



دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی
سال یازدهم، شماره سی و نهم، ۱۳۹۸

اثرات اکوفیزیولوژیک و مورفولوژیک تنوع در بروز ژنهای PEAMT1 و PEAMT2 در ژنوتیپهای مقاوم و حساس به خشکی گندم نان

مهدی روزرخ^۱

دریافت: ۹۶/۳/۱۳ پذیرش: ۹۶/۶/۲۵

چکیده

به منظور بررسی واکنش ژنوتیپهای گندم نان به اثرات ناشی از خشکی و بروز ژن، دو آزمایش جداگانه به صورت آزمایشگاهی و گلخانه ای بصورت فاکتوریل و به ترتیب در قالب طرحهای کاملاً تصادفی و بلوکهای کامل تصادفی در سه تکرار، در آزمایشگاه و گلخانه در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه در سال ۱۳۹۴ انجام شد. عوامل این طرحها، در آزمایشگاه، بیست ژنوتیپ گندم (ده ژنوتیپ مقاوم و ده ژنوتیپ حساس به خشکی) و شش سطح پتانسیل اسمزی و در گلخانه، ۶ ژنوتیپ منتخب (سه ژنوتیپ حساس و سه ژنوتیپ مقاوم به خشکی) و شش سطح پتانسیل اسمزی بودند. آزمایشهای مربوط به فناوریهای زیست شناسی مولکولی نیز در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، انجام شد. نتایج نشان داد، ژنوتیپهای مقاوم به خشکی پیشتاز، آذر ۲ و پارس، از نظر درصد، مدت و سرعت جوانه زنی، برتری قابل توجه و ۴۰ درصدی نسبت به ژنوتیپهای حساس به خشکی پیشگام، اوحدی و رصد داشتند. وزن خشک ریشه چه نیز در ژنوتیپ پارس با ۷۸/۹۹ میلیگرم، بیشترین مقدار و بیش از سه برابر کمترین وزن خشک ریشه چه در ژنوتیپ رصد با ۲۴/۰۸ میلیگرم بود. در گلخانه، حد بالا و پایین مقادیر صفات درصد، مدت و سرعت سبز شدن و وزن بوته ها به ترتیب به ژنوتیپ مقاوم به خشکی پارس و ژنوتیپ حساس به خشکی پیشگام تعلق داشت. افزایش تنش اسمزی در ژنوتیپ پارس موجب افزایش بروز ژن TaPMT₁ شد، که به وضوح نشان دهنده درگیر بودن این ژن، حداقل در سطح بیان ژن در واکنش به تنش اسمزی است که با توجه به عدم تغییر معنی دار بروز آن در رقم حساس پیشگام می توان این ژن را به عنوان یک کاندید اصلی برای بررسی های بیشتر در سطح بیولوژی مولکولی مطرح کرد.

واژه های کلیدی: پارس، پیشگام تنش اسمزی، جوانه زنی، فناوریهای مولکولی

روزرخ، م. ۱۳۹۸. اثرات اکوفیزیولوژیک و مورفولوژیک تنوع در بروز ژنهای PEAMT1 و PEAMT2 در ژنوتیپهای مقاوم و حساس به خشکی گندم نان. مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ۳۹: ۱۶۷-۱۵۳.

مقدمه

گندم از قدیمی ترین و پر مصرف ترین گیاهان زراعی جهان می باشد که بوسیله انسان زراعت شده است، بطوریکه می توان گفت از سالیان بسیار دور و قبل از آنکه بشر به موارد مصرف سایر گیاهان از نظر تغذیه پی ببرد، مهمترین منبع تغذیه برای آنان بود. به همین دلیل مهمترین گیاه زراعی بشمار می آید زیرا زراعت آن از تمام گیاهان ساده تر و تطابق آن در مناطق مختلف که دارای شرایط آب و هوایی متفاوتی باشند، بیشتر است. از طرف دیگر غذای اصلی اغلب مردم جهان را تشکیل می دهد. گندم از نظر تولید و سطح زیر کشت مهمترین محصول کشاورزی ایران و استان کرمانشاه است و افزایش محصول آن روز به روز مورد توجه قرار گرفته است. گیاهانی مثل گندم، معمولاً شرایط نامطلوبی مانند خشکی، شوری، یخ زدگی، گرما و نور شدید را تجربه می کنند. به همه این شرایط نامطلوب اصطلاحاً تنش های غیر زنده می گویند (چن و موراتا، ۲۰۰۲). تنش های غیرزنده مثل خشکی، موجب واکنش های متفاوتی از جمله در مراحل جوانه زنی و سبز شدن گیاه می شوند. چنانچه تعدادی از محققان به امکان انتخاب ارقام متحمل به خشکی گندم نان در شرایط آزمایشگاهی و در غلظتهای مختلف مانیتول اشاره کردند (عبدالغنی و همکاران، ۲۰۰۴). در مطالعه ی تأثیر تنش اسمزی ناشی از مانیتول روی ویژگیهای جوانه زنی گندم، مشاهده شد که فشار تورژسانس، اندازه سلولها و طول ریشه در شرایط تنش کاهش معنی داری از خود نشان دادند (پریچارد و همکاران، ۱۹۹۱). المنصوری و همکاران (۲۰۰۱) و همکاران در مطالعات خود روی تأثیر پلی اتیلن گلیکول و نمک طعام و مانیتول بر جوانه زنی بذرها ی سه رقم گندم دوروم، نشان دادند که اثرات منفی آنها عمدتاً "به دلیل کاهش در جذب آب ناشی از تنش اسمزی بود که منجر به کاهش درصد جوانه زنی شد. در مقایسه تأثیر سه محیط پلی اتیلن گلیکول، مانیتول و ساکارز روی جوانه زنی بذر گندم، مشاهده شد که با افزایش تنش اسمزی، درصد جوانه زنی و طول گیاهچه بواسطه کاهش در جذب آب و رطوبت نسبی، افت معنی داری پیدا کرد (روی- لیان و ژیانو- پینگ، ۲۰۰۳). بذرها ی جو نیز در شرایط کاهش دسترسی به آب، افت معنی داری از نظر جوانه زنی نشان دادند (هاستدل و روستلینا، ۲۰۰۲). مطالعه تأثیر تنش اسمزی ناشی از پلی اتیلن گلیکول روی ویژگیهای جوانه زنی ۱۶ رقم گندم، نشان داد که در عین تفاوت های ژنتیکی در پاسخ ارقام گندم به تنش خشکی، مقادیر درصد جوانه زنی، سرعت

جوانه زنی، طول ریشه چه و ساقه چه و وزن خشک و تر ریشه چه و ساقه چه کاهش معنی داری داشت (رئوف و همکاران، ۲۰۰۷). تنش اسمزی ناشی از پلی اتیلن گلیکول روی ۱۲ ژنوتیپ گندم نشان داد که افزایش سطح تنش اسمزی و کمبود آب ناشی از آن بر صفات جوانه زنی گندم مثل درصد جوانه زنی، مدت و سرعت جوانه زنی، طول ریشه چه و ساقه چه تاثیر منفی می گذارد (جهانبین و ضعیف زاده، ۲۰۱۲). در بررسی و مقایسه تأثیر دو محیط ناشی از پلی اتیلن گلیکول و نمک طعام روی ویژگیهای جوانه زنی و سبز شدن دو رقم گندم دوروم مشاهده شد که مقادیر درصد جوانه زنی و سبز شدن، سرعت جوانه زنی و سبز شدن و وزن تر و خشک گیاهچه در دو محیط کاهش نشان داد (سیار و همکاران، ۲۰۱۰). در بررسی ویژگیهای جوانه زنی و سبز شدن دو رقم گندم دوروم در شرایط تنش ناشی از پلی اتیلن گلیکول و نمک طعام، مشاهده شد که درصد جوانه زنی و سبز شدن و وزن تر و خشک گیاهچه ها تحت تأثیر تنش قرار گرفتند (سیار و همکاران، ۲۰۰۸). به این موضوع در مورد بذر فلفل نیز اشاره شده است (دمیر و ماوی، ۲۰۰۸). در آزمایشی با استفاده از کشت بافت در غلظتهای مختلف مانیتول و تنش اسمزی ناشی از آن، به امکان انتخاب ارقام مقاوم به خشکی گندم نان اشاره شد (عبدالغنی و همکاران، ۲۰۰۴). در مطالعه ای روی تعدادی رقم و ژنوتیپ جو، نشان داده شد که بین ژنوتیپها از نظر تنظیم اسمزی تفاوت وجود دارد که منجر به تفاوت در ظرفیت نسبی آب و پتانسیل آب ژنوتیپها شد. همبستگی مثبت و معنی داری نیز بین عملکرد و تنظیم اسمزی مشاهده شد (گونزالز و همکاران، ۲۰۰۸). بررسی پاسخ پنج رقم گندم به سطوح مختلف تنش اسمزی، نشان دهنده آن بود که ارقام متحمل تر به خشکی، مقادیر بالاتری از سرعت جوانه زنی، طول کلونوپتیل، پرولین و فندهای محلول در مقایسه با ارقام حساس تر داشتند (قیوم و همکاران، ۲۰۱۱). گروهی از محققین در مطالعات خود روی تعدادی از ژنوتیپهای نیمه پاکوتاه گندم، به این موضوع اشاره کردند که در شرایط تنش اسمزی ناشی از پلی اتیلن گلیکول، طول ریشه و نسبت ریشه به ساقه افزایش می یابد که می تواند ناشی از بعضی ژنهای مسئول بروز ژن پاکوتاهی مثل *Rht8* باشد (لندجوا و همکاران، ۲۰۱۲).

