

ارزیابی بیان ژن‌های مسیر تولید پرولین در گندم موتانت T65-58-8 تحت تنش خشکی

Evaluating expression of genes involved in proline synthesis pathway in mutant wheat T65-58-8 under drought stress

سحرسادات حسینی^۱، سیده ساناز رمضانپور^{۱*}، حسن سلطانلو^۱، شهربانو وکیلی بسطام^۲

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانش‌آموخته دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Hosseini SS¹, Ramezanzpour SS^{*1}, Soltanloo H¹, Vakili Bastam S²

1- Graduate MSc Student, Associate Professors, Department of Plant Breeding, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources

2- Graduate PhD Student, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ramezanzpours@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۱)

چکیده

تنش خشکی از عوامل مهم محدود کننده عملکرد در مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشد. تحمل به خشکی صفتی چندژنی است و در مراحل مختلف رشد و نمو ظاهر می‌شود. از آنجایی که ایجاد جهش روشی سریع و بی‌خطر می‌باشد، استفاده از آن به‌منظور تنوع بخشیدن به محتویات ژنتیکی با هدف ارتقای صفات کمی و کیفی در گیاهان زراعی مورد توجه خاص قرار گرفته است. در این بررسی، الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر سنتز پرولین، برخی ژن‌های دخیل در مسیر مستقل از آبسزیک اسید در رقم طبعی (حساس به خشکی) و لاین موتانت آن T65-58-8 (محتمل به خشکی) تیمار شده با اشعه گاما به‌میزان ۲۵۰ گری، در شرایط خشکی در مرحله گیاه بالغ مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور مطالعه بیان ژن‌های دخیل در تولید پرولین (*P5CDH* و *P5CR*, *P5CS*) و نیز اندازه‌گیری میزان پرولین در شرایط تنش خشکی و آبیاری مجدد، بذرهای دو ژنوتیپ در گلدان‌های ۲۴ سانتی‌متری کشت شدند. در هنگام خروج اولین بساک آبیاری قطع شد و در فواصل زمانی، سه، چهار، پنج و شش روز پس از خروج برگ پرچم نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌گیری ۱۲ ساعت پس از شروع آبیاری مجدد نیز در فواصل زمانی ۱۲ ساعت، سه، چهار و پنج روز صورت گرفت. هم‌زمان، از تیمار شاهد نیز نمونه‌گیری به‌عمل آمد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار بیولوژیکی انجام گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش تنش خشکی، بیان ژن *P5CS* در رقم طبعی بیش از لاین موتانت افزایش یافت، در حالی که بیان ژن *P5CR* در لاین موتانت بیش‌تر بود. بیان ژن *P5CDH* در لاین موتانت و رقم طبعی به‌ترتیب کاهش و افزایش یافت. پس از آبیاری مجدد بیان ژن‌های *P5CR* و *P5CS* در هر دو ژنوتیپ نسبت به شاهد کاهش نشان داد ولی بیان ژن *P5CDH* در لاین موتانت کاهش و در رقم طبعی افزایش یافت. هم‌چنین نتایج حاکی از افزایش بیش‌تر پرولین در لاین موتانت نسبت به رقم طبعی تحت تنش خشکی و کاهش آن در هر دو ژنوتیپ در اثر آبیاری مجدد می‌باشد. در کل، لاین موتانت T65-58-8 نسبت به رقم طبعی تحت تنش خشکی پاسخ‌های سازشی مناسبی را برای بیان ژن‌های دخیل در تولید پرولین در پیش گرفته تا از صدمات ناشی از آن محفوظ بماند و احتمال می‌رود مسیر اسمولیت تا حدی توسط اشعه گاما دستخوش تغییر شده باشد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن

پرولین

تنش خشکی

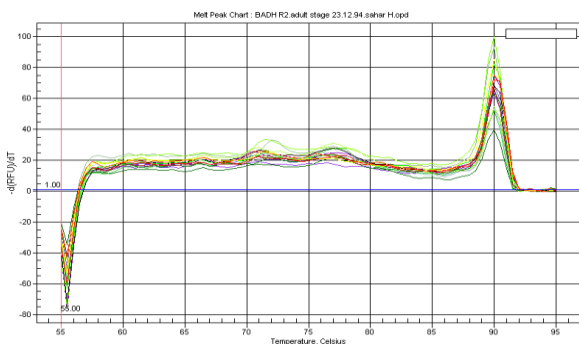
طبعی

لاین موتانت T65-58-8

کمیت سنجی توسط دستگاه آی سایکلر شرکت بایورد انجام شد. محلول واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر در تیوب‌های مخصوص تهیه شد. این محلول شامل سه میکرولیتر cDNA (با رقت ۱:۲۰)، نیم میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، ۹/۹ میکرولیتر 2X Real-Time PCR Master Mix سایبر گرین، نیم میکرولیتر DMSO، ۵ واحد در میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر عاری از RNase به ۲۰ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. چرخه‌های حرارتی واکنش شامل ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۹۵°C به مدت ۱۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها (جدول ۱) به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۲۰ ثانیه تنظیم شد.^۱ TEF به‌عنوان ژن مرجع و نمونه‌هایی که در معرض تنش نبودند به‌عنوان نمونه‌های شاهد جهت محاسبه سطح بیان نسبی ژن‌های دخیل در بیوسنتز پرولین استفاده شد.

