بیشتر به صورت دیم کشت می‌شود که در دوره پر شدن دانه با تنش کم‌آبی مواجه است. پر شدن دانه‌ها و پیش از گل‌دهی بحرانی‌ترین مراحل رشد و نمو گندم به تنش کم‌آبی است (۱۰). کمبود آب تنها محدود به اقلیم‌های خشک نیست، حتی در اقلیم‌های مرطوب توزیع نامناسب بارندگی ممکن است منتهی به دوره‌هایی شود که گیاهان با کمبود آب مواجه می‌شوند (۵). فتوسنتز جاری برگ (عمدتاً برگ پرچم) و انتقال مجدد مواد ذخیره‌شده در بافت‌های ساقه دو منبع اصلی تأمین‌کننده کربن در فرآیند پر شدن دانه هستند (۲۶). تنش خشکی در زمان پر شدن دانه‌ها باعث کاهش عملکرد دانه از طریق تقلیل فتوسنتز می‌شود، بنابراین نیاز مقصد برای پر کردن دانه از طریق انتقال مجدد مواد فتوسنتزی ذخیره‌شده تأمین می‌گردد. لذا در شرایط تنش، انتقال مجدد مواد فتوسنتزی به منظور پر کردن دانه‌ها اهمیت بیشتری می‌یابد (۱۹،۹). تنش کم‌آبی می‌تواند باعث القا پیری زودرس شود و انتقال مجدد آسیمیلات‌ها را به دانه افزایش دهد (۸). فروکتان بیشترین محتوای کربوهیدرات محلول در آب کل بافت‌های رویشی گندم را تشکیل می‌دهد (۲۴). فروکتان در گندم از نوع گرامینه است و در واکوئل ساخته می‌شوند. الیگو و پلی ساکاریدهای خطی یا منشعب بر پایه فروکتوز با پیوندهای $\beta(2,1)$ یا $\beta(2,6)$ می‌باشد و از ساکارز مشتق شده است (۲۵). بیوسنتز فروکتان توسط ژن‌های 1-SST (ساکارز: ساکارز-۱-فروکتوزیل ترانسفراز^۱)، 6-SFT (ساکارز: فروکتان-۶-فروکتوزیل ترانسفراز^۲) و ژن 1-FFT (ساکارز: فروکتان-۶-فروکتوزیل ترانسفراز^۳) و ژن

(فروکتان: فروکتان ۱- فروکتوزیل ترانسفراز^۳) صورت می‌گیرد (۲۹،۲۳). 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 (۳۳،۲۳). ساکارز مهم‌ترین قند موجود در آوند آبکش است که محل اصلی ذخیره آن در سلول، واکوئل است (۱۵). انتقال ساکارز از واکوئل به سیتوپلاسم توسط SUT2^۵ واقع در تونوپلاست صورت می‌گیرد (۷). همچنین در زمان بارگذاری آوند آبکش، جابجایی ساکارز در عرض غشا پلاسمایی از طریق SUT1 صورت می‌گیرد (۱). کربوهیدرات‌های محلول در آب تا مراحل اولیه پر شدن دانه‌ها در ساقه به صورت موقتی تجمع می‌یابند (۱۱)، همچنین دوره سریع پر شدن دانه‌ها در گندم طی ۱۴ تا ۲۸ روز پس از گرده‌افشانی اتفاق می‌افتد (۲۰). به عبارت دیگر اوج فعالیت آنزیم‌های درگیر در انتقال مجدد کربوهیدرات‌ها در جهت پر شدن دانه‌ها می‌باشد (۳۴). مطالعات فیزیولوژیکی گیاهی در واکنش به کم‌آبی پیچیده است. یکی از مشکلات در معرفی رقم متحمل به تنش این است که این ارقام با ژنوتیپ‌های آستانه که فاصله ژنتیکی زیادی از هم دارند، مقایسه می‌شوند. استفاده از موتانت‌ها، ابزار بسیاری مناسب برای مطالعه ژنتیک گیاهی هستند و مطالعه آن‌ها می‌تواند جهت توسعه گیاهان متحمل به کم‌آبی امیدبخش باشد (۲۷،۲۲). در مطالعات قبلی ما مشخص شد لاین موتانت T-65-7-1 در مقایسه با رقم تیپ

1- Sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST)
3- Fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT)
5- Sucrose transporter (SUT)

2- Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT)
4- Fructan exohydrolase (FEH)

مجدد و کارایی انتقال مجدد کربوهیدرات‌های محلول ساقه، بهتر عمل می‌نماید. علت این امر قدرت مخزن (عملکرد) بالاتر و بروز پیری زودرس (با توجه به بیان نسبی ژن‌های فتوسنتزی درگیر در چرخه کالوین) در لاین موتانت T-65-7-1 نسبت به رقم تیپ وحشی گزارش شد (۲). این پژوهش با هدف بررسی بیان نسبی ژن‌های درگیر در بیوسنتز فروکتان در اوایل دوره پر شدن دانه‌ها (۷ روز پس از گرده‌افشانی) و بیان نسبی ژن‌های درگیر در هیدرولیز فروکتان و انتقال ساکارز در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها (۲۱ روز پس از گرده‌افشانی) در ساقه (پنالتیمیت) تحت تنش کم‌آبی انجام شد. آگاهی از بیان ژن‌های درگیر متابولیسم فروکتان می‌تواند به معرفی معیاری برای گزینش ژنوتیپ‌هایی با محتوای فروکتان بالاتر و انتقال مجدد بیشتر کمک نماید و از این طریق مانع از کاهش شدید عملکرد گندم تحت تنش کم‌آبی در انتهای فصل شود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۲ اجرا گردید. 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 طوسی به عنوان تیپ وحشی آن (رقم والدی) بود. دو ژنوتیپ در سه تکرار در گلدان‌هایی حاوی ۱۰ کیلوگرم خاک با ترکیب رس، ماسه بادی و کود حیوانی به نسبت ۱:۲:۱ انجام شد. در هر واحد آزمایشی (گلدان) ۱۰ بذر کشت گردید.

اعمال تنش و نمونه‌برداری

اعمال تنش و قطع آبیاری در مرحله زادوکس ۶۰ (ظهور کامل سنبله) انجام شد (۳۲). ساقه اصلی بوته‌های موجود در هر گلدان با در نظر گرفتن نمایان شدن اولین سنبله از میان غلاف برگ پرچم در هر بوته نشان‌دار گردید. رطوبت گلدان‌ها در شرایط شاهد از طریق آبیاری منظم در محدوده ظرفیت زراعی نگهداری می‌شدند، در شرایط تنش کم‌آبی نیز رطوبت گلدان‌ها به وسیله توزین منظم روزانه در حدود ۴۰-۳۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری گردیدند (۳). نمونه‌برداری به صورت تصادفی از پنالتیمیت ساقه‌های اصلی نشان‌دار شده (به همراه غلاف برگ) با طول تقریباً یکسان در ۲۱ روز پس از شروع گرده‌افشانی صورت گرفت و پس از فریز شدن در ازلت مایع در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. طبق گزارش‌های پیشین از بین میانگرم‌های ساقه بخش پنالتیمیت دارای بیشترین انتقال مجدد می‌باشد (۲۶، ۱۸، ۱۷، ۴). بنابراین از میانگرم پنالتیمیت (به همراه غلاف برگ) برای مطالعه بیان نسبی ژن‌ها استفاده شد.

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 تیمار DNaseI کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز

ژل آگارز تعیین گردید. ساخت cDNA به روش پیشنهادی شرکت Fermentas انجام شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مرراز کمی در زمان واقعی (q-PCR) 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 اجرا گردیدند.

آغازگرهای مورد استفاده و تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده، جهت ارزیابی الگوی بیان نسبی ژن‌های درگیر در بیوسنتز فروکتان (*1-SST*، *6-SFT* و *1-FFT*)، هیدولیز فروکتان (*1-FEH* و *6-FEH*) و انتقال ساکارز (*SUT1* و *SUT2*) در جدول ۱ آمده است. برخی از آغازگر از مطالعات پیشین استخراج شدند (جدول ۱) و برخی دیگر با استفاده از نرم‌افزار AllelID7 طراحی شدند. از ژن خانه‌دار *GAPDH* برای کنترل داخلی استفاده شد (۱۲). ارزیابی سطح بیان نسبی ژن‌ها بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (۱۶) نسبت به گیاهان کنترل و با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بیان ژن نیز با استفاده از نرم‌افزار GenEx6 انجام شد.