اگرچه تأثیر تنش های غیرزنده در زمینه رشد و نمو، عملکرد و مورفولوژی اندامها به خوبی مطالعه شده است، ولی دانسته های ما از تغییر در سطح مولکولی و بیوشیمیایی ناچیز است (ردی و همکاران، ۲۰۰۴). شناخت تغییرات ایجاد شده در سطوح مولکولی و

مقطر به عنوان شاهد با پتانسیل اسمزی صفر (۰) بار استفاده شد. $\Psi = -MIRT$

که در آن: Ψ : پتانسیل اسمزی محلول بر حسب بار M؛ مولاریته مانتول بر حسب گرم در لیتر آب مقطر I؛ درجه یونیزاسیون نمک (که برای مانتول یک است) R؛ عدد ثابت گازها، معادل $T/1000$ ؛ درجه حرارت بر حسب کلون پس از اختصاص ۲۵ بذر از هر ژنوتیپ به پتری دیشها، به هر کدام از آنها محلول مانتول با پتانسیل اسمزی مشخص و با مقادیر مساوی اضافه شد. بدین ترتیب تعداد ۳۶۰ پتری دیش طرح آزمایشی به داخل ژرمیناتور که در دمای ۱۰ درجه سلسیوس و رطوبت اشباع تنظیم شده بود منتقل گردیدند.

برای انجام آزمون جوانه زنی، با در نظر گرفتن خروج ریشه چه به اندازه ۲ میلی‌متر، شمارش بذرهای جوانه زده به طور مرتب و روزانه انجام گردید و تا روز پانزدهم ادامه یافت. در پایان آزمایش درصد جوانه زنی هر تیمار و تکرار محاسبه و یادداشت گردید. میانگین مدت و سرعت جوانه زنی نیز با استفاده از فرمولهای زیر محاسبه گردید (الیس و رابرتز، ۱۹۸۱):

$$R = \sum n / \sum (D.n)$$

که در آن، n، تعداد بذرهای جوانه زده در روز D و D تعداد روزهای سپری شده از شروع آزمایش می باشد. R و D به ترتیب میانگین سرعت جوانه زنی و میانگین مدت جوانه زنی می باشند. در پایان آزمون جوانه زنی، طول و وزن خشک ریشه چه و ساقه چه اندازه گیری شد. شاخص بنیه بذر نیز بر اساس فرمول زیر به دست آمد (آگراوال، ۲۰۰۳):

(مجموع طول ریشه چه و ساقه چه) × درصد جوانه زنی = شاخص بنیه بذر

ایجاد شرایط برای انجام آزمونهای فوق بر اساس قوانین انجمن بین المللی آزمون بذر^۲ صورت پذیرفت (بی نام، ۲۰۰۷).

بیوشیمیایی بواسطه در معرض قرار گرفتن گیاه در برابر تنش‌های غیرزنده برای افزایش تولید در زمین‌های کشاورزی، عموماً و برای تولید گیاهان دستکاری شده ژنتیکی بصورت اختصاصی بسیار حائز اهمیت است (چن و موراتا، ۲۰۰۸). شواهد بسیاری وجود دارد که فسفولیپیدها، به دلایل شرکت گسترده در غشای سلولی، نقش در انتقال پیام^۱ و اثرات متقابل با مسیرهای متابولیکی برخی هورمون‌ها در چگونگی واکنش به تنش‌های غیرزنده نقش دارند. یکی از آنزیم‌های مؤثر در مسیر متابولیکی تولید فسفولیپید "فسفوکالین"، آنزیم PEAMT می‌باشد (داتکو و مود، ۱۹۸۸). آگاهی از واکنش ژنها (بروز ژنها) در مقابل تنش، نخستین گام برای دستکاری ژنتیکی^۲ آن ژنها برای تولید لاین‌های تراریخته برای کشت در شرایط تنش می باشد. علیرغم پژوهش‌های نسبتاً گسترده درباره مسیر متابولیکی تولید فسفاتیدل کلاین، تا کنون پژوهش‌های محدودی درباره ژنهای کنترل کننده آنزیم PEAMT انجام شده است. به همین منظور پژوهشی با استفاده از ۲۰ ژنوتیپ گندم حساس و مقاوم به خشکی با هدف بررسی‌های فیزیولوژیکی قدرت بذر، در آزمایشهای جوانه زنی و سبز شدن ژنوتیپهای مقاوم و حساس به خشکی و مقایسه بروز دو ایزوفرم ژن کد کننده PEAMT یعنی TaPMT1 و TaPMT2 در ژنوتیپهای منتخب مقاوم و حساس به خشکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمایشگاه

به منظور بررسی واکنش ژنوتیپهای گندم به تاثیرات ناشی از خشکی، آزمونهای آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. عوامل این طرح، بیست ژنوتیپ گندم (ده ژنوتیپ مقاوم و ده ژنوتیپ حساس به خشکی) (جدول ۱) و شش سطح پتانسیل اسمزی بودند. بذرهای ژنوتیپهای گندم از مراکز تحقیقاتی تهیه بذر و نهال کرج، دیم مراغه و سرارود کرمانشاه تهیه شدند. پتانسیل اسمزی با تهیه محلولهای مانتول با پتانسیل اسمزی ۴-، ۸-، بار، ۱۲-، بار، ۱۶-، بار و ۲۰- بار و با استفاده از فرمول وانت هوف ایجاد گردید. در کنار این سطوح پتانسیلهای اسمزی، از آب

جدول ۱- ژنوتیپهای گندم مقاوم و حساس به خشکی مورد مطالعه در آزمایش

ژنوتیپهای حساس به خشکی	ردیف	ژنوتیپهای مقاوم به خشکی	ردیف
مرو دشت	۱۱	پیشناز	۱
زرین	۱۲	پتو	۲
شهریار	۱۳	نیک نژاد	۳
خزرا	۱۴	سرداری	۴
شاه پسند	۱۵	آذر ۲	۵
الوند	۱۶	کویر	۶
اوحدی	۱۷	پارسی	۷
رصد	۱۸	Booma2	۸
پیشگام	۱۹	سبلان	۹
سیوند	۲۰	هیرمند	۱۰

گلخانه

به منظور بررسی بهتر عکس العمل ژنوتیپهای منتخب گندم به تنش خشکی ناشی از محلولهای مانیتول، یک آزمایش گلدانی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. عاملهای طرح، شش ژنوتیپ منتخب از آزمایشگاه، (شامل سه ژنوتیپ منتخب مقاوم و سه ژنوتیپ منتخب حساس) و شش سطح پتانسیل اسمزی مورد استفاده در آزمایشگاه، بودند. در هر گلدان که ۱۲ سانتیمتر قطر داشت از خاک مزرعه استفاده شد و تعداد ۲۵ بذر از هر ژنوتیپ در آنها با عمق ۲-۱ سانتیمتر کاشته شد. بدین ترتیب در آزمایش گلخانه ای تعداد ۱۸۰ گلدان وجود داشت که آبیاری آنها از ابتدا با استفاده از محلول با پتانسیل اسمزی معین و با مقادیر مساوی انجام می گرفت. کار شمارش بذرهای سبز شده در هر گلدان، از روز چهارم پس از شروع آزمایش، آغاز شد و به طور مرتب و روزانه تا هفده روز بعد ادامه یافت. در پایان آزمایش درصد سبز شدن هر گلدان محاسبه و یادداشت شد. میانگین مدت و سرعت سبز شدن نیز با استفاده از معادله الیس و رابرتز (۱۹۸۱) محاسبه و یادداشت گردید. برداشت نمونه ها برای تمامی سطوح مختلف تنش اسمزی به هنگام رسیدن هر تک بوته به کد ۱۳ زادوکس و در مرحله سه برگگی انجام شد. و در انتهای این دوره مقادیر میزان کلروفیل بوته ها در

هر گلدان با استفاده از دستگاه کلروفیل متر^۱ Minolta SPAD-502 از سه ناحیه بالایی، وسطی و پایینی گیاهان اندازه گیری و یادداشت شد.