غلظت آغازگر و دمای مرحله اتصال آغازگر از فاکتورهای اساسی در بهینه کردن واکنش PCR کمی محسوب می‌شود. شرایط بهینه طوری فراهم شد که بازدهی واکنش در بهترین حالت ممکن باشد و هیچ محصول غیراختصاصی در طول واکنش تولید نشود که این امر با استفاده از منحنی ذوب (مشاهده یک پیک ذوب منفرد برای هر تیمار) تایید شد (شکل ۲). سطح نسبی بیان ژن‌های مورد نظر در مقایسه با ژن‌های کنترل مرجع، با استفاده از نرم‌افزار REST (Pfaffl 2002) بر اساس رابطه زیر تجزیه و تحلیل شدند و نمودارهای مربوط در محیط Excel رسم شد.

$$R = \frac{(E_{target})^{\Delta C P_{target}} (Mean control - Mean sample)}{(E_{ref})^{\Delta C P_{ref}} (Mean control - Mean sample)}$$



شکل ۲- تجزیه منحنی درجه حرارت ذوب فرآورده‌های تکثیر شده PCR مربوط به ژن TEF

هدف از اجرای این پژوهش ارزیابی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر سنتز پرولین شامل *P5CR*، *P5CS* و *P5CDH* در لاین موتانت ۸-۵۸-۶۵ T65 (نیمه‌متحمل به خشکی) نسبت به والد وحشی طبعی (حساس به خشکی) در شرایط تنش خشکی و در مرحله گیاه بالغ، میزان تجمع اسمولیت پرولین و مطالعه توان برگشت‌پذیری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پس از آبیاری مجدد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با دو تکرار بیولوژیکی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. بذور دو ژنوتیپ طبعی (حساس به خشکی) و لاین موتانت (نیمه‌متحمل به خشکی) ۸-۵۸-۶۵ T65 در گلدان‌های ۲۴ سانتی‌متری کشت شدند.

در هنگام خروج اولین بوسه، آبیاری قطع شد. این قطعی تا زمان بروز علائم اولیه پژمردگی ادامه داشت (Siddique et al. 2000). پس از این مرحله مجدداً آبیاری صورت گرفت. پس از قطع آبیاری تا شروع آبیاری مجدد، در فواصل زمانی، سه، چهار، پنج و شش روز از برگ پرچم نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌گیری ۱۲ ساعت پس از شروع آبیاری مجدد در فواصل زمانی ۱۲ ساعت، سه، چهار و پنج روز نیز صورت گرفت. هم‌زمان از تیمار شاهد نیز نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌ها در ازلت مایع منجمد شده و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

RNA کل از نمونه برگ گیاه بالغ با استفاده از بافر p-BIOZOL (Bioflux، ژاپن) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. جهت حذف DNA باقی‌مانده در نمونه‌های RNA، از آنزیم *DNase I* (Fermantas) استفاده شد. واکنش نسخه‌برداری معکوس توسط آنزیم *Mmulv* (Fermantas) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و طیف‌سنجی مورد بررسی قرار گرفت. RT-PCR کمی، جهت تکثیر رونوشت‌های ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز پرولین با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) با استفاده از روش

¹ Translation Elongation Factor

شد. این مشاهدات نشان داد ژن *P5CS* می‌تواند از دو مسیر وابسته به ABA و مستقل از ABA بیان شود. همانطور که بیان ژن اول (*P5CS*) در مسیر ساخت پرولین با افزایش مدت زمان تنش بیشتر شد، انتظار می‌رود ژن دوم (*P5CR*) نیز در هر دو ژنوتیپ افزایش داشته باشد. این افزایش معنی‌دار در هر دو ژنوتیپ نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارها مشهود بوده، با این تفاوت که در رقم طوسی با افزایش روزهای تنش بیان ژن *P5CR* افزایش کمتری نسبت به لاین موتانت داشت. در واقع لاین موتانت به نسبتی که *P5CS* خود را بیان کرده، به میزان تقریباً برابر توانسته *P5CR* تولید کند که این امر در رقم طوسی مشاهده نمی‌شود. در لاین موتانت بیشترین میزان بیان ژن به ترتیب مربوط به روزهای ششم و پنجم پس از تنش خشکی بود (جدول ۳؛ شکل ۴). در واقع گیاه قادر بوده با شرایط تنش بوسیله افزایش ژن *P5CR* دخیل در ساخت پرولین، خود را از اثرات مخرب تنش حفظ کند. (Szoke et al. (1992) به نتیجه‌ای مشابه برای سطح بیان کمتر *P5CR* نسبت به *P5CS* تحت تنش اسمزی در سویا دست یافتند. این محققین از مطالعه خود روی بذره‌های سویا نتیجه گرفتند تحت تنش اسمزی سطح رونوشت *P5CR* افزایش می‌یابد، همچنین فعالیت *P5CR* نسبت به *P5CS* کمتر تاثیر می‌پذیرد که از نظر فیزیولوژیکی قابل توجه است و ممکن است به سازگاری گیاهان تحت شرایط تنش کمک کند. افزایش بیان ژن‌های *P5CS* و *P5CR* تحت تنش کم آبی در اواخر دوره تنش در آراییدوپسیس و لوبیا نیز گزارش شده است (Yoshiba et al. (1997). Verbruggen et al. (1993) گزارش کردند که در آراییدوپسیس، سطوح رونوشت *P5CR* تحت تنش شوری پنج برابر بیشتر در برگ‌ها و دو برابر بیشتر در ریشه نسبت به گیاهان شاهد بود. با این حال سطح بیان ژن *P5CR* در مقایسه با ژن *P5CS* در آراییدوپسیس کم بود. این نتایج نشان می‌دهد که ژن *P5CS* ممکن است نقشی مهم‌تر از ژن *P5CR* در تجمع پرولین تحت تنش اسمزی ایفا کند. بیان ژن *P5CR* تحت تنش شوری و خشکی در جو، باکتری کلورلا و گل همیشه بهار افزایش پیدا کرد که منجر به تجمع پرولین شد (Szoke et al. (1992).