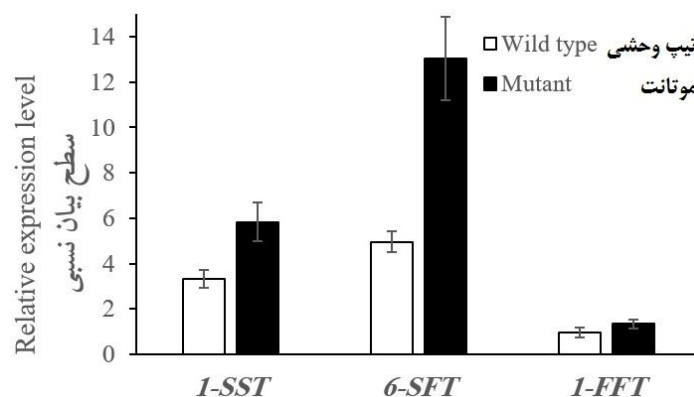
نتایج و بحث

در این پژوهش سطوح بیان نسبی ژن‌های بیوسنتز کننده فروکتان (*1-SST*، *6-SFT* و *1-FFT*) در اوایل دوره پر شدن دانه‌ها (۷ روز پس از گرده‌افشانی) و سطوح بیان نسبی ژن‌های درگیر در هیدولیز فروکتان (*1-FEH* و *6-FEH*) و انتقال ساکارز (*SUT1* و *SUT2*) در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها (۲۱ روز پس از گرده‌افشانی) در ساقه (پنالتیمیت) بررسی شدند.

بیان نسبی ژن‌های درگیر در سنتز فروکتان

نتایج ما نشان داد که تنش کم‌آبی در اوایل دوره پر شدن دانه‌ها باعث افزایش معنی‌داری در سطح بیان نسبی ژن‌های *1-SST*، *6-SFT* در هردو ژنوتیپ شد. در مقابل تنش کم‌آبی تأثیری بر سطح بیان نسبی ژن *1-FFT* در هر دو ژنوتیپ نداشت (شکل ۱). افزایش سطح بیان ژن *1-SST* تحت تنش کم‌آبی در لاین موتانت T-65-7-1 (۵/۸۳ برابر شرایط کنترل) بیشتر از رقم تیپ وحشی (۳/۳۱ برابر شرایط کنترل) بود. همین شرایط در مورد سطح بیان ژن *6-SFT* صادق بود، به طوری که افزایش بیان ژن *6-SFT* تحت تنش کم‌آبی در لاین موتانت T-65-7-1 و رقم تیپ وحشی به ترتیب ۱۳/۰۲ و ۴/۹۶ برابر شرایط کنترل بود (شکل ۱). کربوهیدرات‌های محلول در آب می‌تواند در ساقه و غلاف برگ گندم طی طویل شدن ساقه تا مراحل اولیه پر شدن دانه‌ها به صورت موقتی تجمع یابد و در پر شدن دانه‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۲۸، ۱۱). با وجود کاهش تثبیت کربوهیدرات‌های محلول در گیاهان تحت تنش کم‌آبی، مقدار زیادی کربوهیدرات‌های محلول شامل گلوکز، فروکتوز، ساکارز و فروکتان تجمع می‌یابد (۳۱، ۱۳). فروکتان بیشترین محتوای کربوهیدرات محلول در آب کل بافت‌های رویشی گندم را تشکیل می‌دهد که دارای پیوندهای (2,1) β و (2,6) β

می‌باشد (۲۴). پیوندهای (2,6) β با فعالیت *I-SST* و *6-SFT* و پیوندهای (2,1) β با فعالیت *I-FFT* تشکیل می‌شود که مورد آخر در ساخت فروکتان گندم نقش کمتری دارد (۲۵).