شاخصهای کلروفیل فلورسانس (Fv/m و Fm.Fo) با استفاده از دستگاه فلورومتر Opti Science مدل OS30P (ساخت آمریکا) با در نظر گرفتن ۱۵ دقیقه تاریکی، برای بوته های همه گلدانها اندازه گیری شد. مقدار نشت یونی برای اندازه گیری مقدار نفوذپذیری غشا سلولی سنجیده شد (لوتس و همکاران، ۱۹۹۶).

تجزیه واریانس داده ها با استفاده از نرم افزار MSTAT-C انجام شد. مقایسه میانگین داده ها نیز به روش چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. برای رسم شکل ها از نرم افزار استفاده شد.

فناوری های زیست شناسی ملکولی

استخراج و سنجش غلظت و کیفیت RNA

مجموعه این آزمایشها در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد. در تمام موارد کار با RNA از آب تیمار شده با DEPC (دی اتیل پیروکربنات) استفاده گردید. استخراج RNA از برگ توسط کیت جداسازی RNA با نام تجاری، GeneJET Plant RNAPurification Mini Kit از شرکت Thermo

1- Chlorophyll meter

برنامه ی سیکل‌های دما و زمان در آزمایش به شرح جدول ۲ بود. تجزیه و تحلیل داده ها بر اساس پیشنهاد فافل (۲۰۰۴) انجام شد که بطور خلاصه به شرح زیر است: CMO برای ژن Ct مرحله ۱: $\Delta C_t = C_t(\text{PEAMT}) - C_t(\text{reference gene})$ نرمال سازی ارزش محاسبه تفاوت ΔC_t برای رقم مد نظر و شاهد که برای هر رقم جداگانه محاسبه می شود:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{شاهد}) - \Delta C_t(\text{مورد بررسی})$$

مرحله ۳: محاسبه تفاوت بروز reference gene برای $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relative fold change in expression = TaAPT₁ استفاده شد.

نتایج و بحث

آزمایشگاه

نتایج حاصل از تأثیر ژنوتیپ و پتانسیل اسمزی روی کلیه صفات آزمایشگاهی بیست ژنوتیپ گندم در جدول ۳ نشان داده شده است. اثر ژنوتیپ روی کلیه صفات معنی دار بود. اثر تنش کمبود آب (پتانسیل اسمزی) نیز در کلیه این صفات معنی دار بود. اثر متقابل ژنوتیپ در پتانسیل اسمزی، در همه صفات بجز در صد جوانه زنی غیر معنی دار نشان داده شد (جدول ۳). از نظر درصد جوانه زنی، در بین ژنوتیپهای مقاوم به خشکی، ژنوتیپهای پیشتاز، آذر ۲ و پارسا بیشترین، و در بین ژنوتیپهای حساس به خشکی، ژنوتیپ پیشگام، اوحدی و رصد، کمترین درصد جوانه زنی را نشان دادند (جدول ۲-۳). از نظر مدت و سرعت جوانه زنی، ژنوتیپ پارسا در میان ژنوتیپهای مقاوم به خشکی، وضعیت بهتری را نشان داد و در عین حال در بین ژنوتیپهای حساس به خشکی، ژنوتیپهای رصد و پیشگام، وضعیت نامناسب تری داشتند (جدول ۴). مقایسه ژنوتیپهای مقاوم و حساس به خشکی از نظر سه صفت فوق الذکر، نشان دهنده اختلاف قابل توجه و حدود ۴۰ درصدی بین آنهاست. از نظر طول ریشه چه، ساقه چه و گیاهچه، بیشترین مقادیر، به ترتیب مربوط به ژنوتیپ اوحدی از دسته ژنوتیپهای حساس به خشکی، و ژنوتیپ آذر ۲ از دسته ژنوتیپهای مقاوم به خشکی بودند (جدول ۴).

Scientific و با شماره بیج #K0801، طبق پروتکل شرکت سازنده انجام پذیرفت. کیت شامل ۴ نوع محلول با نام های زیر بود:

- ۱) Plant RNA Lysis Solution (PRLS)
- ۲) Wash buffer WB140 ml
- ۳) Wash buffer 230 ml
- ۴) Water nuclease free

برای سنجش غلظت RNA از دستگاه نانودراپ^۱ با مارک NanoVue plus استفاده شد. برای اندازه گیری غلظت RNA مقدار ۵/۰ میکرولیتر نمونه RNA روی صفحه ی سنجش قرار گرفت. پس از چند ثانیه دستگاه میزان غلظت و نسبت Abs ratio 260/280 را نشان داد. جهت تعیین کیفیت RNA از الکتروفورز افقی و ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. برای این منظور از بافر TBE (10X) و محلول نیم مولار EDTA استفاده گردید. آگارز مورد استفاده با مارک Ultra Pure Agarose ساخت شرکت Invitrogen بود.

Real-time quantitative reverse transcription PCR

طراحی آغازگرها

از آغازگرهای مورد استفاده توسط Jost.R et al. 2009 استفاده شد. اما این آغازگرها با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI مجدداً مورد بررسی قرار گرفتند. آغازگرها توسط شرکت TAG Copenhagen A/S و با واسطه شرکت ژن فن آوران تهران تولید و به صورت خشک دریافت شدند. با اضافه کردن میزان آب قید شده در دستور تهیه توسط شرکت سازنده غلظت آنها را با استفاده از آب دو بار تقطیر به ۱۰۰ میکرومولار رسانده شد و در دمای ۲۰ °C نگهداری گردیدند.

انجام واکنش

به منظور انجام واکنش Real-time q-RT PCR از کیت یک مرحله ای EXPRESS One-Step SYBRGreenER شرکت Invitrogen و دستگاه ترمال سایکلر -Corbett Rotor- Gene 6000 در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه استفاده شد. واکنش در تیوب ۰/۵ میلی لیتری RNase free انجام شد.

جدول ۲

سنتر cDNA	
5 دقیقه	50°C
2 دقیقه	95°C
واکنش PCR	
5 ثانیه	95°C
1 دقیقه	60°C

به تعداد 40 بار تکرار می شود

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در آزمایشگاه

بنیه بذر	درجه آزادی	درصد جوانه زنی	مدت جوانه زنی	سرعت جوانه زنی	طول ریشه چه	طول ساقه چه	طول گیاهچه	وزن خشک ریشه چه	وزن خشک ساقه چه	وزن خشک گیاهچه	بنیه بذر
۱۹	۱۶۴۵/۳**	۱۱/۶۱**	۰/۰۱۱**	۵/۹۵۳*	۳/۱۹**	۱۴/۹**	۳۵۴۹/۲**	۳۱۲۵**	۱۲۴۳۷/۹**	۱۳۱۴۲۷*	بنیه بذر
۵	۳۱۹۲/۳۹**	۲۱۴/۲۵**	۰/۱۸۳**	۴۷۱/۵**	۷۴۵/۳**	۲۳۹۷/۹**	۵۳۴۷۱/۶**	۱۷۰۴۲۷/۹**	۳۹۸۲۹۰**	۲۲۵۷۱۷۸۷**	پتانسیل اسمزی
۹۵	۹۵/۳*	۰/۴۹۵ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۴/۳۰۶ ^{ns}	۰/۸۲۷ ^{ns}	۶/۲۳ ^{ns}	۵۵۸/۱ ^{ns}	۲۸۱/۲ ^{ns}	۱۲۰۴/۵ ^{ns}	۵۶۷۵۱ ^{ns}	اثر متقابل
۲۴۰	۶۹/۷۳	۰/۷۶۹	۰/۰۰۱	۳/۵۲	۱/۲۹۵	۷/۲۳	۶۱۷/۴	۳۹۲/۲	۱۵۶۸/۸	۷۲۸۶۰	خطا

** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد. ns غیر معنی دار.

مورد نظر برای انتخاب ژنوتیپهای برتر از نظر پاسخهای جوانه زنی راتامین نماید. با افزایش تنش خشکی ناشی از پتانسیل اسمزی، مقدار درصد جوانه زنی روند کاهشی داشت، هر چند اختلاف معنی داری بین سه سطح اول پتانسیل اسمزی وجود نداشت (جدول ۴-۳). از نظر مدت و سرعت جوانه زنی، در پتانسیل اسمزی صفر بار، مقادیر بیش از دو برابر پتانسیل اسمزی ۲۰- بار، برتری نشان دادند. نتایج آزمایشهای صادقان و باوری (۲۰۰۴) روی چغندر قند، و المنصوری و

همکاران (۲۰۰۱) روی گندم دوروم برای بررسی تاثیر تنش کمبود آب بر ویژگیهای جوانه زنی، نشان دهنده کاهش معنی دار در سرعت و مدت جوانه زنی بود.