اندازه‌گیری میزان پرولین با استفاده از روش (Bates et al. (1973) انجام شد. غلظت پرولین هر نمونه بر حسب میکرومول پرولین بر گرم وزن تازه گیاه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد، سپس برای رسم منحنی استاندارد محلول‌هایی با غلظت صفر، چهار، هشت، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴ و ۲۸ میلی‌گرم بر لیتر پرولین خالص تهیه شده و کلیه مراحل فوق بر روی هر کدام از نمونه‌ها انجام گرفت. داده‌های مربوط به پرولین توسط نرم‌افزارهای آماری SAS و SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر ژنوتیپ، تنش خشکی و اثر متقابل این دو بر بیان ژن‌های دخیل در تولید پرولین در مرحله خشکی معنی‌دار است (جدول ۲). با افزایش شدت تنش خشکی، بیان ژن *P5CS* در رقم طوسی و لاین موتانت ۸-۵۸-۶۵ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد. بیشترین میزان بیان ژن مربوط به تیمارهای شش روز پس از تنش خشکی در رقم طوسی (۱۵۱۸/۴) و لاین موتانت ۸-۵۸-۶۵ (۸۵/۳۳۱) بوده است. این افزایش بیان در رقم طوسی بیش از لاین موتانت ۸-۵۸-۶۵ بود. در رتبه دوم، افزایش بیان ژن مربوط به تیمار پنج روز پس از تنش خشکی قرار داشت (جدول ۳؛ شکل ۳). افزایش بیان بیش از حد (فرا بیان)^۱ رونوشت ژن *P5CS* برای بالا رفتن سطح پرولین در گیاه سیب‌زمینی تراریخته با افزایش روزهای تنش اسمزی گزارش شده است (Kishor 1995). (Savouré et al. (1995) گزارش کردند که بیان ژن *P5CS* به محض قرار گرفتن در تنش سرما و تنش اسمزی افزایش یافته و حتی بیان این ژن با تیمار خارجی ABA نیز فعال می‌شود. در مطالعه‌ای توسط Yoshiba et al. (1997)، بیان ژن *P5CS* توسط تنش اسمزی و تیمار خارجی ABA در والد وحشی آراییدوپسیس (حساس به ABA) و در موتانت آن (متحمل به ABA) تحریک

¹ Overexpression

P5CDH یک ساعت پس از شروع تنش خشکی تشخیص داده شد و با افزایش تنش، سطح بیان نیز کاهش یافت (Yoshiba et al, 1997). نتایج این بررسی نشان داد که کاهش بیان برخی از ژن‌ها به سازگاری گیاه در طول شرایط تنش کمک می‌کند، به‌عنوان مثال بیان ژن *P5CDH* در شرایط تنش کاهش پیدا می‌کند که در نهایت منجر به تجمع پرولین می‌شود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر ژنوتیپ، آبیاری مجدد و اثر متقابل این دو بر بیان ژن‌های دخیل در تولید پرولین در مرحله خشکی معنی‌دار است (جدول ۴). در رقم طوسی و لاین موتانت ۸-۵۸-۶۵ T سطح بیان ژن‌های *P5CR* و *P5CS* به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش نشان داد (جدول ۵؛ شکل ۶)، اما کاهش بیان ژن در لاین موتانت سریع‌تر از رقم طوسی بود (جدول ۵).

پرولین -۵- کربوکسیلات دهیدروژناز (*P5CDH*) ژنی است که انتظار می‌رود در شرایط تنش بیان آن کاهش یابد. بر این اساس با طولانی‌تر شدن دوره تنش میزان بیان ژن *P5CDH* در رقم طوسی افزایش یافت. بیش‌ترین میزان بیان ژن نسبت به شاهد و سایر تیمارها مربوط به شش روز پس از تنش خشکی (۲۴/۷۰۹) بوده و این افزایش منجر به تخریب پرولین ساخته شده در رقم طوسی می‌شود (جدول ۳؛ شکل ۵) درحالی‌که در لاین موتانت همان‌طور که انتظار می‌رود با افزایش روزهای سپری شده از تنش، بیان ژن به تدریج کاهش یافت و این نشان می‌دهد که گیاه به اندازه مورد نیاز پرولین را در بافت‌های ذخیره‌ای خود انباشته کرده و بیان بالای ژن *P5CS*، از ساخته شدن ژن *P5CDH* ممانعت می‌کند. در واقع می‌توان گفت که سطوح بیان رونوشت *P5CS* با *P5CDH* اثر متقابل دارند. در آراییدوپسیس سطح پایین

جدول ۱- مشخصات توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

نام آغازگر	شماره دسترسی	توالی (۳'→۵')	TM (°C)	طول محصول (bp)
<i>TEF</i>	M90077	For: TGACATGAGGCAAACTGTGG Rev: CATATCACACGGCGCTAACA	۶۰	۱۸۷
<i>P5CS</i>	AY888045	For: GGGCTACCCAAAAGCAGAT Rev: GAGTCCAAAACGAGCACCAT	۵۹	۲۳۸
<i>P5CR</i>	AY880317	For: TCTTGCTCTTGGTCTTGAG Rev: AGCTCTCGGCATCTTGTGT	۵۹	۲۰۴
<i>P5CDH</i>	DQ154920	For: CCAGAAGCCATCAAACCTCGT Rev: CATGTAGCCGCGAGGAAGTG	۶۰	۹۵

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن‌های مسیر تولید پرولین تحت تنش خشکی