شکل ۱- سطوح بیان نسبی ژن‌های بیوسنتز کننده فروکتان *I-SST*، *6-SFT* و *I-FFT* تحت تنش کم‌آبی در اوایل دوره پر شدن دانه‌ها (۷ روز پس از گرده‌افشانی) در ساقه لاین موتانت و تیپ وحشی گندم
Figure 1. Relative gene expression levels of fructan biosynthesis *I-SST*, *6-SFT* and *I-FFT* under water deficit stress in early grain filling stage (7-day post anthesis) in stem of bread mutant line and wild type

جدول ۱- جفت آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Specific primer pairs used in this study

نام پرایمر	مستقیم (۵' → ۳')	برگشتی (۵' → ۳')	دمای ذوب (°C)	طول باند (bp)	منبع
<i>I-SST</i>	GCGACTCTGCCTATCACTTC	CATAGCCCTGTCATCAACAC	۶۰	۸۸	
<i>6-SFT</i>	CGATCACTCGTATGTTCAATG	CACGGATAGATGTTTCTGTTC	۶۰	۱۱۸	
<i>I-FFT</i>	GGTCCGTGGAGCTTCCTTTTAT	CCGGAACCAAAAACATAAAATCAA	۶۰	۹۳	۲۹
<i>I-FEH</i>	GCATCACATCCAGAGTTTATCC	CCCTTCTCCACATTCACCTTG	۶۰	۱۴۵	
<i>6-FEH</i>	GAGCACACGGCTATCTTCTTCA	CCACTACCGAATGGTCAATCAA	۶۰	۱۹۳	۱۴
<i>SUT1</i>	CGCATAGGCGTAAGTAGGG	CACATACAGACACAACACATACA	۶۰	۹۱	
<i>SUT2</i>	TACGGAGTCCTGCTCTGTCA	CTCGTCGCTCCGAAAGTA	۶۰	۱۳۰	۷
<i>GAPDH</i>	TCACCACCGACTACATGACC	ACAGCAACCTCCTTCTCACC	۶۰	۱۲۱	

موتانت T-65-7-1 از هر دو مکانیسم تنظیم اسمزی و انتقال مجدد کربوهیدرات‌ها استفاده می‌کند.

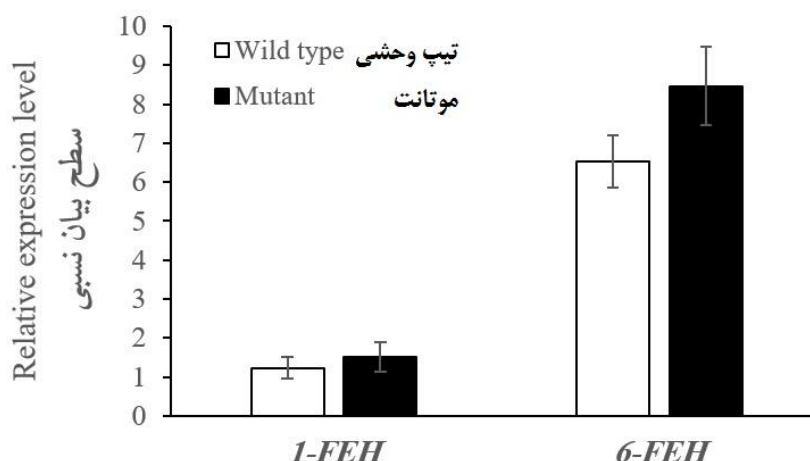
بیان نسبی ژن‌های درگیر در هیدرولیز فروکتان

نتایج ما نشان داد در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی، تنش کم‌آبی باعث تغییر معنی‌داری در بیان ژن *I-FEH* نشد در حالی که افزایش معنی‌داری در سطح بیان نسبی ژن *6-FEH* مشاهده شد (شکل ۲). افزایش سطح بیان نسبی ژن *6-FEH* در لاین موتانت T-65-7-1 (۸/۴۷ برابر شرایط کنترل) بیشتر از رقم تیپ وحشی (۶/۵۲ برابر شرایط کنترل) بود (شکل ۲). در مطالعه ژو و همکاران (۲۹) نیز بیان ژن *I-FEH* در برگ پرچم گندم تحت تاثیر کم‌آبی قرار نگرفت در حالی که *6-FEH* به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین جودی و همکاران (۱۳) با بررسی فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده فروکتان تحت تنش کم‌آبی در انتهای فصل رشد، نقش بارزتر *6-FEH* را نسبت *I-FEH* در گندم گزارش کردند. افزایش بیان ژن *6-FEH*، نشان دهنده افزایش انتقال مجدد فروکتان تحت تنش کم‌آبی در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها بخصوص در لاین موتانت T-65-7-1 می‌باشد. هیدرولیز فروکتان و

