بررسی فعالیت آنزیم NADP-Malic در گندم دوروم در شرایط تنش شوری

دکتر هومن راضی و پروانه امامی

رشته اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

طبق آمار انتشار یافته توسط فائو در سال ۲۰۰۸ بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از اراضی جهان تحت تاثیر شوری‌اند. چنین سطح وسیعی از شوری در جهان باعث کاهش قابل توجه در تولیدات کشاورزی شده است. افزایش شوری در محیط ریشه باعث کاهش جذب آب و کاهش پتانسیل آب سلول می‌گردد که در نتیجه از رشد گیاه جلوگیری می کند. از دیگر واکنش‌های گیاه در مقابل شوری، افزایش غلظت سدیم و کاهش غلظت پتاسیم در بافت گیاه است.

گندم دوروم با نام علمی *Triticum durum* و یا *Triticum turgidum var. durum* به عنوان یکی از مهم ترین غلات جهان ماده‌ی اولیه صنایع ماکارونی‌سازی است. گندم دوروم از لحاظ شوری نسبت به گندم‌نان حساس‌تر است که تولید و کشت آن را در مناطقی با خاک‌های شور و سدیمی محدود کرده‌است. تاکنون تلاش‌هایی برای بهبود تحمل شوری در گندم دوروم صورت گرفته است. بدین منظور محققان علوم زراعی، طیف وسیعی از ژرم‌پلاسم‌های گندم نان و دوروم را مورد غربالگری قرار داده‌اند. بنابراین شناسایی معیارهای مناسب گزینش برای بهبود تحمل شوری در گندم تتراپلوئید ضروری به‌نظر می‌رسد.

برای مقابله با شوری شناخت مکانیسم‌های مولکولی و بیوشیمیایی تحمل شوری برای اصلاح گیاهان زراعی حائز اهمیت است. بررسی تغییرات یونی در رابطه با تحمل شوری ضروری است. طبق مطالعات صورت گرفته تحمل شوری در گندم نان و گندم دوروم همراه با کاهش نرخ انتقال Na^+ به شاخساره و افزایش نسبت K^+/Na^+ است که اهمیت بررسی چنین شاخص‌هایی را در بهنژادی تحمل شوری در این گیاهان نشان می‌دهد. همچنین با افزایش شوری، بسیاری از گیاهان متحمل مقادیر بیشتری پتاسیم در سلول‌های خود انباشته می‌کنند.

گیاهان در مقابله با شوری علاوه بر تنظیمات یونی، محلول‌های آلی را همچون پرولین برای کنترل پتانسیل اسمزی به کار می‌گیرند. اسیدآمینه‌ی پرولین موثر در تنظیم سطح احیای سلولی و کاهش دهنده‌ی pH سلولی بوده و جمع‌آوری کننده رادیکال‌های آزاد در سلول است.

تاثیر آنزیم‌های موثر بر فتوسنتز تنها از جنبه تولید موثر نبوده بلکه گاهی به عنوان فاکتورهـای دفـاعی در مقابله با تنش عمل می‌کنند. آنزیم NADP-Malic (NADP-ME) یکی از آنزیم‌هـای فعـال فتوسـنتزی است که شواهدی دال بر نقش حمایتی این آنزیم در تحمل تنش شوری و دیگر تـنش‌هـای محیطـی زنـده و غیرزنده وجود دارد. بررسی بیان و همسانه‌سازی ژن NADP-ME در گنـدم هگزاپلوئیـد نیـز نشـان‌دهنـده تاثیرپذیری این ژن از تغییرات محیطی می‌باشد. بنابراین می توان آنزیم NADP-Malic را به عنوان معیـار جدیدی از تحمل شوری در برخی از گیاهان مورد ارزیابی قرار داد.

هدف

این پژوهش به منظور دستیابی به اهداف ذیل انجام شد.