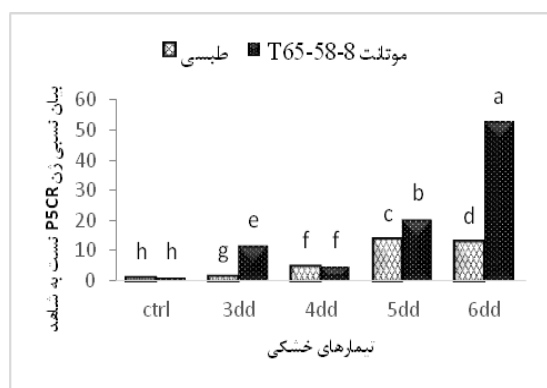
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		<i>P5CDH</i>	<i>P5CR</i>	<i>P5CS</i>
تنش خشکی	۴	۱۶۷/۵۸۷**	۶۵۶/۵۴۱**	۹۳۷/۱۱۸/۱۱۴**
ژنوتیپ	۱	۵۹/۹۹۹**	۶۳۰/۸۱۷**	۵۱۲۳۰۰/۳۳**
تنش خشکی × ژنوتیپ	۴	۱۰۱/۶۸۰**	۲۷۲/۲۰۹**	۴۰۳۸۴۷/۸۳۹**
خطا	۱۰	۰/۰۸۹	۰/۰۳۵	۰/۲۸۷

** معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱

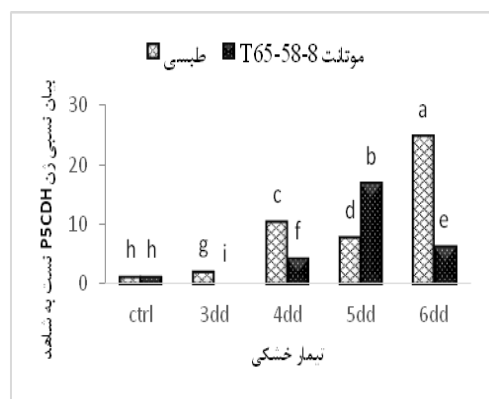
جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ برای بیان ژن‌های مسیر تولید پرولین تحت تنش خشکی با آزمون چند دامنه‌ای دانکن

تیمارها	<i>P5CDH</i>		<i>P5CR</i>		<i>P5CS</i>	
	میانگین لاین موتانت	میانگین رقم طوسی	میانگین لاین موتانت	میانگین رقم طوسی	میانگین لاین موتانت	میانگین رقم طوسی
شاهد	h ۱	h ۱	h ۱	h ۱	h ۱	h ۱
۳ روز تنش خشکی	i ۰/۳۲	g ۱/۹۳	e ۱۱/۷۹	g ۱/۶۹	g ۴/۶۱	e ۲۱/۶۵
۴ روز تنش خشکی	f ۴/۰۷	c ۱۰/۲۸	f ۴/۵۷	f ۴/۹۱	g ۴	f ۱۲/۴۸
۵ روز تنش خشکی	b ۱۶/۶۷	d ۷/۶۳	b ۲۰/۳۹	c ۱۳/۶۴	d ۷۳/۶۰	b ۷۷۹/۶۴
۶ روز تنش خشکی	e ۶/۱۶	a ۲۴/۷۰	a ۵۲/۵۸	d ۱۲/۹۳	c ۸۵/۳۳	a ۱۵۱۸/۴۰

حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.



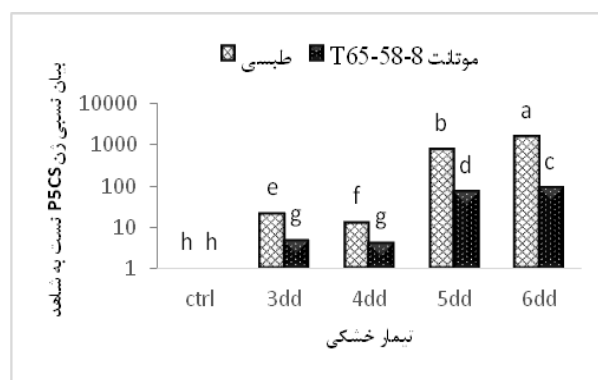
شکل ۴- بیان نسبی ژن P5CR در نمونه گیاه برگ بالغ تیمارهای تحت تنش خشکی در دو ژنوتیپ (DD: مخفف روز تنش خشکی، ctrl مخفف شاهد). حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.



شکل ۵- بیان نسبی ژن P5CDH در نمونه گیاه برگ بالغ تیمارهای تحت تنش خشکی در دو ژنوتیپ (DD: مخفف روز تنش خشکی، ctrl مخفف شاهد). حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

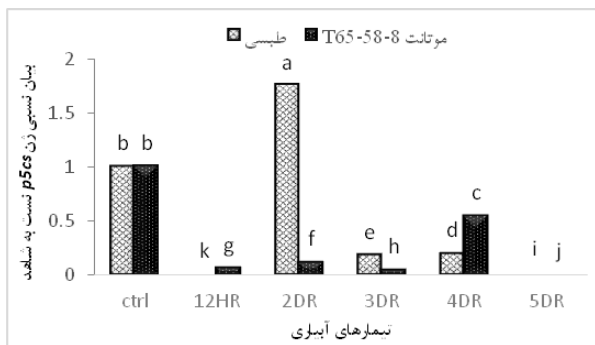
زمانی که گیاه با تنش مواجه می شود، رونوشت *P5CS* افزایش یافته و از بیان *P5CDH* جلوگیری می شود، این واکنش در زمان رفع تنش به صورت عکس انجام می گیرد. کاهش فعالیت *P5CDH* در گیاهان حساس به تنش خشکی و شوری که تحت تنش خشکی بوده اند و افزایش آن در آبیاری مجدد، توسط Yoshiba et al. (1997) مشاهده شده است. به عنوان یک نتیجه از بیوستز پرولین می توان چنین برداشت کرد که بیان ژن *P5CDH* به علت سرکوب تنش در گیاهان متحمل افزایش نمی یابد. Peng et al. (1996) طی مطالعات گسترده ای مشاهده کردند هنگامی که تنش اسمزی رفع می شود، سطح رونوشت *P5CS* شروع به کاهش می کند در حالی که رونوشت *PDH* (پرولین دهیدروژناز) به طور قابل ملاحظه ای بیان می شود و در عرض چند