وزن خشک ریشه چه در ژنوتیپ پارسی با ۷۸/۹۹ میلیگرم، بیشترین مقدار و بیش از سه برابر کمترین وزن خشک ریشه چه در ژنوتیپ رصد با ۲۴/۰۸ میلیگرم بود. وزن خشک ساقه چه و گیاهچه هم در ژنوتیپ پارسی بیش از دو برابر ژنوتیپ رصد بود (جدول ۲-۳)، که نشان دهنده اختلاف زیاد در مقادیر وزن خشک ریشه چه، ساقه چه و گیاهچه در ژنوتیپها و وجود تنوع بین آنهاست.

بیشترین مقدار بنیه بذر در ژنوتیپهای پارسی و سرداری و کمترین آن متعلق به ژنوتیپ حساس به خشکی رصد بود (جدول ۲-۳). وجود تفاوت معنی دار بین ژنوتیپها، نشان دهنده وجود تنوع در بین آنهاست. باتوجه به این که وجود تنوع، پایه و اساس انجام گزینش ارقام مطلوب و برتر می باشد، جمعیت مورد بررسی می تواند تنوع

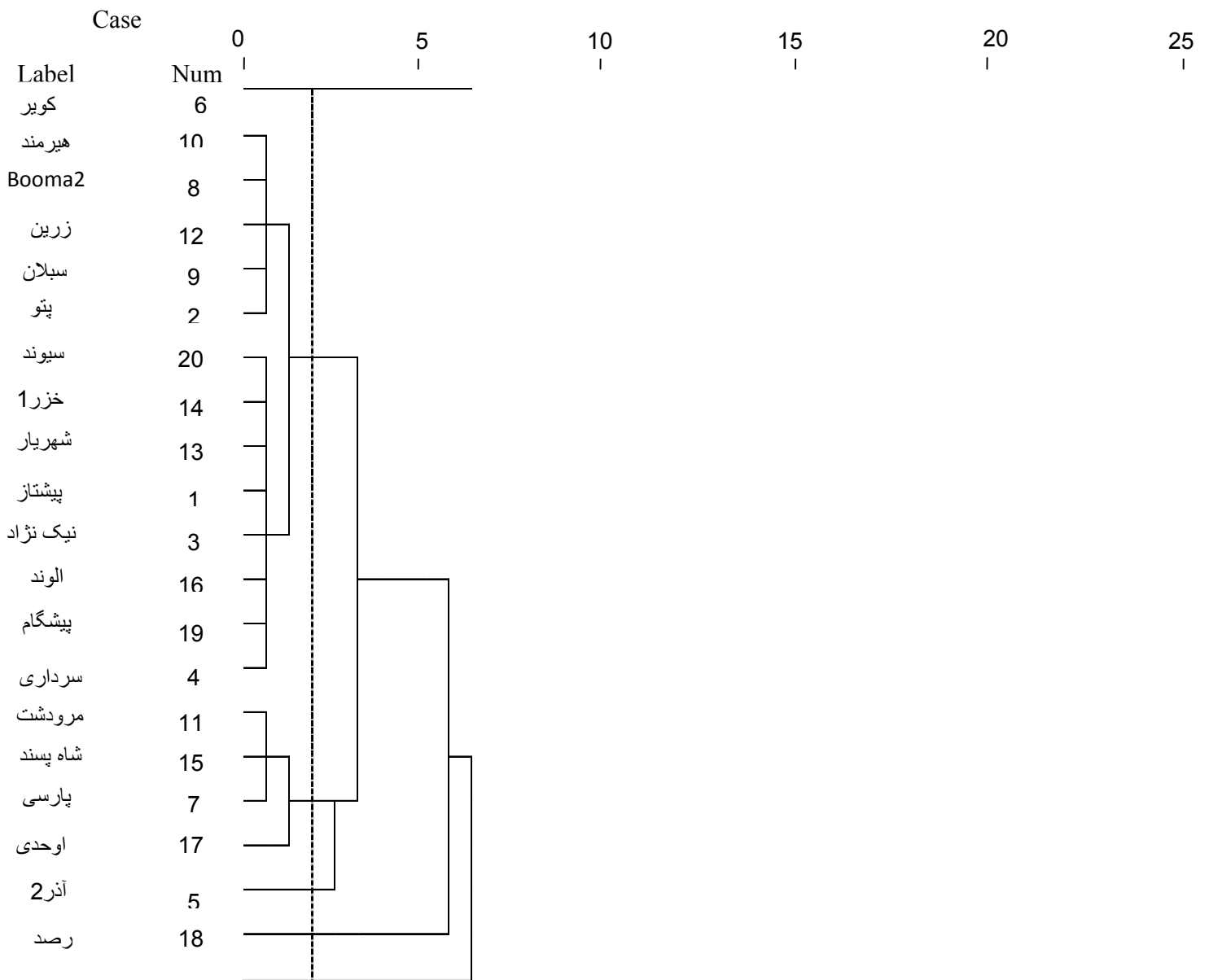
جدول ۴- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های مختلف در آزمایشگاه