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 افزایش تجمع فروکتان تحت تنش کم‌آبی نسبت به رقم تیپ وحشی است. تحت تاثیر قرار نگرفتن *I-FFT* ممکن است به دلیل نقش کمتر آن در سنتز فروکتان باشد. گزارش شده است که تنوع ژنتیکی در تجمع فروکتان در بین ژنوتیپ‌ها ناشی از فعالیت آنزیم‌های مربوط به دو ژن *I-SST* و *6-SFT* می‌باشد (۳۰). افزایش بیان ژن‌های *I-SST* و *6-SFT* تحت تنش کم‌آبی و نقش آن در محتوای کربوهیدرات‌های محلول در آب، توسط محققین دیگری نیز گزارش شده است (۳۰، ۱۴). یکی از کارکردهای افزایش تجمع فروکتان و ساکارز تنظیم‌کنندگی اسمزی آن‌ها است که باعث تنظیم حفاظت سلولی در مقابل تنش می‌شوند (۲۹، ۶). بر اساس گزارش سابارو و همکاران (۲۱) تنظیم اسمزی، انتقال مجدد کربوهیدرات‌ها را طی پر شدن دانه‌ها، حدود دو برابر افزایش می‌دهد. شریختواری و همکاران (۱۸) همبستگی مثبتی بین فشار اسمزی با محتوای فروکتان و انتقال مجدد تحت تنش شوری گزارش کردند. به نظر می‌رسد لاین

شدن دانه بالا است ساکارز محدود شده و فروکتان برای تأمین نیاز ساکارز گیاه، توسط آنزیم‌های FEH به ساکارز و فروکتوز هیدرولیز می‌شود (۳۳). به نظر می‌رسد قدرت مخزن (عملکرد) بالاتر و بروز پیری زودرس لاین موتانت T-65-7-1 (۲) باعث محدود شدن ساکارز شده و افزایش بیان ژن 6-FEH را در جهت تأمین ساکارز دانه به دنبال داشته است (۳۳).

تبدیل به ساکارز و فروکتوز توسط 1-FEHs و 6-FEHs صورت می‌گیرد که به ترتیب بیشتر باعث شکست پیوندهای $\beta(2,6)$ و $\beta(2,1)$ فروکتان می‌شوند (۳۳،۲۳). عدم تغییرات معنی‌دار در دو ژنوتیپ از نظر سطح بیان ژن‌های 1-FFT و 1-FEH در اثر تنش کم‌آبی (شکل ۱ و ۲) بیانگر این است که که فرم غالب پیوند فروکتان $\beta(2,6)$ تحت تأثیر تنش کم‌آبی قرار گرفته است. به‌طور کلی وقتی که تقاضا برای پر



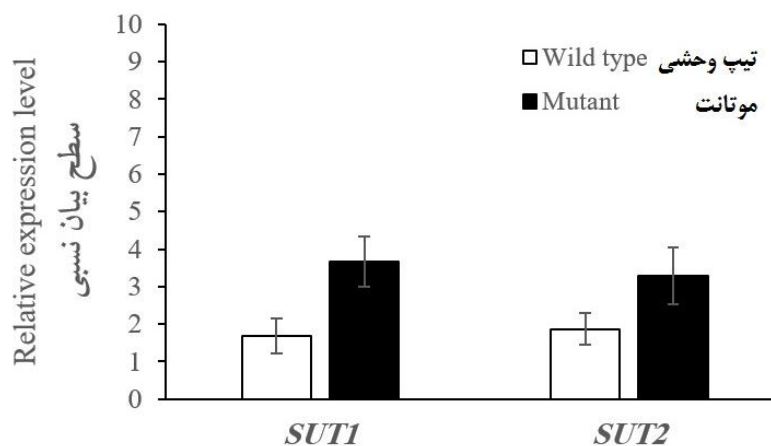
شکل ۲- سطوح بیان نسبی ژن‌های هیدرولیز کننده فروکتان 1-FEH و 6-FEH تحت تنش کم‌آبی در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها (۲۱ روز پس از گرده‌افشانی) در ساقه لاین موتانت و تیپ وحشی گندم