پس از جذب آب توسط گیاه و رفع شرایط تنش، ساخت پرولین متوقف شده در نتیجه بیان سطح رونوشت *P5CR* در گیاه کاهش می یابد. در بررسی های صورت گرفته توسط سایر محققین در مورد سطوح پرولین در آراییدوپسیس تحت تنش کم آبی و آبیاری مجدد مشخص شد که سطح پرولین در طی دوره کم آبی افزایش و در طی آبیاری مجدد نسبت سطح رونوشت *P5CR* و *P5CS* کاهش یافته است (Yoshiba et al. 1997). نتایج بدست آمده نشان داد در تیمار ۱۲ ساعت پس از آبیاری بیان ژن *P5CDH* در هر دو ژنوتیپ افزایش داشته است. این در حالیست که لاین موتانت پس از سپری کردن شش روز تنش خشکی با جذب آب، آثار تنش را در خود کاهش داده و دیگر نیازی به رونوشت *P5CDH* در سلول نبوده، در نتیجه بیان ژن خود را کاهش داده است (شکل ۷). در حالی که در رقم طبیسی با افزایش روزهای آبیاری، بیان ژن *P5CDH* نسبت به لاین موتانت افزایش معنی دار نشان می دهد (جدول ۵). احتمال می رود رقم طبیسی به علت حساس بودن نسبت به تنش خشکی دیرتر این پاسخ را درک کند. افزایش پرولین در سلول به دلیل القای فعالیت آنزیم های دلتا-۱- پرولین ۵- کربوکسیلات سنتتاز (*P5CS*) و پرولین ۵- کربوکسیلات ردوکتاز (*P5CR*) در چرخه تولید این ماده و نیز ممانعت از فعالیت آنزیم های اکسید کننده پرولین مانند پرولین دهیدروژناز (*ProDH*) و پرولین ۵- کربوکسیلات دهیدروژناز (*P5CDH*) در سلول است.



شکل ۳- بیان نسبی ژن P5CS در نمونه گیاه برگ بالغ تیمارهای تحت تنش خشکی در دو ژنوتیپ (DD: مخفف روز تنش خشکی، ctrl مخفف شاهد). حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

است که نشان‌دهنده این است که گیاه قدرت بازگشت و نزدیک شدن به حالت قبل از تنش را داشته است (شکل ۸). Stewart et al. (1997) و Sarker et al. (1999) گزارش کردند که مقدار پایین پرولین در گیاهان آبیاری شده می‌تواند در نتیجه ترکیب اکسیژن با آن و تبدیل به گلوتامیک اسید و دیگر ترکیبات در شرایط بدون تنش حاصل شده باشد.



شکل ۶- بیان نسبی ژن‌های P5CS در نمونه گیاه برگ بالغ تیمارهای تحت آبیاری مجدد در دو ژنوتیپ (12: HR ۱۲: ساعت پس از آبیاری، DR: روز پس از آبیاری و ctrl: مخفف شاهد). حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

ساعت به سطح بالایی از بیان ژن می‌رسد. این اتفاق باعث کاهش سطح پرولین آزاد می‌شود که شاید ناشی از این واقعیت باشد که سنتز PDH زمان‌بر بوده و این روند ممکن است با فعالیت متابولیکی سلول همراه باشد. در گیاه آراییدوپسیس تحت تنش آبی به مدت ۱۰ ساعت، آبیاری مجدد انجام گرفت و سطح رونویسی PDH در حدود پنج ساعت کاهش یافت و به تدریج به سطح گیاهان شاهد رسید.

به‌طور کلی در مرحله آبیاری مجدد پس از اعمال تنش خشکی روند تغییرات در هر دو ژنوتیپ مطابق انتظار نزولی است، با این تفاوت که لاین موتانت کاهش بیشتری داشته است، چون در مرحله آبیاری دیگر گیاه نیازی به ساخت پرولین ندارد در نتیجه انتظار می‌رود بیان ژن P5CS که شروع کننده ساخت پرولین است، کمتر باشد. این کاهش بیان معنی‌دار در هر دو ژنوتیپ مشاهده می‌شود. افزایش بیان P5CS در رقم طیبسی حتی پس از ۴۸ ساعت جذب آب حاکی از آن است که گیاه همچنان تحت تنش است در نتیجه در رقم حساس (طیبسی) مرگ گیاه را به دنبال دارد. اما در لاین موتانت این کاهش تدریجی صورت گرفته

جدول ۴- تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن‌های مسیر تولید پرولین تحت آبیاری مجدد

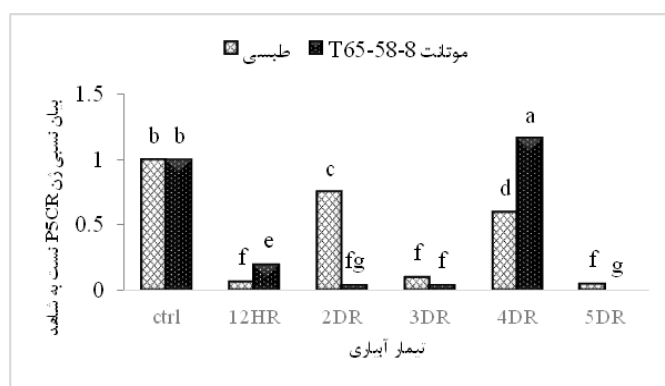
میانگین مربعات			درجه آزادی	منبع تغییر
P5CDH	P5CR	P5CS		
۰/۵۱۱**	۰/۷۲۲**	۰/۷۸۹**	۵	آبیاری مجدد
۰/۴۵**	۰/۰۰۲*	۰/۳۱۵**	۱	ژنوتیپ
۰/۰۰۵**	۰/۱۶۷**	۰/۴۷۰**	۵	آبیاری مجدد × ژنوتیپ
۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰۱	۱۲	خطا
--	--	--	۲۳	کل