۱- بررسی واکنش ژنوتیپ های مختلف گندم دوروم به سطوح مختلف شوری
۲- ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم NADP-Malic در پاسخ به تنش شوری
۳- بررسی برخی معیارهای یونی مرتبط با تحمل شوری
۴- جداسازی و بررسی ویژگی‌های مولکولی ژن رمزکننده آنزیم NADP-Malic در گندم دوروم

مواد و روش ها

اجرای آزمایش گلخانه‌ای و نحوه اعمال تنش شوری

آزمایش درگلخانه بخش زراعت و اصلاح‌نباتات دانشگاه شیراز به‌منظور ارزیابی واکنش آنزیم NADP-Malic و تغییرات سدیم، پتاسیم و اسیدآمینه‌ی پرولین چندین ژنوتیپ گندم دوروم در پاسخ به تنش شوری اجرا شد. هفده ژنوتیپ مورد آزمایش شامل پنج رقم تجاری یاواروس، سیمره، تارو۳، کرخه، آریا و یازده لاین گندم دوروم (ADYTW1/14, ADYTW1/10, ADYTW1/7 ,ADYTW1/5,ADYTW1/4 ,ADYTW1/15, ADYTW1/19, ADYTW1/18, ADYTW1/16, ADYTW1/17 و D-81-18) و یک رقم گندم‌نان (چمران) بودند. در ادامه جداسازی و بررسی خصوصیات مولکولی قطعه‌ای از ژن رمز کننده‌ی *NADP-ME* در رقم تجاری یاواروس انجام شد.

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با سه تکرار شامل هفده ژنوتیپ و در سه سطح شوری صفر، ۱۷۰۰ و ۳۴۰۰ میلی‌گرم NaCl به ازای هر کیلوگرم خاک اجرا شد. هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک پس از اعمال تنش برای سطوح شوری به ترتیب ۲/۲، ۷/۵۳ و ۱۳/۲۵ دسی زیمنس‌برمتر به‌دست آمد. پس از تنک کردن در مرحله دو برگی، تنها پنج بوته در هر گلدان نگه داشته شد. برای اعمال تنش شوری، ۵۰ روز پس از کاشت (در مرحله ساقه روی) تنش شوری در مقادیر ذکرشده اعمال شدند.

در هر گلدان اندازه گیری میزان سدیم و پتاسیم، درصد تغییرات یونی، مجموع تجمع یونی و همچنین شاخص انتخابگری K^+/Na^+ در گیاه انجام شد. همچنین میزان اسید آمینه پرولین، پروتئین کل و فعالیت آنزیم NADP-Malic در گیاه سنجش شدند. اجزای عملکرد و برخی از صفات مرفولوژیک گیاه نیز در هر گلدان اندازه‌گیری شدند. صفات اندازه‌گیری شده شامل ارتفاع بوته(برحسب سانتی‌متر)، طول سنبله(بر حسب سانتی‌متر)، تعداد سنبلچه در سنبله، تعداد دانه در سنبله، وزن هزار دانه(برحسب گرم) و عملکرد دانه در تک بوته(بر حسب گرم) بودند. شاخص‌های کمی عملکرد شامل تحمل تنش، میانگین عملکرد، میانگین هندسی عملکرد، شاخص تحمل تنش و شاخص حساسیت به تنش محاسبه شدند.

تجزیه های آماری شامل تجزیه واریانس، مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه‌ی دانکن و محاسبه ضرایب همبستگی انجام شد. در نتایج آزمایش، به‌جای نام کامل لاین‌های در حال اصلاح (ADYTW1/) به اختصار از AD استفاده شد.

جداسازی، همسانه سازی و توالی یابی ژن رمزکننده NADP-ME در گندم دوروم

برای جداسازی قطعه‌ای از ژن NADP-ME در گندم دوروم، از رقم تجاری یاواروس استفاده شد. ابتدا با استفاده از توالی ژن NADP-ME در گندم نان (*Triticum aestivum* L.) به شماره‌ی دسترسی [GeneID: 100137005 (EU082065)] که رمزکننده‌ی فرم سیتوپلاسمی آنزیم NADP-Malic است، آغازگرهای مناسب با فاصله ۷۱۷bp طراحی شدند. استخراج RNA و سنتز cDNA انجام و طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن مورد نظر تکثیر و سپس همسانه سازی و توالی یابی گردید. با استفاده از سرویس بلاست در بانک اطلاعاتی NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) توالی های مشابه موجود در بانک ژن شناسایی شدند تا از روند صحیح جداسازی ژن NADP-ME اطمینان حاصل شود.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین ژنوتیپ‌ها و سطوح شوری از لحاظ عملکرد دانه در تک بوته و اجزای عملکرد همچون وزن صد دانه و تعداد دانه در سنبله وجود دارد. با افزایش شوری خاک به ۱۳/۲۵ دسی زیمنس‌برمتر ، کاهش معنی‌داری برای عملکرد دانه و اجزای عملکرد مشاهده شد. کم-ترین عملکرد تک بوته متعلق به AD19 بود و بیشترین مقدار عملکرد در AD18 و تارو۳ مشاهده شد. رقم آریا با عملکرد بالا در شرایط بدون تنش، با بروز تنش کاهش معنی‌داری در عملکرد نشان‌داد که ناشی از حساسیت ژنوتیپ مذکور به شوری است. در مقابل رقم کرخه با وجود عملکرد پایین نسبت به آریا با افزایش شوری ثبات عملکرد قابل قبولی نشان داد. بنابراین به‌عنوان والد در برنامه های به نژادی بهبود تحمل شوری کاندید مناسبی است.