ردیف	ژنوتیپ	درصد جوانه زنی (روز)	مدت جوانه زنی (روز)	بینه بذر	وزن خشک گیاهچه (میلیگرم)	وزن خشک ساقه چه (میلیگرم)	وزن خشک ریشه چه (میلیگرم)	طول گیاهچه (سانتی‌متر)	طول ساقه چه (سانتی‌متر)	طول ریشه چه (سانتی‌متر)	سرعت جوانه زنی (روز)
۱	پیش‌تاز	۹۶/۲۲	۶/۲۰c-e	۷۳۴/۱۸bc	۱۲۹/۶۶b-f	۶۷/۰۳c-g	۶۱/۶۳ab	۷/۶۰b	۳/۷۷bc	۳/۸۳bc	۰/۱۷۲e-g
۲	پتو	۸۹/۶۲a-d	۵/۸۸c-g	۷۶۱/۷۱a-c	۱۳۰/۹۱b-f	۶۷/۹۱c-g	۶۳/۰ab	۷/۹۷b	۳/۸۴a-c	۴/۱۳bc	۰/۱۹۰c-g
۳	نیک نژاد	۹۲/۲۲a-d	۶/۳۸cd	۷۹۲/۵۱ab	۱۱۹/۳۹b-g	۵۷/۶۹e-h	۶۱/۷ab	۸/۲۹ab	۳/۶۲c	۴/۶۷a-c	۰/۱۷۲cd
۴	سرداری	۹۱/۸۲a-d	۵/۰۴gh	۸۲۷/۸۹ab	۱۵۲/۰۸a-c	۸۴/۰۴a-c	۶۷/۰۴ab	۸/۶۲ab	۴/۲۲a-c	۴/۳۹bc	۰/۲۱۹gh
۵	آذری	۹۵/۳ab	۵/۴۹e-g	۹۵۸/۲۹a	۱۵۸/۳۴ab	۹۲/۲۳ab	۶۶/۱۱ab	۹/۹۳ab	۴/۸۴ab	۵/۰۹ab	۰/۱۹۶e-g
۶	کوبر	۹۰/۷a-d	۵/۵۱d-g	۶۹۷/۳۳bc	۱۱۹/۶۴b-g	۶۲/۸۶d-h	۵۶/۸۸a-c	۷/۳۸b	۳/۵۶c	۳/۸۲bc	۰/۲۰۱d-g
۷	پارسی	۹۶/۴a	۴/۶۳h	۷۹۶/۴۹ab	۱۷۴/۶۸a	۹۵/۶۹a	۷۸/۹۹a	۸/۱۸ab	۳/۸۲a-c	۴/۳۶bc	۰/۲۳vh
۸	Booma2	۸۶/۹b-e	۶/۳۴c-e	۶۹۹/۶۹bc	۱۰۱/۵۸e-h	۵۷/۶۷e-h	۴۳/۹۱b-e	۷/۵۷b	۳/۷۶bc	۳/۸۱bc	۰/۱۷۳c-e
۹	سبلان	۸۴/۷de	۶/۰c-f	۶۶۷/۳۳bc	۸۵/۴۹gh	۵۴/۴۱f-h	۳۱/۰۸de	۷/۳۵b	۳/۸۱a-c	۳/۵۴c	۰/۱۸۰c-f
۱۰	هیرمند	۸۸/۴a-e	۶/۴۴c	۷۰۴/۶۴bc	۱۱۸/۳۰b-g	۶۷/۰۷c-g	۵۱/۲۳b-d	۷/۴۶b	۳/۶۷bc	۳/۷۹bc	۰/۱۷۱e-g
۱۱	مرو دشت	۹۵/۳ab	۵/۸c-g	۸۴۶/۱۸ab	۱۴۲/۵۵a-d	۷۴/۲۲b-f	۶۷/۳۳ab	۸/۶ab	۴/۰۱a-c	۴/۵۹a-c	۰/۱۹۲b-f
۱۲	زرین	۹۱/۶a-d	۶/۵۵bc	۶۹۰/۵۸bc	۱۱۰/۱۷d-g	۶۲/۸۷d-h	۴۷/۳b-e	۷/۱۹b	۳/۷۶bc	۳/۴۳c	۰/۱۷۴d-g
۱۳	شهریار	۹۵/۱ab	۵/۵۳d-g	۷۵۴/۲۳a-c	۱۴۱/۳۲a-e	۷۵/۵۴b-e	۶۵/۷۸ab	۷/۷۶b	۳/۵۳c	۴/۲۳bc	۰/۲۰۵b-d
۱۴	خزری	۹۳/۸a-c	۵/۲۹f-h	۷۷۲/۹۸ab	۱۲۵/۷۶b-f	۶۸/۴۳c-g	۵۷/۳۳a-c	۷/۹۹b	۳/۶۸bc	۴/۳۱bc	۰/۲۰۸bc
۱۵	شاه پسند	۸۶/۰c-e	۵/۴۹e-g	۸۶۷/۵۳ab	۱۴۳/۷a-d	۷۸/۱۱a-d	۶۵/۵۹ab	۹/۴۳ab	۴/۵۶a-c	۴/۸۷a-c	۰/۱۹۶b-f
۱۶	الوند	۸۶/۲c-e	۶/۴۹c	۷۸۲/۰۷ab	۱۱۵/۴۹c-g	۶۶/۳۹c-g	۴۹/۱b-d	۸/۵۷ab	۴/۴۸a-c	۴/۰۹bc	۰/۱۶۸fg
۱۷	اوحدی	۶۹/۲f	۷/۳۱ab	۸۴۱/۵۳ab	۸۵/۳۷gh	۵۱/۸۳gh	۳۳/۵۴c-e	۱۰/۷۶a	۴/۹۴a	۵/۸۲a	۰/۱۴۶g
۱۸	رصد	۵۷/۷g	۷/۶۵a	۵۵۶/۱۷c	۶۷/۶۱h	۴۳/۵۳h	۲۴/۰۸e	۸/۱۴ab	۴/۰۲a-c	۴/۱۲bc	۰/۱۴۵g
۱۹	پیشگام	۸۰/۷e	۷/۶a	۷۶۷/۸۴a-c	۱۰۰/۷۳f-h	۵۴/۹۲f-h	۴۵/۸۱b-e	۸/۶۶ab	۳/۷۲bc	۴/۹۴ac	۰/۱۴۴g
۲۰	سیوند	۹۰/۴a-d	۶/۱۵c-f	۷۵۳/۷۸a-c	۱۲۲/۰۷b-g	۶۴/۷۴c-g	۵۷/۳۳a-c	۷/۹۷b	۳/۶۹bc	۴/۲۸bc	۰/۱۸۴c-f

g

حروف غیر مشابه در هر ستون نشانه اختلاف معنی دار است.

بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ژنوتیپ‌های بیست گانه نخود براساس صفات آزمایشگاهی، نشان دهنده تقسیم بندی ژنوتیپ‌ها به پنج گروه کلی بود، و براین اساس و با در نظر گرفتن پاسخ صفات مختلف ژنوتیپ‌ها به سطوح پتاسیل اسمزی، سه ژنوتیپ سرداری، آذری و پارسی به عنوان منتخب ژنوتیپ‌های مقاوم و سه ژنوتیپ اوحدی، رصد و پیشگام به عنوان منتخب ژنوتیپ‌های حساس، برای استفاده در گلخانه و بررسی‌های بیشتر معرفی شدند (شکل ۱).



شکل ۱- تجزیه خوشه ای ژنوتیپ های گندم مورد مطالعه

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه در شش سطح پتانسیل اسمزی

پتانسیل اسمزی (بار)	بینه بذر	وزن خشک گیاهچه (میلیگرم)	وزن خشک ساقه چه (میلیگرم)	وزن خشک ریشه چه (میلیگرم)	طول گیاهچه (سانتیمتر)	طول ساقه چه (سانتیمتر)	طول ریشه چه (سانتیمتر)	سرعت جوانه زنی (روز)	مدت جوانه زنی (روز)	درصد
۰	۱۶۵۷/۹a	۲۰۹/۴۵۷a	۱۳۵/۴۷۸a	۷۳/۹۷۸b	۱۷/۲۹a	۹/۱۷a	۸/۱۲۳a	۰/۲۴۹a	۴/۱۶۶e	۹۵/۷۳a
-۴	۱۲۹۱/۲b	۲۰۶/۶۱۳a	۱۱۹/۷۹۲b	۸۶/۸۲۲a	۱۳/۹۶b	۶/۹۴۵b	۷/۰۱۵b	۰/۲۳۶a	۴/۳۷e	۹۲/۷۳a
-۸	۸۵۲/۳۸c	۱۶۳/۲۷۷b	۸۳/۴۷۳c	۷۹/۸۰۳ab	۹/۱۸۵c	۴/۴۴۸c	۴/۷۳۷c	۰/۲۰۸b	۴/۹۴۸d	۹۲/۷۳a
-۱۲	۴۱۱/۲۵d	۸۴/۸۱c	۳۷/۱۰۵d	۴۷/۷۰۵c	۴/۶۶۲d	۱/۸۵d	۲/۸۱۲d	۰/۱۵۸c	۶/۵۳۳c	۸۷/۶۷b
-۱۶	۱۹۵/۴۸e	۳۸/۸۱۳d	۱۵/۶۷۷e	۲۳/۱۳۷d	۲/۳۶۸e	۰/۷۲e	۱/۶۴۸e	۰/۱۳۲d	۷/۸۷۳b	۸۱/۵۳c
-۲۰	۱۷۳/۶۷e	۳۰/۴۷۸d	۱۲/۸۹e	۱۷/۵۸۸d	۲/۱۶e	۰/۶۶۳e	۱/۴۹۷e	۰/۱۱۹d	۸/۶۴۳a	۷۷/۰۷d

اُسَمزی بر همه صفات، بجز پارامترهای فلورسانس کلروفیل و نشأت یونی معنی دار بود (جدول ۶).

مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه ژنوتیپهای مختلف نشان داد، بیشترین درصد سبز شدن مربوط به ژنوتیپ پارسی و کمترین آن مربوط به دو ژنوتیپ آذر ۲ و پیشگام بود (جدول ۶). کمترین (و بهترین) مدت سبز شدن متعلق به ژنوتیپ پارسی و بیشترین آن در ژنوتیپهای اوحدی و پیشگام بود. از نظر سرعت سبز شدن، بیشترین مقدار در ژنوتیپهای پارسی و سرداری و کمترین در ژنوتیپ پیشگام وجود داشت.

از نظر وزن تر بوته ها، بیشترین مقادیر در ژنوتیپ پارسی و کمترین مقادیر در ژنوتیپ پیشگام وجود داشت (جدول ۷). همچنین، در صفت وزن خشک بوته ها، مقادیر مربوط به ژنوتیپ پارسی بیشترین و در ژنوتیپ پیشگام کمترین بود.

بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ژنوتیپهای بیست گانه نخود بر اساس صفات آزمایشگاهی، نشان دهنده تقسیم بندی ژنوتیپها به پنج گروه کلی بود، و بر این اساس و با در نظر گرفتن پاسخ صفات مختلف ژنوتیپها به سطوح پتانسیل اسمزی، سه ژنوتیپ سرداری، آذر ۲ و پارسی به عنوان منتخب ژنوتیپهای مقاوم و سه ژنوتیپ اوحدی، رصد و پیشگام به عنوان منتخب ژنوتیپهای حساس، برای استفاده در گلخانه و بررسیهای بیشتر معرفی شدند (شکل ۱).