Figure 2. Relative gene expression levels of fructan hydrolysis 1-FEH and 6-FEH under water deficit stress in rapid grain filling stage (21-day post anthesis) in stem of bread mutant line and wild type

دانه‌ها) و همچنین هیدرولیز فروکتان و انتقال ساکارز (در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها) بود. افزایش بیشتر بیان نسبی ژن‌های 1-SST و 6-SFT در اوایل دوره پر شدن دانه‌ها 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 ساکارز بیشتری در واکوئل سلول‌های لاین موتانت T-65-7-1 تولید شده است. سرانجام بیان بیشتر ژن‌های SUT1 و SUT2 باعث انتقال ساکارز بیشتری به دانه شده است. سطوح بیان ژن‌های 1-FEH و 1-FFT در هیچ کدام از ژنوتیپ‌ها تحت تنش کم‌آبی قرار نگرفت که نشان دهنده آن است که تنها فرم غالب پیوند فروکتان $\beta(2,6)$ تحت تأثیر تنش کم‌آبی قرار گرفته است. از ژن‌های 1-SST، 6-SFT، 6-FEH، SUT1 و SUT2 می‌توان به عنوان معیاری برای گزینش ژنوتیپ‌هایی با محتوای فروکتان بالاتر و انتقال مجدد بیشتر در برنامه‌های اصلاحی گندم تحت تنش کم‌آبی استفاده نمود و به این وسیله مانع از کاهش شدید عملکرد گندم در شرایط تنش کم‌آبی در انتهای فصل رشد شد.

بیان نسبی ژن‌های درگیر در انتقال ساکارز

سطوح بیان نسبی ژن‌های منتقل کننده ساکارز (SUT1 و SUT2) تحت تنش کم‌آبی در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها در لاین موتانت T-65-7-1 به طور معنی‌داری افزایش یافت در حالی که در رقم تیپ وحشی معنی‌دار نبود (شکل ۳). این افزایش معنی‌دار تغییر بیان ژن در اثر تنش کم‌آبی در لاین موتانت T-65-7-1 برای ژن SUT1، ۳/۶۶ برابر شرایط کنترل و برای ژن SUT2، ۳/۲۸ برابر شرایط کنترل بود (شکل ۳). انتقال قند از منبع به مخزن یکی از عوامل اصلی رشد گیاه است (۱۵). انتقال ساکارز از واکوئل به سیتوپلاسم و از سیتوپلاسم به اپوپلاست به ترتیب در اثر عمل ژن‌های SUT2 و SUT1 انجام می‌گیرد (۷،۱). افزایش بیان بالای ژن‌های منتقل کننده ساکارز (SUT1 و SUT2) در لاین موتانت T-65-7-1 به منزله افزایش انتقال ساکارز در فرآیند انتقال مجدد از ساقه به دانه است. با توجه به نتایج این آزمایش می‌توان گفت افزایش انتقال مجدد کربوهیدرات از ساقه به دانه تحت تنش کم‌آبی در لاین موتانت T-65-7-1 نسبت به تیپ وحشی به دلیل افزایش قابل توجه در سطح بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز فروکتان (در اوایل دوره پر شدن



شکل ۳- سطوح بیان نسبی ژن‌های انتقال‌دهنده ساکارز *SUT1* و *SUT2* تحت تنش کم‌آبی در مرحله سریع پر شدن دانه‌ها (۲۱ روز پس از گرده‌افشانی) در ساقه لاین موتانت و تیپ وحشی گندم

Figure 3. Relative gene expression levels of sucrose transporter *SUT1* and *SUT2* under water deficit stress in rapid grain filling stage (21-day post anthesis) in stem of bread mutant line and wild type