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

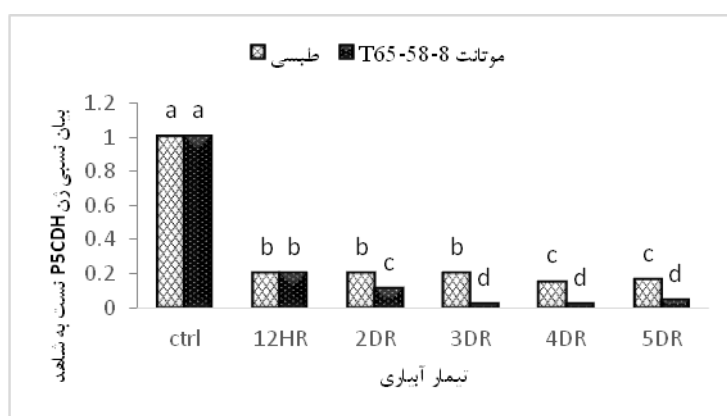
جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ برای بیان ژن‌های مسیر تولید پرولین تحت آبیاری مجدد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن

P5CDH		P5CR		P5CS		تیمارها
میانگین لاین موتانت	میانگین رقم طیبسی	میانگین لاین موتانت	میانگین رقم طیبسی	میانگین لاین موتانت	میانگین رقم طیبسی	
۱a	۱a	۱b	۱b	۱b	۱b	شاهد
۰/۲b	۰/۲b	۰/۱۹ve	۰/۰۶۸f	۰/۰۵۸g	۰/۰۰۴k	۱۲ ساعت پس از آبیاری
۰/۱۱c	۰/۲b	۰/۰۴۱fg	۰/۷۵c	۰/۱۱۳f	۱/۷۵a	۲ روز پس از آبیاری
۰/۰۲d	۰/۲b	۰/۰۴۲f	۰/۱۰۵f	۰/۰۳۹h	۰/۱۸e	۳ روز پس از آبیاری
۰/۰۲d	۰/۱۵c	۱/۱۵۹a	۰/۵۹۸d	۰/۵۴۴c	۰/۱۹۸d	۴ روز پس از آبیاری
۰/۰۴d	۰/۱۶c	۰/۰۰۶g	۰/۰۵f	۰/۰۰۶j	۰/۰۲۳i	۵ روز پس از آبیاری

حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.



شکل ۷- بیان نسبی ژن‌های *P5CR* در نمونه گیاه برگ بالغ تیمارهای تحت آبیاری مجدد در دو ژنوتیپ (12 HR: ۱۲ ساعت پس از آبیاری، DR: روز پس از آبیاری و ctrl مخفف شاهد). حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۸- بیان نسبی ژن‌های *P5CDH* در نمونه گیاه برگ بالغ تیمارهای تحت آبیاری مجدد در دو ژنوتیپ (12 HR: ۱۲ ساعت پس از آبیاری، DR: روز پس از آبیاری و ctrl مخفف شاهد). حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

یک درصد آماری نسبت به هم نشان می‌دهند، این در حالیست که تیمارهای سه و شش روز پس از تنش نسبت به هم تفاوت معنی‌داری ندارند.

در اندازه‌گیری پرولین در مرحله خشکی، هر دو ژنوتیپ نسبت به تیمار شاهد با افزایش روزهای تنش سعی بر انباشته کردن پرولین در بافت برگی خود و مقابله با تنش حاصله را داشته‌اند و این افزایش غلظت در هر دو ژنوتیپ مربوط به تیمار شش روز پس از تنش می‌باشد. همان‌طور که انتظار می‌رود افزایش غلظت پرولین در لاین موتانت بیشتر و سریع‌تر از والد آن می‌باشد. لاین موتانت در تیمار چهار روز پس از تنش به میزان چشمگیری نسبت به والد خود (طیبسی) پرولین را در بافت برگ انباشته کرده است و در پنج روز پس از تنش میزان آن کاهش یافته، این امر احتمالاً به این دلیل است که تجمع بیش از حد پرولین در تیمار چهار روز پس از تنش خشکی برای گیاه سمیتی ایجاد نکند، بنابراین از انباشته کردن این اسمولیت جلوگیری می‌شود. به همین

نتایج سنجش پرولین در جدول ۶ ارائه شده‌است. اثرات تیمار، رقم و اثر متقابل روی غلظت پرولین تحت تیمار خشکی معنی‌دار بودند. ضریب تغییرات (۱۳/۷۵) و ضریب تبیین (۹۷ درصد) برآورد شد. نتایج گروه‌بندی تیمارهای هر دو ژنوتیپ نسبت به هم با نتیجه حاصل از مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن تیمارها را در سه گروه مجزا قرار داد، که بیانگر افزایش معنی‌دار میزان پرولین طی روزهای تنش خشکی در لاین موتانت نسبت به رقم طیبسی می‌باشد. همان‌طور که در جدول ۷ ملاحظه می‌شود، تیمارهای دو، سه، چهار، پنج و شش روز پس از تنش هر دو ژنوتیپ دو به دو باهم مقایسه شد و تیمار ۶ روز پس از تنش خشکی بالاترین میانگین (۲۶/۵۶۳) را در هر دو ژنوتیپ به خود اختصاص داد. به دلیل معنی‌دار شدن اثر متقابل تیمار × رقم برش‌دهی اثر متقابل برای تیمارهای هر دو ژنوتیپ نیز انجام شد. طبق شکل (۹) و جدول (۵)، در تیمارهای دو، چهار و پنج روز پس از تنش خشکی هر دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری در سطح