گلخانه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در گلخانه در جدول ۶ مشاهده می شود. بین ژنوتیپهای مورد مطالعه از نظر همه صفات بجز پارامترهای فلورسانس کلروفیل و نشأت یونی تفاوت معنی داری وجود داشت. تأثیر سطوح مختلف پتانسیل

جدول ۶- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در گلخانه

ردیف	ژنوتیپ	درصد سبز شدن	مدت سبز شدن (روز)	سرعت سبز شدن (در روز)	مقدار کلروفیل	وزن تر بوته ها (میلیگرم)	وزن خشک بوته ها (میلیگرم)
۱	پارسی	۸۶/۶۷a	۶/۷۳b	۰/۱۶۲a	۲۵/۸۷b	۳۴۹۰a	۳۵۸/۹ a
۲	سرداری	۸۰/۶۷ab	۷/۰۲ab	۰/۱۵۷a	۲۷/۹۲ab	۳۰۳۸ab	۳۲۹/۸ab
۳	آذر ۲	۶۹/۱۱b	۷/۴۳ab	۰/۱۴۴bc	۲۶/۰۹b	۲۳۷۳bc	۲۶۴/۲bc
۴	رصد	۷۶ab	۷/۱۲ab	۰/۱۴۸b	۳۰/۱۳a	۲۹۰۶ab	۳۱۳/۶ab
۵	اوحدی	۷۵/۵۶ab	۷/۶۵a	۰/۱۳۹bc	۲۸/۶۳ab	۲۷۶۶a-c	۲۹۹/۶ab
۶	پیشگام	۷۱/۱۱b	۷/۷۴a		۲۹/۳۷ab	۲۰۵۴c	۲۲۰/۳c

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد. NS غیر معنی دار

جدول ۷- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه ژنوتیپهای مختلف در گلخانه

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد سبز شدن	مدت سبز شدن	سرعت سبز شدن	مقدار کلروفیل	وزن تر بوته ها	وزن خشک بوته ها	Fo	Fm	Fv/m	نشت یونی
تکرار	۲	۵۲۵/۵ ^{ns}	۷/۳۴ ^{**}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۶۶/۹ ^{ns}	۱۸۹۴۲۷۱ ^{ns}	۲۰۷۱۰ ^{ns}	۳۷۵۵ ^{**}	۱۸۷۵۹ ^{ns}	۰/۰۰۴ ^{ns}	۳۳۶/۸ ^{**}
ژنوتیپ	۵	۳/۷ ^{**}	۲/۷۴ ^{**}	۰/۰۰۲ ^{**}	۵۳/۹ [*]	۴۶۰۱۰۲۵ ^{**}	۴۳۷۶۲ ^{**}	۷۴۰ ^{ns}	۱۶۵۲۱ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۵۸/۶ ^{ns}
پتانسیل اسمزی	۵	۹/۲ ^{**}	۵۶/۳۳ ^{**}	۰/۰۲۸ ^{**}	۵۶/۹ [*]	۶۲۷۴۱۱۸ ^{**}	۴۲۷۴۸ ^{**}	۱۲۷۸ ^{ns}	۱۱۵۳۹ ^{ns}	۰/۰۰۸ ^{ns}	۷/۴ ^{ns}
ژنوتیپ در پتانسیل اسمزی	۲۵	۱۴۵/۷ ^{ns}	۰/۱۶۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۱۲/۲ ^{ns}	۳۲۵۴۵۲ ^{ns}	۳۹۱۶ ^{ns}	۵۱۰ ^{ns}	۸۴۹۷ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۱۹/۵ ^{ns}
خطا	۷۰	۲۰۰/۳	۰/۷۷۵	۰/۰۰۱	۲۲/۷	۶۴۰۵۴۸	۷۰۶۹	۷۲۵	۸۱۵۳	۰/۰۰۴	۳۱/۵

حروف غیر مشابه در هر ستون نشانه اختلاف معنی دار است.

۲۰- از نظر این صفت تفاوت معنی داری دیده نشد. سرعت سبز شدن در پتانسیل اسمزی ۰ بار، بیشترین مقدار بود که با منفی تر شدن پتانسیل اسمزی، روند کاهش نشان داد بطوریکه در پتانسیل اسمزی ۲۰- بار، مقدار آن تقریباً نصف ۰ بار بود (جدول ۸). با افزایش سطوح پتانسیل اسمزی، مقدار کلروفیل نیز افزایش داشت. هرچند روند تغییرات آن خیلی هم منظم نبود. در عین حال مقادیر وزن تر و وزن خشک بوته، در ۰ بار بیشترین و در ۲۰- بار کمترین مقدار را داشت که نشان دهنده تاثیر منفی و شدید کاهش دسترسی به آب بر مقادیر این صفات بود (جدول ۸).

این موضوع نشان دهنده لزوم بررسی بیشتر در مورد پاسخ ژنوتیپها به شرایط خشکی، برای یافتن ویژگیهای مناسب تر به منظور تشخیص مقاوم و یا حساس بودن آنها به تنش خشکی می باشد.

به نظر می رسد با توجه به تعلق حد بالای مقادیر اغلب صفات به ژنوتیپ پارسا که جزء دسته ژنوتیپهای مقاوم به خشکی است و حد پائین آن به ژنوتیپ پیشگام که جزء دسته ژنوتیپهای حساس به خشکی است، در صفات مورد مطالعه در گلخانه نیز، همچون آزمایشگاه، گروه بندی ژنوتیپهای مقاوم و حساس به خشکی از هم، تا حد قابل توجهی متمایز باشد (جدول ۷).

در بررسی میانگین صفات گلخانه ای در سطوح مختلف پتانسیل اسمزی نیز، مشاهده شد که از نظر درصد سبز شدن، بیشترین مقدار متعلق به پتانسیلهای اسمزی ۴-، ۸-، ۱۲- بود و کمترین هم در ۲۰- بار وجود داشت. هرچند بین درصد جوانه زنی پتانسیلهای اسمزی ۰ و ۲۰- بار تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۸). کمترین مدت سبز شدن در پتانسیل اسمزی ۰ بار و بیشترین مقدار مدت سبز شدن در پتانسیل اسمزی ۲۰- بار وجود داشت و البته بین پتانسیلهای ۰ و ۴-، و نیز ۱۶- و

جدول ۸- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه در گلخانه در سطوح مختلف پتانسیل اسمزی

ردیف	پتانسیل اسمزی (بار)	درصد سبز شدن	مدت سبز شدن (روز)	سرعت سبز شدن (در روز)	مقدار کلروفیل	وزن تر بوته (ها) (میلیگرم)	وزن خشک بوته (ها) (میلیگرم)
۱	۰	۶۰/۸۹c	۴/۹۹d	۰/۲۰۹a	۲۶/۰۳b	۳۵۴۷a	۳۲۵/۴ab
۲	-۴	۸۵/۳۳a	۵/۶۸d	۰/۱۷۹b	۲۷/۸۷ab	۳۱۹۸ab	۳۵۳/۳a
۳	-۸	۸۶/۰۰a	۶/۷۶c	۰/۱۴۹c	۲۹/۹۸a	۲۹۰۳a-c	۳۲۴/۶ab
۴	-۱۲	۸۲/۲۲a	۷/۹۷b	۰/۱۲۸cd	۲۵/۷۸b	۲۷۲۶bc	۲۹۸/۱ab
۵	-۱۶	۷۶/۴۴ab	۸/۸۳a	۰/۱۱۵d	۲۹/۵۷a	۲۳۵۵cd	۲۶۶/۷bc
۶	-۲۰	۶۷/۲۲bc	۹/۴۵a	۰/۱۰۷d	۲۸/۷۷ab	۱۸۹۶d	۲۱۸/۲c

حروف غیر مشابه در هر ستون نشانه اختلاف معنی دار است.