منابع

- Aoki, N., G.N. Scofield, X.D. Wang, J.W. Patrick, C.E. Offler and R.T. Furbank. 2004. Expression and localisation analysis of the wheat sucrose transporter TaSUT1 in vegetative tissues. *Planta*, 219: 176-84.
- Bagherikia, S., M.H. Pahlevani, A. Yamchi, K. Zenalinezhad and A. Mostafaie. 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(4): 1-16.
- Bazargani, M.M., E. Sarhadi, A.A.S. Bushehri, A. Matros, H.P. Mock, M.R. Naghavi, V. Hajihoseini, M. Mardi, M.R. Hajirezaei and F. Moradi. 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: 59-73.
- Blum, A. 1998. Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica*, 100: 77-83.
- Boyer, J. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology*, 46: 233-35.
- Daloso, D.M., L. Anjos and A.R. Fernie. 2016. Roles of sucrose in guard cell regulation. *New Phytologist*, 211: 809-818.
- Deol, K.K., S. Mukherjee, F. Gao, A. Brûlé-Babel, C. Stasolla and B.T. Ayele. 2013. Identification and characterization of the three homeologues of a new sucrose transporter in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 13: 181 pp.
- Distelfeld, A., R. Avni and A.M. Fischer. 2014. Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany*, 65: 3783-98.
- Elahi, K., R. Haghparast, R. Mohammadi, M. Niazian and R. Rajabi. 2011. Evaluation of Bread Wheat Genotypes for Grain Yield and Physiomorphological Traits Related to Drought Tolerance in Participatory Plant Breeding Program. *Journal of Crop Breeding*, 3: 1-14 (In Persian).
- Farooq, M., M. Hussain and K.H. Siddique. 2014. Drought stress in wheat during flowering and grain-filling periods. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33: 331-49.
- Gebbing, T. 2003. The enclosed and exposed part of the peduncle of wheat (*Triticum aestivum*)—spatial separation of fructan storage. *New Phytologist*, 159: 245-52.
- Gonçalves, S., J. Cairney and J. Maroco. 2005. Evaluation of control transcripts in real-time RT-PCR expression analysis during maritime pine embryogenesis. *Planta*, 222: 556-63.
- Joudi, M., A. Ahmadi, V. Mohamadi, A. Abbasi, R. Vergauwen, H. Mohammadi and W. Van den Ende. 2012. Comparison of fructan dynamics in two wheat cultivars with different capacities of accumulation and remobilization under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 144: 1-12.
- Khoshro, H.H., A. Taleei, M.R. Bihamta, M. Shahbazi, A. Abbasi and S.S. Ramezanpour. 2014. Expression analysis of the genes involved in accumulation and remobilization of assimilates in wheat stem under terminal drought stress. *Plant Growth Regulation*, 74: 165-76.
- Lemoine, R., S. La Camera, R. Atanassova, F. Dédaldéchamp, T. Allario, N. Pourtau, J.L. Bonnemain, M. Laloi, P. Coutos-Thévenot and L. Maurousset. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, 4: 272 pp.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 45 pp.
- Scofield, G.N., T. Hirose, N. Aoki and R.T. Furbank. 2007. Involvement of the sucrose transporter, OsSUT1, in the long-distance pathway for assimilate transport in rice. *Journal of Experimental Botany*, 58: 3155-69.