در برخی از گیاهان در مراحل اولیه تنش کم آبی چندین اسید آمینه افزایش می‌یابد که با ادامه کم آبی فقط اسید آمینه پرولین بیشتر تجمع و ذخیره می‌شود. اگرچه پرولین در همه اندام‌های گیاه در طی تنش خشکی تجمع می‌یابد ولی سریع‌ترین انباشت را در برگ‌ها دارد (Heuer 1994). گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود همبستگی مثبت بین انباشت پرولین و سازش به شرایط تنش اسمزی در گیاهان وجود دارد (Shinozaki and Lazcano-Ferrat and Lovatt, 1997). با تحقیق روی گیاه سویا نیز سنتز پرولین در برگ‌ها و گرهک‌های این گیاه در اثر افزایش تنش را مشاهده نمودند. (Bajji et al. 2001) افزایش غلظت پرولین را در اثر کمبود آب در سه رقم گندم دوروم گزارش کردند. به نظر می‌رسد که تجمع پرولین آزاد یک پاسخ متداول به تنش در گیاهان عالی باشد. البته اسیدهای آمینه دیگری نیز تحت تنش‌های خشکی و شوری انباشته می‌شوند، اما درجه تغییرات آنها با تجمع پرولین که ظرف مدت کوتاهی پس از اعمال تنش به سطوح خیلی بالا می‌رسد قابل مقایسه نیست (Gzik 1996). تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشان داد، بعد از شروع تیمار خشکی سطوح *P5CS* افزایش پیدا کرد و این نسبت با تجمع سطوح رونوشت *P5CS* رابطه مستقیم دارد (Yoshiba et al. 1997).

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پرولین تحت آبیاری مجدد نشان داد تیمارهای آبیاری مجدد دارای اختلاف معنی‌داری با هم می‌باشند در حالی که اثر رقم و اثر متقابل تیمار×رقم معنی‌دار نبود. ضریب تغییرات (۲۵/۱۶) و ضریب تبیین (۹۳ درصد) برآورد شد. نتایج گروه‌بندی تیمارهای هر دو ژنوتیپ نسبت به هم با نتیجه حاصله از مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن تیمارها را در سه گروه مجزا قرار داد. تیمار ۱۲ ساعت پس از آبیاری با میانگین ۳۹/۳۱۶ در یک گروه مجزا و بقیه تیمارها در دو گروه قرار گرفتند (جدول ۸).

در این مرحله بالاترین غلظت پرولین در ۱۲ ساعت پس از آبیاری مشاهده می‌شود و با کم شدن شدت تنش و جذب آب توسط گیاه غلظت پرولین رو به کاهش است. بیش‌ترین تجمع پرولین مربوط به تیمار ۱۲ ساعت پس از آبیاری بود که دلیل آن تجمع بیش از حد پرولین بعد از شش روز تنش می‌باشد.

دلیل در تیمار پنج روز پس از تنش میزان پرولین نسبت به والد همان تیمار کمتر دیده می‌شود. در نهایت لاین موتانت در شش روز پس از تنش کمبود پرولین را احساس کرده و پرولین خود را نسبت به روز قبل افزایش داده است (شکل ۹). (Kao 1981) گزارش کرد که در برگ‌های بالغ تحت تنش خشکی تجزیه پروتئین‌ها باعث کاهش غلظت آن‌ها و در نتیجه افزایش اسیدهای آمینه آزاد از جمله پرولین می‌شود. معمولاً میزان پرولین آزاد در گیاهانی که در حد مطلوب آبیاری می‌شوند بسیار کم و در حدود ۰/۲-۰/۶ میلی‌گرم در گرم ماده خشک می‌باشد، اما مقدار این ماده پس از کاهش آب بافت‌ها تا ۴۰-۵۰ میلی‌گرم در هر گرم ماده خشک افزایش می‌یابد.

جدول ۶- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پرولین تحت تنش خشکی

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۴	۳۱۰/۲۸ ^{**}
رقم	۱	۲۰/۲۶ ^o
تیمار×رقم	۴	۱۴۲/۸۶ ^{**}
خطا	۱۰	۳/۹۸
کل	۱۹	--

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ آماری

جدول ۷- برش‌دهی اثر متقابل مرحله خشکی اندازه‌گیری پرولین برای تیمارهای هر دو ژنوتیپ

تیمارها	درجه آزادی	میانگین رقم طوسی	میانگین لاین موتانت
شاهد	۱	d ۹/۸۱	e ۴/۰۳
۳ روز تنش خشکی	۱	e ۵/۱۶	e ۴/۷۸
۴ روز تنش خشکی	۱	e ۴/۶۵	ab ۲۶/۷۸
۵ روز تنش خشکی	۱	b ۲۲/۳۶	c ۱۴/۳۹
۶ روز تنش خشکی	۱	a ۲۵/۵۳	a ۲۷/۵۹

حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

جدول ۸- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پرولین تحت آبیاری مجدد

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۵	۶۹۱/۲۴ ^{**}
رقم	۱	۱۰۴/۶۷ ^{NS}
تیمار×رقم	۵	۱۰۳/۰۷ ^{NS}
خطا	۱۰	۵۵/۵۲
کل	۲۳	--

NS و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱

P5CDH به‌نظر می‌رسد یک مکانیسم کلیدی در کنترل سطح پرولین در طول تنش و بعد از آن باشد.

صفت تحمل به خشکی صفتی پیچیده بوده که علاوه بر صفات مورفولوژیک گیاه، ژن‌ها و پروتئین‌های متعددی در آن نقش دارند که اغلب آن‌ها در چهار گروه پروتئین‌های عملکردی، ترکیبات فعال اسمزی، عوامل رونویسی و عوامل سیگنالی می‌باشند. به‌طور کلی می‌توان گفت که تنش ایجاد شده در محیط، پیامی را ایجاد می‌کند که این پیام توسط گیرنده‌هایی که عمدتاً در سلول‌های ریشه قرار دارند دریافت شده و به سلول‌های اندام هوایی فرستاده می‌شود. این پیام‌ها فاکتورهای رونویسی را فعال کرده که منجر به رونویسی از ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های عملکردی و ترکیبات اسمزی می‌شوند و نهایتاً با تولید این ترکیبات گیاه شرایط کم آبی را تحمل می‌کند. نتایج بدست آمده از بیان ژن‌های دخیل در مسیر ساخت پرولین با اندازه‌گیری آن مطابق دارد و نشان می‌دهد، در رقم طبری و لاین موتانت تحت تنش خشکی هر دو ژنوتیپ سعی بر افزایش بیان ژن‌های دخیل در ساخت پرولین و در نتیجه تجمع آن در برگ گیاه بالغ داشته‌اند اما در لاین موتانت این تجمع بیش‌تر صورت گرفته است. در واقع لاین موتانت نسبت به والد توانسته است تحت تنش در مرحله خشکی و آبیاری پاسخ بهتری را از خود نشان دهد. افزایش در سطح پرولین معمولاً کندتر از سرعت بیان ژن *P5CS* و *P5CR* بوده که شاید ناشی از این واقعیت باشد که سنتز پرولین زمان‌بر بوده و این روند ممکن است با فعالیت متابولیکی سلول همراه باشد که در طول تنش رو به افزایش و با برطرف شدن تنش به تدریج میزان آن کاهش می‌یابد.

منابع

Bajji M, Lutts S, Kinet JM (2001) Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Science* 160: 669-681.

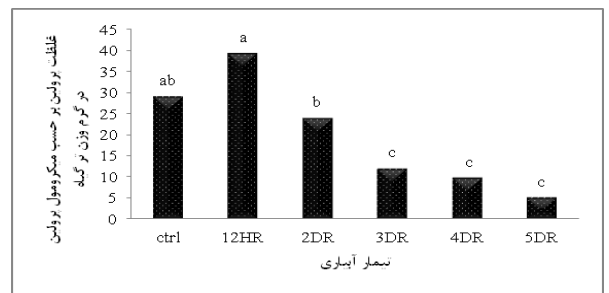
Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.

Ginzberg I, Stein H, Kapulnik Y, Szabados L, Strizhov N, Schell J, Koncz C, Zilberstein A (1998) Isolation and characterization of two different cDNAs of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Molecular Biology* 38: 755-764.

جدول ۹- نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر غلظت پرولین با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن

تیمار	میانگین
شاهد	۲۹/۰۶ ab
۱۲ ساعت پس از آبیاری	۳۹/۳۱۶ a
۲ روز پس از آبیاری	۲۳/۸۷۲ b
۳ روز پس از آبیاری	۱۱/۹۴۶ c
۴ روز پس از آبیاری	۹/۷۵۹ c
۵ روز پس از آبیاری	۵/۰۲۵ c

حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.



شکل ۱۰- میزان پرولین در برگ گیاه بالغ تحت تاثیر آبیاری مجدد در رقم طبری و لاین موتانت ۸-۵۸-۶۵.T. حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

به تدریج در روزهای بعد غلظت پرولین کاهش یافته، طوری که در پنج روز پس از آبیاری به پایین‌ترین میزان خود رسید (جدول ۹؛ شکل ۱۰). تجمع پرولین در شرایط تنش اسمزی و کاهش پرولین آزاد بعد از شرایط تنش به خوبی در گیاهان شناخته شده‌است، اما مکانیسم تنظیمی آن به‌طور کامل شناخته نشده‌است. نتایج حاصل از Peng et al. (1996)، نشان داد حذف پرولین آزاد پس از رفع تنش خشکی و شوری باعث بیان ژن *P5CDH* می‌شود. در حالی که فعالیت *P5CS* کاهش می‌یابد. تنظیم مکانیسم *P5CS* و

Gzik A (1996) Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 36: 29-38.

Heuer B (1994) Osmoregulatory role of proline in water- and salt-stressed plants. *Handbook of Plant and Crop Stress*. CRC Press, Boca Raton, United States, 363-381.

Kao CH (1981) Senescence of rice leaves VI. Comparative study of the metabolic changes of senescing turgid and water-stressed excised leaves. *Plant and Cell Physiology* 22: 683-688.

Kishor PK, Hong Z, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS (1995) Overexpression of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers

- osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108: 1387-1394.
- Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 8: 1323-1335.
- Lazcano-Ferrat I, Lovatt CJ (1999) Relationship between relative water content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit. *Crop Science* 39: 467-475.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Peng Z, Lu Q, Verma DPS (1996) Reciprocal regulation of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular and General Genetics* 253: 334-341.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: e36-e36.
- Rayapati PJ, Stewart CR (1991) Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiology* 95: 787-791.
- Rebetzke GJ, Richards RA, Condon AG, Farquhar, GD (2006) Inheritance of carbon isotope discrimination in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 150:97-106.
- Rhodes D, Hanson AD (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 44: 357-384.
- Sarker AM, Rahman MS, Paul NK (1999) Effect of soil moisture on relative leaf water content, chlorophyll, proline and sugar accumulation in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* 183: 225-229.
- Savouré A, Jaoua S, Hua XJ, Ardiles W, Van Montagu M, Verbruggen N (1995) Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 372: 13-19.
- Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* 115: 327.
- Siddique MRB, Hamid A, Islam MS (2000) Drought stress effects on water relations of wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41:35-39.
- Stewart CR, Boggess SF, Aspinall D, Paleg LG (1977) Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiology* 59: 930-932.
- Szoke A, Miao GH, Hong Z, Verma DPS (1992) Subcellular location of δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiology* 99: 1642-1649.
- Tavakoli M, Poustini K, Alizadeh H (2016) Proline accumulation and related genes in wheat leaves under salinity stress. *Journal of Agricultural Science and Technology* 18: 707-716.
- Türkan I, Bor M, Özdemir F, Koca H (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168: 223-231.
- Verbruggen N, Villarroel R, Van Montagu M (1993) Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 103:771-781.
- Yoshiba Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology* 38: 1095-1102.