نتایج آماری نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ شاخص تحمل به تنش(STI)، متوسط عملکرد(MP) و بهره‌وری هندسی(GMP) اختلافات معنی‌داری داشتند. با استفاده از نتایج حاصل و مقایسات میانگین مشخص شد که کمترین شاخص بهره‌وری هندسی (حساس ترین) مربوط به ژنوتیپ‌های AD14 و چمران و بیشترین مقدار آن (متحمل ترین) متعلق به دو ژنوتیپ AD18 و یاواروس بود. بر اساس میانگین بهره‌وری(MP) و شاخص تحمل تنش(STI) ژنوتیپ AD18 متحمل ترین و ژنوتیپ AD14 حساس ترین به شوری بود.

با بررسی نتایج تجزیه واریانس بین سطوح مختلف شوری، ژنوتیپ ها و برهمکنش دو فاکتور مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری برای محتوای پرولین مشاهده‌شد. با افزایش شوری پرولین بیشتری دربرگ گیاه انباشته شد. به‌طور میانگین، رقم یاواروس بیشترین و ژنوتیپ AD4 کم‌ترین محتوای پرولین را داشتند. ژنوتیپ AD14 بیشترین مقدار و ژنوتیپ AD10،کمترین مقدار پرولین را در هدایت الکتریکی ۱۳/۲۵dS/m داشتند. اختلاف معنی‌داری میان ژنوتیپ‌ها از لحاظ درصد تغییرات پرولین بین دو سطح بدون تنش و شوری با هدایت الکتریکی ۱۳/۲۵ dS/m مشاهده نشد. به نظر می‌رسد افزایش پرولین به عنوان یک واکنش عمومی چه در ارقام حساس و چه در ارقام متحمل روی می‌دهد. ژنوتیپهای AD10 و AD5 به ترتیب کمترین و بیشترین درصد تغییرات پرولین را نشان دادند.

اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ ها، سطوح شوری و برهمکنش آن‌ها از نظر مقادیر سدیم، پتاسیم و نسبت انتخابگری K^+/Na^+ مشاهده‌شد. نتایج نشان داد که با افزایش شوری به صورت معنی‌داری سدیم بیشتری در

شاخساره تجمع یافت و درمقابل پتاسیم کاهش معنی‌داری نشان داد که بیانگر مقابله سدیم با پتاسیم در ورود به گیاه در شرایط تنش است. کمترین مقدار تجمع سدیم در شرایط بدون تنش در AD5 مشاهده شد درحالی که تارو۳، سدیم بیشتری در بافت خود نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها داشت. در شوری با هدایت الکتریکی ۱۳/۲۵ dS/m کم‌ترین مقدار تجمع سدیم در ژنوتیپ AD7 بود درحالی که بیشترین تجمع سدیم در ژنوتیپ AD16 رخ داد. کمترین مقدار پتاسیم در شوری با هدایت الکتریکی ۱۳/۲۵ dS/m در رقم یاواروس و بیشترین آن در AD5 دیده شد. در تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی کاهش نسبت انتخابگری K^+/Na^+ در شرایط تنش شوری مشاهده شد در عین حال رابطه معنی داری بین تحمل شوری و نسبت انتخابگری K^+/Na^+ پیدا نشد. در شرایط شوری ۱۳/۲۵ dS/m، ژنوتیپAD7 و رقم آریا به ترتیب بیشترین و کم‌ترین نسبت K^+/Na^+ داشتند. در تجزیه واریانس، بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ درصد تغییرات سدیم، پتاسیم و نسبت انتخابگری K^+/Na^+ بین شرایط نرمال و تنش اختلافات معنی‌داری مشاهده شد. بیشترین درصد تغییرات سدیم در حدود ۱۸۸ تا ۱۹۷ درصد افزایش در ژنوتیپ‌های حساس آریا، چمران و AD14 مشاهده شد.