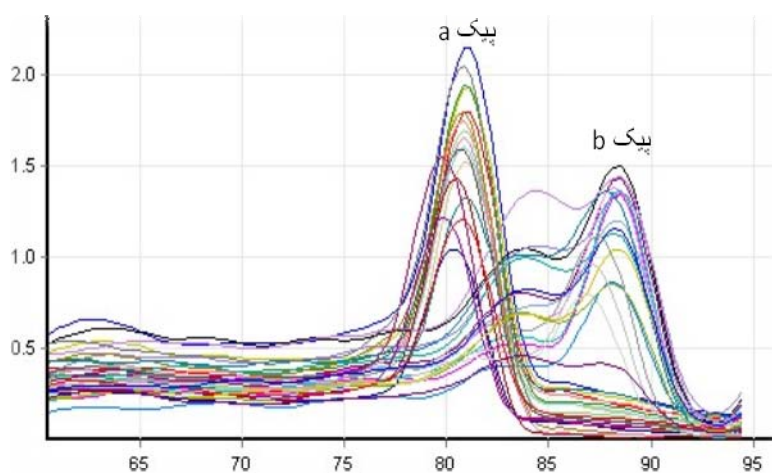
استفاده در آزمایش برخوردار است. نتایج نمودار ذوب حرارتی نشان می‌دهد داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن‌ها که در بخش دیگر مورد بررسی قرار خواهد گرفت دارای دقت کافی می‌باشد.

بررسی بازده واکنش زنجیره ای پلیمرز

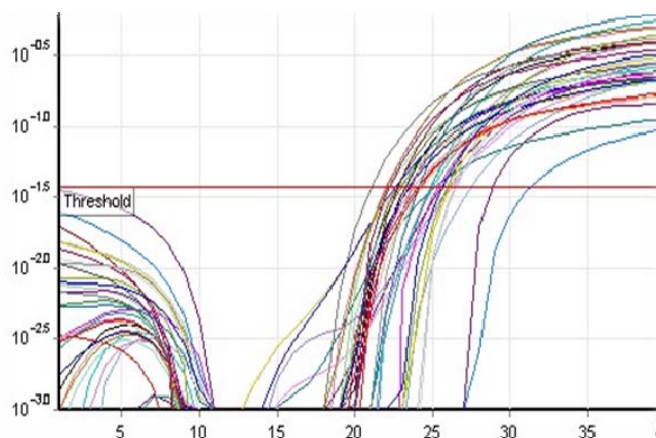
برای بررسی بازده واکنش زنجیره ای پلیمرز، نمودار *Take off* توسط نرم افزار Corbette6000 ترسیم گردید (شکل ۳-۳). نتایج نشان می‌دهد در ۳۶ واکنش انجام شده، بجز یک واکنش، داده‌ها در بازه ۱/۶ تا ۲ قرار دارند که بیانگر دقت مناسب آزمایشها می‌باشد. داده‌های مربوط به این واکنشی که دانه بازده کمتر از ۱/۶ بود در آنالیزهای نهایی بررسی بروز ژن مورد توجه قرار نگرفت.

بررسی کیفیت آغازگرهای طراحی شده به استفاده از نمودار حرارت ذوب

به منظور سنجش کیفیت آغازگرهای طراحی شده از نظر اختصاصی بودن آنها، نمودار ذوب دمایی تهیه گردید. (شکل ۲-۲). نظر به اینکه برای کلیه تیمارهای مورد بررسی، آغازگر TaPMT-qPCR که به منظور بررسی بیان ژن کد کننده آنزیم PEAMT طراحی گردیده بود فقط یک نقطه پیک را نشان می‌دهد (شکل ۲، پیک a)، این آغازگر کاملاً اختصاصی عمل نموده است. آغازگر TaPDF2-qPCR که برای بررسی بیان ژن مرجع طراحی شده بود، اگرچه در دمای حدود ۸۵ درجه سانتیگراد پیک کوچکتري را نشان می‌دهد اما همچنان به دلیل داشتن پیک بلند (بجز برای یک واکنش) از دقت کافی به منظور



شکل ۲- ذوب دمایی برای آغازگرهای TaPMT-qPCR و TaPDF2-qPCR

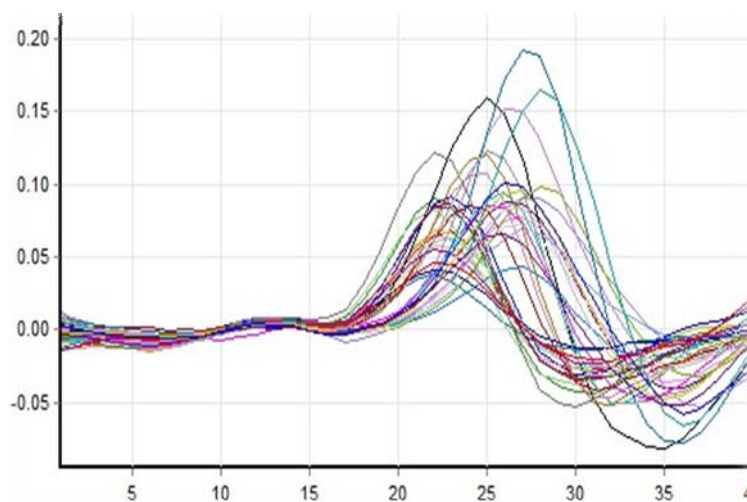


شکل ۳- *Take off* برای واکنش زنجیره ای پلی مرز

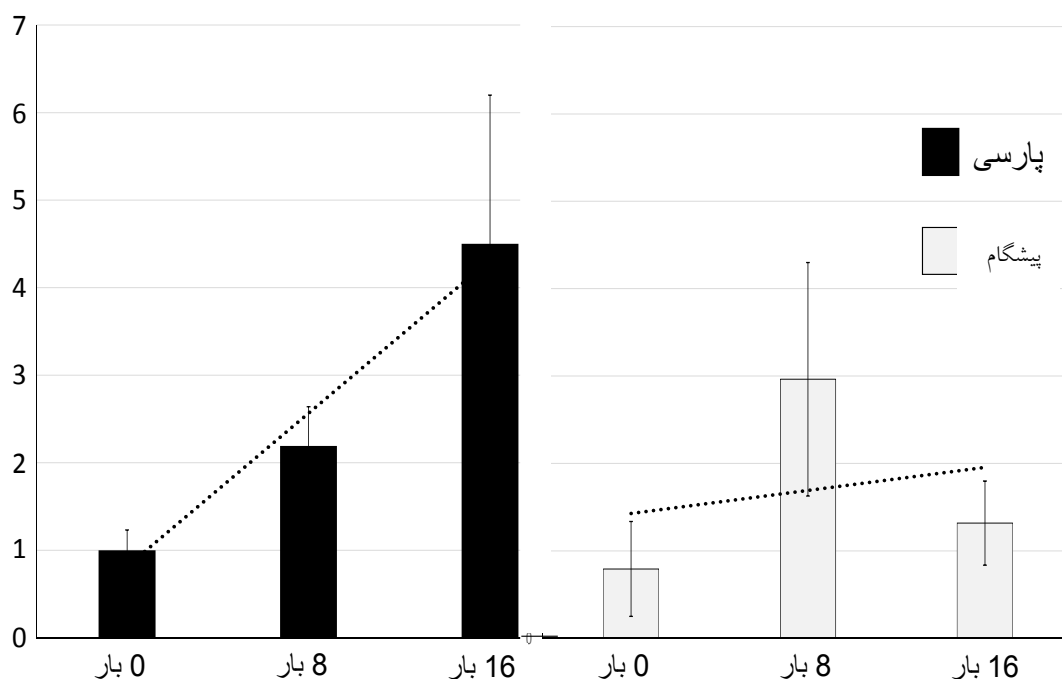
بررسی ارزش سیکل های آستانه

شکل ۴ نشان دهنده ارزش سیکل های آستانه بدست آمده برای کلیه تکرار ها می باشد. همانطور که در شکل مشاهده می

شود بدلیل نداشتن خطا آزمایش از کیفیت مناسبی برخوردار است.



شکل ۴- نمودار سیکل های آستانه برای واکنش های انجام شد



* پارسی در شرایط صفر بار بعنوان شاهد آزمایش (Calibrator) در نظر گرفته شده است.

شکل ۵- اثر افزایش تنش اسمزی بر بروز ژن TaPMT1

مقایسه بروز ژن TaPMT1 در دو رقم پارسی (مقاوم به خشکی) و پیشگام (حساس به خشکی)*

اثر تنش خشکی در گندم نان بر بروز ژن TaPMT₁

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه که از این طرح تحقیقاتی داخلی، حمایت کرده است، تقدیر و تشکر می‌شود.