18. Sharbatkhari, M., Z.S. Shobbar, S. Galeshi and B. Nakhoda. 2016. Wheat stem reserves and salinity tolerance: molecular dissection of fructan biosynthesis and remobilization to grains. *Planta*, 244: 191-202.
19. Sharma-Natu, P. and M. Ghildiyal. 2005. Potential targets for improving photosynthesis and crop yield. *Current Science*, 88: 1918-28.
20. Shewry, P.R., R.A. Mitchell, P. Tosi, Y. Wan, C. Underwood, A. Lovegrove, J. Freeman, G.A. Toole, E.C. Mills and J.L. Ward. 2012. An integrated study of grain development of wheat (cv. Hereward). *Journal of Cereal Science*, 56: 21-30.
21. Subbarao, G.V., N.H. Nam, Y.S. Chauhan and C. Johansen. 2000. Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water deficits. *Journal of Plant Physiology*, 157: 651-59.
22. Tuberosa, R. and S. Salvi. 2006. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in Plant Science*, 11: 405-12.
23. Van den Ende, W., S. Clerens, R. Vergauwen, L. Van Riet, A. Van Laere, M. Yoshida and A. Kawakami. 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: 621-31.
24. Van den Ende, W. and S.K. El-Esawe. 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.
25. Verspreet, J., S. Cimini, R. Vergauwen, E. Dornez, V. Locato, K. Le Roy, L. De Gara, W. Van den Ende, J.A. Delcour and C.M. Courtin. 2013. Fructan metabolism in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels. *Plant and Cell Physiology*, 54: 2047-2057.
26. Wardlaw, I. and J. Willenbrink. 2000. Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytologist*, 148: 413-22.
27. Xu, S., C. Chu, M. Harris and C. Williams. 2010. Comparative analysis of genetic background in eight near-isogenic wheat lines with different H genes conferring resistance to Hessian fly. *Genome*, 54: 81-89.
28. Xue, G.P., J. Drenth, D. Glassop, M. Kooiker and C.L. McIntyre. 2013. Dissecting the molecular basis of the contribution of source strength to high fructan accumulation in wheat. *Plant Molecular Biology*, 81: 71-92.
29. Xue, G.P., C.L. McIntyre, D. Glassop and R. Shorter. 2008. Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology*, 67: 197-214.
30. Xue, G.P., C.L. McIntyre, C.L.D. Jenkins, D. Glassop, A.F. van Herwaarden and R. Shorter. 2008. Molecular Dissection of Variation in Carbohydrate Metabolism Related to Water-Soluble Carbohydrate Accumulation in Stems of Wheat. *Plant Physiology*, 146: 441-54.
31. Yang, J., J. Zhang, Z. Wang, Q. Zhu and L. Liu. 2004. Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta*, 220: 331-43.
32. Zadoks, J.C., T.T. Chang and C.F. Konzak. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14: 415-21.
33. Zhang, J., B. Dell, E. Conocono, I. Waters, T. Setter and R. Appels. 2009. Water deficits in wheat: fructan exohydrolase (*I-FEH*) mRNA expression and relationship to soluble carbohydrate concentrations in two varieties. *New Phytologist*, 181: 843-50.
34. Zhang, J., B. Dell, W. Ma, R. Vergauwen, X. Zhang, T. Oteri, A. Foreman, D. Laird and W. Van den Ende. 2016. Contributions of Root WSC during Grain Filling in Wheat under Drought. *Frontiers in Plant Science*, 7: 904 pp.

Expression of Genes Involved in Fructan Metabolism in wheat Stem under Water Deficit Stress

Saeed Bagherikia¹, Mohammadhadi Pahlevani², Ahad Yamchi³, Khalil Zenalinezhad³ and Ali Mostafaie⁴

1 and 3- Ph. D. Candidate and Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

2- Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,

(Corresponding author: hpahlavani@yahoo.com).

4- Professor in Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences.

Receive: January 14, 2017

Accepted: April 29, 2017

Abstract

Water deficient stress is one of the major limiting factors of wheat production in arid and semiarid areas of the world such as Iran. Under water deficient stress photosynthesis is limited and remobilization of assimilates stored in stems is more important to grain filling. In order to molecular analysis of fructan remobilization in wheat stem (penultimate) under terminal water deficit stress, T-65-7-1 mutant line (M_7 , the results of gamma irradiation) along with its wild type (cv. Tabasi), in terms of relative gene expression involved in biosynthesis and hydrolysis of fructan and transport of sucrose were studied. Water deficit treatment (30-40% field capacity) initiated at full heading stage (Zadoks 60) and sampling was conducted at two stages (7 and 21 days post anthesis). In the T-65-7-1 mutant line, a significant increase was observed in expression levels of genes involved in fructan biosynthesis (*1-SST* and *6-SFT*), fructan biosynthesis (*6-FEH*) as well as sucrose transport (*SUT1* and *SUT2*) compared to the wild type (cv. Tabasi). This event is due to more remobilization in T-65-7-1 mutant compared to the wild type. In T-65-7-1 mutant, during early grain filling period, *1-SST* and *6-SFT* produces more storage of fructan in the stem. Also, during rapid grain filling stage, *6-FEH* produces more sucrose and finally, *SUT1* and *SUT2* transports more sucrose from stem to grain. In wheat breeding programs, *1-SST*, *6-SFT*, *6-FEH*, *SUT1* and *SUT2* can be used as indicators for selecting genotypes with high fructan content and more remobilization.

Keywords: Drought, Mutant, Remobilization, Sucrose