طبق نتایج تجزیه واریانس، بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ درصد تغییرات و مقدار فعالیت آنزیم NADP-Malic اختلافات معنی‌داری مشاهده شد که نشان دهنده‌ی تنوع ژنتیکی موجود در فعالیت این آنزیم است. برهمکنش ژنوتیپ و شوری نیز در فعالیت NADP-ME اختلاف معنی‌داری داشت که نشان-دهنده‌ی تاثیر تشدیدکننده‌ی شوری در ایجاد اختلاف بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش است. مقایسه میانگین سطوح تنش اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم NADP-Malic نشان نداد. بنابراین نمی توان برمبنای فعالیت این آنزیم ژنوتیپهای متحمل به شوری را انتخاب نمود. با مقایسه تغییرات NADP-ME در شرایط بدون تنش مشخص شد که فعالیت این آنزیم بسته به ژنوتیپ متفاوت است. در مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها، تغییرات منفی (کاهش نسبت به شرایط بدون تنش) و مثبت (افزایش نسبت به سطح بدون تنش) مشاهده شد. بیشترین درصد افزایش در رقم چمران (گندم نان) و بیشترین درصد کاهش در ژنوتیپ AD10 مشاهده شد. در بررسی درصد تغییرات فعالیت آنزیم NADP-Malic، همبستگی مثبت معنی داری میان عملکرد در شرایط بدون تنش و فعالیت آنزیم مذکور در تنش ۱۳/۲۵ dS/m مشاهده شد. شاید بتوان گفت که مقادیر آنزیم مذکور در شرایط تنش می توانند معرف پتانسیل عملکرد دانه ژنوتیپ های گندم دوروم باشند.

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و با انجام واکنش PCR قطعه ای از ژن رمزکننده NADP-ME در گندم دوروم تکثیر شد. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که قطعه جداسازی شده، یک قطعه به طول

تقریبی ۷۰۰ جفت باز بود. پس از انجام مراحل همسانه‌سازی و توالی یابی ۷۱۷bp از توالی ژن *NADP-ME* در گندم دوروم از رقم یاواروس به شرح زیر به‌دست آمد. توالی جداسازی شده از رقم یاواروس با توالی ژن NADP-dependent malic enzyme در گندم‌نان به شماره EU082065.1 صد در صد مشابه بود. نتیجه حاصل حفظ شدگی کامل ژن مذکور طی تکامل گندم تتراپلوئید و هگزاپلوئید را نشان داد.

>*Triticum durum* L. var. Yavarus NADP- Malic enzyme_ partial sequence

```
GGTATGGGTATTCCGGTTGGCAAACTGTCTCTGTACACCGCCCTCGGAGGAGTTCGCCCATCAGCTTGCCTGCCAA
TTACGATCGATGTTGGCACCAACAACGAGACATTGCTCAACGACGAGTACTACATCGGGCTCCGTCAACGGCGTGC
TACCGGCGAGGAATACCATGAGCTTCTTCAAGAGTTCATGAATGCAGTCAAGCAAAACTACGGCGAGAAAGTCCTG
GTCCAGTTTGAGGACTTTGCCAACCACAATGCATTCGATTTGCTCGCAAAGTACAGCAAGAGCCATCTCGTCTTCA
ACGATGATATTCAGGGCACAGCATCAGTGGTCCTCGCAGGCCTCTTGGCGGCCCTGAGGATGATCGGTGGAGGCCT
TGTGGATCAGACTTACCTCTTCCTTGGTGCTGGAGAGGCTGGAACTGGCATTGCAGAACTCATTGCTCTTGAGATG
TCGAAACACACTGAACTCCCGGTGGACGACTGCCGCAAGAAGATCTGGCTGGTGGACTCCAAGGGTCTGCTTGTCG
AGTCCAGGAAAGAGTCTCTGCAGCACTTCAAGAAGCCGTTCGCTCATGAGCATGAAGAACTGAAGACCCTGCTGGA
GGCCGTCCAGTCCATCAAGCCGACCGTGCTGATTGGAACCTCCGGCGTCGGGAAGACCTTCACCCAGGAAGTGATC
                                                GAGGCCATGGCCTCCTTCAACGAGAAACCCGTC
```