شکل ۵ نشان دهنده اثر تنش بر مقدار بروز ژن TaPMT₁ برای دو رقم گندم نان ایرانی پارسی (مقاوم به خشکی) و پیشگام (حساس به خشکی) می‌باشد. نتایج نشان می‌دهند بروز این ژن در رقم مقاوم به خشکی با افزایش مقدار تنش اسمزی افزایش یافته است درحالی‌که برای رقم حساس اگرچه اندکی افزایش به هنگام مواجهه گیاه با تنش دیده می‌شود اما روندی برای مشاهده نمی‌گردد. در گزارش جاست و همکاران (۲۰۰۹) در گندم، به رابطه این ژن و تنش‌های زیستی و غیر زیستی اشاره گردیده است. اگرچه در این آزمایش، روند افزایش بروز در رقم مقاوم به نظر شدیدتر از نتایج گزارش شده فوق است.

نتیجه گیری

نتایج این آزمایشها به خوبی نشان می‌دهد که افزایش تنش در رقم مقاوم به خشکی موجب افزایش بروز ژن TaPMT₁ شده است. به عبارت دیگر نتایج این آزمایش به وضوح نشان دهنده درگیر بودن این ژن حداقل در سطح بیان ژن در واکنش به تنش اسمزی است. اگرچه بر اساس این مشاهدات، این نتیجه گیری که ژن TaPMT₁ نقش اساسی در مقاومت به تنش اسمزی به عنوان یکی اصلی‌ترین اجزا تنش خشکی دارد اندکی سهل‌انگارانه می‌نماید، اما افزایش بروز ژن در رقم مقاوم و عدم تغییر معنی‌دار بروز آن در رقم حساس می‌تواند این ژن را به عنوان یک کاندید اصلی برای بررسی‌های بیشتر در سطح بیولوژی مولکولی مطرح نماید. این امر با توجه به شجره ارقام ایرانی گندم که معمولاً در شرایط تنش فلات ایران تکامل یافته اند، توجیه پذیر است. به نظر می‌رسد روند انتخاب طبیعی در ارقام با شجره ایرانی بیشتر به نفع افزایش بروز این ژن بوده است که مجدداً می‌تواند دلیلی بر اهمیت این ژن در تبیین واکنش گیاه به تنش خشکی باشد. بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان پژوهش‌های تکمیلی زیر را پیشنهاد نمود: ۱- بررسی فعالیت آنزیمی PEAMT₂ به همراه بررسی ایزوفرم TaPMT₂، ۲- ایجاد لاینهای تکمیلی^۱ در گیاهان مدل به منظور بررسی دقیق عمل این ژن، ۳- افزایش تعداد ارقام مقاوم و حساس به خشکی می‌تواند در تعمیم نتایج تحقیق موثر باشد و ۴- بررسی میزان بروز این ژن در مقایسه با بروز ژنهای تنظیمی که بطور دقیقتر ارتباط احتمالی این ژن در واکنش‌ها به تنش‌ها را مشخص خواهد کرد.

منابع

- AbdElGhany. H.M., A.A. Nawar, M.E. Ibrahim, Sh. A.El-Shamarka, M.M. Selim and A.I.Fahmi. 2004. Using tissue culture to select for drought tolerance in bread wheat. New directions for a diverse planet: Proceedings of the 4th International Crop Science Congress. Brisbane, Australia, 26 Sep-1 Oct.
- Agrawal, R. 2003. Seed technology . Pub . Co .PVT .LTD . New Delhi .India.
- Almansouri. M., J. M. Kinet., and S. Lutts. 2001. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant. Soil.* 231: 243-254.
- Anonymous . 2007. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association (ISTA).
- Chen.T.H.H., and N.Murata. 2008. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends. Plant. Sci.* 13: 499-505.
- Chen.T.H. H., and N. Murata. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5: 250-257.
- Datko. A.H., and S.H.Mudd. 1988b. Phosphatidylcholine synthesis- Differing patterns in soybean and carrot. *Plant. Physiol.* 88: 854-861.
- Demir.I., and K.Mavi. 2008. Effect of salt and osmotic stresses on the germination of pepper seeds of different maturation stages. *Braz. arch. biol. technol.* vol.51.no.5.
- Ellis, R.H. and E.H. Roberts. 1981. The quantification of aging and survival in orthodox seeds. *Seed. Sci. Technol.* 9: 373-409.
- González.A., I.Martín., and L.Ayerbe. 2008. Yield and Osmotic Adjustment Capacity of Barley Under Terminal Water-Stress Conditions. *J. Agron. Crop. Sci.* 194(2): 81-91.
- Hosnedl.V., and H.H. Rostlinna. 2002. Barley seed sensitivity to water stress at germination stage. *Rostl. Vyroba.* 48(7): 293-297.
- Jahanbin.M.A., and M. Zaefizadeh. 2012. Effects of osmotic stress on germination and germination indices of synthetic wheat. *Ann. Biol. Res.* 3 (2): 995-999.
- Jost, R., Berkowitz, O., Shaw, J., and J. Masle. 2009. Biochemical characterization of two wheat phosphoethanolamine N-methyl transferase isoforms with different sensitivities to inhibition by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 284, 31962-31971.
- Landjeva.S., T.Karceva., V.Korzun., and G.Ganeva. 2012. Seedling growth under osmotic stress and agronomic traits in Bulgarian semi-dwarf wheat: comparison of genotypes with Rht8 and/or Rht-B1 genes. *Crop. Pasture. Sci.* 62(12) 1017-1025.
- Lutts, S., Kinet, J.M., and J. Bouharmont. 1996. NaCl induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot. Annual Botany.* 78: 389-398.
- Pfaffl M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In "A-Z of quantitative PCR" (S. A. Bustin, Ed.), International University Line, USA, CA.
- Pritchard, J., R.G.W. Jones., and A.D. Tomos. 1991. Turgor, growth and rheological gradients of wheat roots following osmotic stress. *J. Exp. Bot.* 42 (241).
- Qayyum.A., A.Razzaq., M.Ahmad., and A.Jenks. 2011. Water stress causes differential effects on germination indices, total soluble sugar and proline content in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (64), pp. 14038-14045.
- Rauf.M.M.Munir., M.U.Hassan., M.Ahmad., and M.Afzal. 2007. Performance of wheat genotypes under osmotic stress at germination and early seedling growth stage. *Afr. J. Biotechnol.* 6 (8), pp. 971-975.
- Reddy.A.R., K.V.Chaitanya., and M.Vivekanandan. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant. Physiol.* 161: 1189-1202.
- Rui-lian.J., and C.Xiao-ping. 2003. Methods for identifying drought resistance at germination stage of wheat by osmotic stress. *J. Plant Genet. Resour.* 2003-4.
- Sadeghian, S.Y., and N.Yavari. 2004. Effect of water – deficit stress on germination and early seedling growth in sugarbeet. *J. Agron. Crop. Sci.* 190(2): 138-144.
- Sayar.R., H. Bchini., M.Mosbahi., and H. Khemira. 2010. Response of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) growth to salt and drought stresses. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 46 (2): 54-63.
- Sayar.R., H.Bchini., M.Mosbahi., and M. Ezzine. 2008. Effects of salt and drought stresses on germination, emergence and seedling growth of durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *J. Agric. Res.* Vol. 5(15), pp. 2008-2016.

Effects of Physiological and Morphological Variation in Gene expression PEAMT1 and PEAMT2 drought resistant and sensitive genotypes of bread wheat

M. Rozrokh¹

Received: 2017-6-3 Accepted: 2017-9-16

Abstract

To study the response of wheat genotypes to drought and the effects of gene expression, experiments were conducted in a factorial based on randomized complete and randomized complete blocks designs with three replications respectively, in laboratory and greenhouse, at Islamic Azad University of Kermanshah, Iran in 2015. factors of the designs were included twenty wheat genotypes (Ten drought-resistant and sensitive genotypes) and six levels of osmotic potential. Molecular biology technologies were conducted in faculty of pharmacy, University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. The results showed that, drought resistant genotypes, Pishtaz, Azar2 and Parsi were Forty percentage, date and rate of germination superior to the drought-sensitive genotypes, Pishgam, Owhadi and Rasad. Root dry weight in the Parsi genotype with 78.99 mg, the maximum amount and more than three times the lowest root dry weight of 24.08 mg was observed in Rasad genotype. in greenhouse High and low limit values of the percentage, date and rate of emergence and plants weight Belonged to drought-resistant genotype, Parsi and drought-sensitive genotype, Pishgam, respectively Increased drought stress in Parsi genotype increased the gene expression TaPMT1, which clearly demonstrates the involvement of this gene at least at the level of gene expression in response to osmotic stress that due to no significant changes expression in sensitive genotype, Pishgam, can be this gene as a main candidate for further investigation proposed at the level of molecular biology.

Key words: Germination, molecular technologies, osmotic stress, parsi, pishgam

¹ - Assistant Professor, Department of Agronomy and Crop Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran