

## مطالعه مولکولی و بیان ژن‌های فتوسنتزی و فرآیند پیری در برگ پرچم و سایر برگ‌ها در گیاه جو

سعید نواب‌پور<sup>\*۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۸)

### چکیده

به منظور بررسی اهمیت برگ پرچم در جو زراعی (وارسته هوردا) از نظر برخی صفات فیزیولوژیک و بیان برخی ژن‌های مهم فتوسنتزی و پیری برگ، آزمایشی در شرایط مزرعه در سال ۲۰۰۳ در محل ایستگاه تحقیقاتی دانشگاه وارویک انگلستان انجام شد. به منظور افزایش دقت و امکان مقایسه آماری میانگین صفات مورد مطالعه، آزمایش با چهار تکرار صورت پذیرفت. نمونه برداری تصادفی از برگ پرچم و سایر برگ‌ها در سه زمان تعیین شده طی دوره رشد انجام گرفت. صفات مورد ارزیابی شامل میزان کلروفیل a و b، مقدار  $CO_2$  خالص تثبیت شده برگ، نسبت Fv/Fm، شاخص سطح اکسیداسیون سلولی (TBARM) و بیان ژن‌های فتوسنتزی و پیری برگ بودند. میزان تغییرات کلروفیل طی مراحل نمونه برداری روند کاهشی نشان داد. این مسأله در مورد سایر برگ‌ها شدت بیشتری داشت. میزان تثبیت  $CO_2$  خالص در برگ پرچم ضمن برتری مقداری، ثبات بیشتری نیز طی مراحل نمونه برداری نسبت به سایر برگ‌ها داشت. میزان شاخص سطح اکسیداسیونی سلولی در خلال مراحل پیری برگ به سرعت افزایش یافت. بیان ژن‌های فتوسنتزی RCBS، LhcII و Cab تشابه نسبی زیادی داشتند و عموماً با پیشرفت پیری برگ، به ویژه در مورد سایر برگ‌ها، به طور قابل توجهی کاهش داشتند. در مورد ژن‌های وابسته به پیری، تنوع قابل ملاحظه‌ای حاصل گردید. الگوی بیان ژن‌های پیری MTI و CATI شباهت زیادی داشتند، ولی ژن‌های SODI و SAG12 بیان متفاوتی را نشان دادند. جمع‌بندی نتایج مبین نقش ارزنده برگ پرچم در افزایش تولید دانه بود. این مهم با توجه به تداوم فتوسنتز، میزان کلروفیل و سرعت نسبی کمتر بروز تنش اکسیداتیو طی روند پیری در برگ پرچم، در مقایسه با سایر برگ‌ها، توجیه پذیر بود. در این راستا، فعالیت ژن‌های فتوسنتزی و ژن‌های واجد نقش هموستاتیک در خلال پیری بیان ممتازی در برگ پرچم نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: جو زراعی، کلروفیل، فتوسنتز، پیری برگ، برگ پرچم، بیان ژن

۱. استادیار اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

\*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.navabpour@yahoo.com

## مقدمه

در عرصه جهانی، جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) به لحاظ اهمیت و سطح زیر کشت، چهارمین محصول و در بین غلات در ایران حائز رتبه دوم است. سطح زیر کشت جهانی جو طی دو دهه اخیر با رکورد خیره کننده ۸۰٪ افزایش مواجه بوده است. این امر، علاوه بر سازگاری وسیع اکولوژی، به دلیل مصارف متعدد این محصول در تغذیه انسان و دام و کاربردهای صنعتی می باشد (۱ و ۱۰). افزایش راندمان تولید دانه به طور مؤثر در گرو بهبود صفات وابسته، به ویژه اجزای عملکرد، است. در عین حال، برگ پرچم در تولید ماده خشک و روند انتقال مواد فتوسنتزی به دانه نقش ارزنده‌ای را ایفا می کند (۲۲). مختصات مورفولوژیک برگ پرچم نظیر اندازه، شکل و زاویه قرارگیری و خصوصیات فیزیولوژیک مرتبط مانند محتوای کلروفیل و راندمان فتوسنتز از جمله عوامل مهم در افزایش عملکرد دانه محسوب می گردند (۱۳). مطالعات ژنتیکی انجام شده در خصوص برخی خصوصیات برگ پرچم از قبیل طول، عرض و زاویه قرارگیری در گیاه حاکی از کمی بودن این صفات و کنترل آنها توسط تعداد زیادی ژن بوده است (۳۹). با این حال، اطلاعات محدودی در سطح سلولی از روند تغییرات بیان ژن‌های مهم فتوسنتزی و درگیر در فرآیند پیری برگ پرچم در گیاه جو وجود دارد (۳).

ارزیابی روند بیان ژن‌های درگیر در فرایندهای فتوسنتز و پیری برگ امکان توجیه بسیاری از فعل و انفعالات فیزیولوژیک را که منجر به تغییرات صفات مهم زراعی می گردد در سطح سلولی و به لحاظ مولکولی فراهم می آورد (۱۵). در این راستا، نتایج تحقیقات کروپینسکا و همکاران (۱۹) مبین کاهش بیان ژن Lhc (*Light harvesting complex*) در مراحل پایانی پیری برگ پرچم در جو بود. پروتئین کد شده توسط ژن مزبور واجد نقش کنترلی در میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن (*Reactive Oxygen Species (ROS)*) تولید شده ناشی از شدت تشعشع نوری است. هم‌زمان با کاهش بیان این ژن، نسبت کلروفیل a به b افزایش معنی دار نشان داد (۱۹).

شارنبرگ و همکاران (۳۸) ضمن ارزیابی میزان پیشرفت پیری و افت راندمان سیستم فتوسنتزی II با اندازه‌گیری نسبت Fv/Fm در برگ پرچم جو اقدام به استخراج RNA و ایجاد کتابخانه cDNA طی مراحل رشد و پیری طبیعی در برگ پرچم و تیمار تاریکی نمودند. نتایج منجر به معرفی برخی کلون‌ها در مسیر مشترک پیری و تیمار تاریکی گردید. از جمله مهم‌ترین این ژن‌ها می‌توان به سیستمین پروتئاز، گلیکول ترانسفراز و فاکتور رونویسی (*Transcription factor*) اشاره کرد (۳۸). راندمان فتوسنتز، تداوم آن و ساز و کارهای تنظیمی وابسته همگی توسط الگوی بیان ژن‌ها کنترل می‌شوند. نتایج برخی مطالعات در شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده حاکی از افت معنی دار بیان ژن‌های فتوسنتزی نظیر ژن RCBS (*Rubisco small sub-unit*) درگیر در تولید آنزیم ریبیسکو است (۶ و ۲۴).

از منظر ژنتیک- فیزیولوژیک، پیری برگ (*Leaf senescence*) یک مرحله مهم نمو است که به لحاظ ژنتیکی و فیزیولوژیک بسیار حائز اهمیت است. ژن‌های زیادی در این مرحله فعال می‌شوند و در عین حال برخی ژن‌ها نیز غیرفعال می‌گردند. از مشخصه‌های بارز پیری، روند تغییرات منظم و کنترل شده فعل و انفعالات فیزیولوژیک است. از جمله این رخدادها توقف فتوسنتز، تجزیه کلروپلاست، کاهش چشمگیر کلروفیل و تجزیه پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های بزرگ حیاتی به منظور انتقال مواد به دانه است (۲۸). از دیگر وقایع مهم در خلال پیری، افزایش سطح رادیکال‌های فعال اکسیژن است که به تبع آن ژن‌های پاد اکسیدان نظیر کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و اسکوربیک پراکسیداز افزایش نسخه‌برداری نشان می‌دهند (۲۷). اگر چه رادیکال‌های مزبور در غلظت‌های زیاد سمی و مخرب بوده و موجب خسارت به غشاء سلولی و پراکسیداسیون مولکول‌های حیاتی می‌گردند، ولی در غلظت‌های کمتر به عنوان فاکتورهای سیگنالی (*Signaling factor*) در بیان ژن‌ها ایفای نقش می‌نمایند (۸). نقش رادیکال سوپر اکسید در بیان ژن‌های دفاعی PR1 و PR5 گزارش شده است (۱۵). هم‌چنین پراکسید هیدروژن با افزایش فعالیت مسیر متابولیک آنزیم MAP کیناز

(۳۵) استفاده گردید. مقدار ۵/۰ گرم نمونه برگ (به صورت منجمد شده) کاملاً خرد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ، میزان جذب در طول موج‌های ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (Uvikon930 Watford) ثبت گردید. میزان کلروفیل a و کلروفیل b و کلروفیل کل براساس روابط زیر محاسبه گردید:

$$chl a = 12/25A_{663/6} - 2/55A_{646/6} \quad [1]$$

$$chl b = 20/31A_{646/6} - 4/91A_{663/6} \quad [2]$$

$$Tchl = 16/76A_{646/6} - 6/34A_{663/6} \quad [3]$$

که chl a، chl b و Tchl به ترتیب میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

#### اندازه‌گیری TBARM (Thiobarbituric acid reactive material)

در این سنجش، که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است، مقدار اسید تیوباربیتوریک که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ (چربی‌ها) است، تعیین می‌شود. در این خصوص، از روش هگگ و همکاران (۱۲) با تغییراتی استفاده گردید. مقدار ۵/۰ گرم نمونه برگ را هموژنیزه نموده و یک میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک (۱۵٪ w/v) به آن اضافه شد. محلول حاضر با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به شدت مخلوط (ورتکس) و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب کوچکی که پس از سانتریفیوژ حاصل شد را با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو داده، ورتکس و مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. پس از آن، مقدار ۳ میلی‌لیتر اسید هیپوفسفریک (۱٪) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک (۰.۶٪ w/v) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰°C قرار داده شد. سپس واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف گردید. مقدار جذب محلول حاصل با طول موج‌های ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه جذب نوری (Uvikon930 Watford) اندازه‌گیری گردید.

الگوی زمان‌بندی باز و بسته شدن روزنه‌ها را تعیین می‌کند (۲۹). با توجه به مطالب یاد شده، این مطالعه به منظور دستیابی به اهداف زیر طرح‌ریزی شده است: (۱) ارزیابی روند بیان برخی ژن‌های مهم فتوستتزی و وابسته به پیری در برگ پرچم و سایر برگ‌ها و (۲) بررسی تغییرات خصوصیات فیزیولوژیک و شاخص‌های بیوشیمیایی در برگ پرچم و سایر برگ‌ها و ارتباط آنها با بیان ژن‌ها.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و صفات مورد بررسی

بذر گیاه جو زراعی، واریته هوردا ( *Hordeum vulgare* L. cv ) به مدت ۱۰ دقیقه به وسیله وایتکس ۲/۰ درصد ضد عفونی شده و در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ارومیک انگلستان در سال ۲۰۰۳ میلادی به صورت دستی کشت گردید. هر واحد آزمایشی شامل ۶ ردیف کشت به طول حدود ۳ متر بود که در چهار تکرار اجرا گردید. ردیف‌های کناری به عنوان حاشیه لحاظ گردیدند و نمونه‌برداری از ۴ ردیف وسط با رعایت حاشیه طولی صورت پذیرفت. واریته هوردا از ارقام پرمحصول جو زراعی شش پر با ارتفاع و زمان رسیدگی متوسط است. نمونه‌برداری از برگ پرچم در زمان ظهور کامل برگ پرچم (کد GS39 زادوکس) و ۲۰ روز بعد در خلال پر شدن دانه‌ها (کد GS71 زادوکس) انجام شد. در مورد سایر برگ‌ها، علاوه بر زمان‌های یاد شده، در زمان حداکثر رشد (کد GS35 زادوکس) نیز نمونه‌برداری تصادفی انجام گرفت. نمونه‌برداری برگ پرچم از تعداد ده برگ پرچم قطع شده به طور تصادفی در هر تکرار انجام شد و پس از آن مقدار مورد نیاز برای هر اندازه‌گیری یا سنجش توزین گردید. در مورد سایر برگ‌ها، در هر تکرار ده بوته تصادفی انتخاب و کلیه برگ‌ها به جز برگ پرچم برداشت و برای هر اندازه‌گیری یا سنجش مقدار مورد نیاز استحصال گردید.

### اندازه‌گیری کلروفیل

به منظور اندازه‌گیری میزان کلروفیل از روش پورا و همکاران

**میزان CO<sub>2</sub> خالص تثبیت شده**

۷۰٪ در غلظت 2µg/µl در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

برای اندازه‌گیری دی‌اکسیدکربن تثبیت شده از دستگاه قابل حمل آنالیزر مادون قرمز (Ciras-1, System, UK) استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها روی برگ گیاه انجام شد. میزان غلظت مینا در سطح ۳۶۰ میکرولیتر بر لیتر با پاشیدن CO<sub>2</sub> خالص به همراه هوا تنظیم گردید. هم‌چنین شدت جریان هوا به مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه در رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد تنظیم شد. دمای داخلی اتاقک حدود ۲۵±۱ درجه سلسیوس بود. با نصب لامپ هالوژن خارج از پنجره اتاقک دستگاه، با رسم منحنی استاندارد اشباع نوری در دامنه صفر تا ۲۰۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه، مقدار تثبیت CO<sub>2</sub> خالص استاندارد و برحسب واحد میکرو مول CO<sub>2</sub> بر مترمربع بر ثانیه تنظیم گردید.

**هیبریداسیون RNA با کاوشگر DNA نشان‌دار فسفر رادیو اکتیو (آنالیز نورتون بلات)**

در ابتدا انتقال RNA به ژل آگارز و الکتروفورز آن انجام شد. پس از حذف قسمت‌های اضافی ژل، RNA به غشای نایلونی Hybond N+ (Amersham) با افزودن NaOH ۰/۰۵ مولار در مدت حداقل ۱۰ ساعت منتقل گردید. به منظور انجام هیبریداسیون، ابتدا کاوشگر کلون‌های مورد مطالعه (جدول ۱) به وسیله ستون سفارز خالص‌سازی شد. کاوشگر تک رشته را در محیط بافری به غشاء حامل RNA افزوده و به مدت یک شب در شیکر ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. غشا را با محلول 0.2×SSC/1%SDS شستشو و پس از خشک کردن در کاست فیلم x-ray در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کرده و سپس ظاهر گردید.

**پارامترهای فلورسانس کلروفیل**

پارامترهای نسبت Fv/Fm با استفاده از دستگاه قابل حمل فلومتر (PAM-2000, Walz, Germany) و برنامه نرم‌افزار DA-2000 walz براساس روش کروس و وایس (۱۸) محاسبه گردید.

**نتایج و بحث****عملکرد دانه**

میزان عملکرد دانه در شرایط حذف کامل برگ پرچم (۸۰۰ گرم در مترمربع) در مقایسه با وضعیت طبیعی رشد (۹۹۰ گرم در مترمربع) کمتر بود. برحسب انتظار، تفاوت بسیار معنی‌داری بین مقدار عملکرد دانه در شرایط مذکور حاصل گردید. این موضوع که نشان‌دهنده نقش مؤثر برگ پرچم در ماده‌سازی است توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (۱۵ و ۱۷).

**میزان کلروفیل**

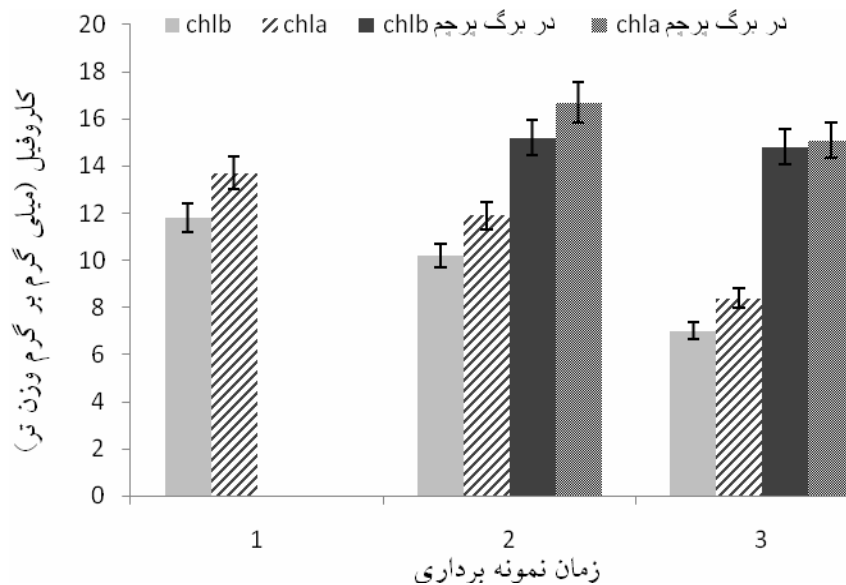
متوسط مقادیر کلروفیل در برگ پرچم و سایر برگ‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان تغییرات کلروفیل طی مراحل نمونه‌برداری روند کاهشی نشان داد. این مسأله در مورد سایر برگ‌ها شدت بیشتری داشت. مقدار کلروفیل a در تمام نمونه‌ها بیشتر از مقدار متناظر کلروفیل b بود. این مسأله ممکن است به

**استخراج RNA**

مقدار ۳ گرم نمونه منجمد برگ در نیتروژن مایع هموژنیزه گردید. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر فنل و ۱۵ میلی‌لیتر بافر (100\_mM\_Trис-HCl\_pH\_9, 200 mM NaCl, 5 mM Dithiotheitol, 1% (w/v), 20mM\_EDTA) افزوده شد. سپس سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مایع بالای لوله به آرامی جمع‌آوری و با افزودن مقدار مساوی کلروفرم عمل سانتریفیوژ ۲ تا ۳ بار به همین ترتیب تکرار گردید. مقدار ۰/۳۳ حجم لیتیوم کلراید ۸ مولار افزوده و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت یک شب قرار گرفت. استخراج RNA با انجام سانتریفیوژ لوله‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس ادامه یافت. پس از شستشوی RNA استخراجی با اتانول

جدول ۱. لیست ژن‌های کلون شده مورد استفاده و اطلاعات مربوطه

منبع	نقش و فعالیت	نام اختصاری کلون
Mackerness <i>et al.</i> , 1999	ژن فتوسنتزی کدکننده آنزیم روبیسکو	RBCS
Escoubas <i>et al.</i> , 1995	ژن فتوسنتزی کدکننده کمپلکس پروتئین فعال در فتوسیستم II	LhcII
Escoubas <i>et al.</i> , 1995	ژن فتوسنتزی کنترل انرژی نوری	Cab
Navabpour <i>et al.</i> , 2003	ژن متالوتاینین واجد نقش هموستاتیک آنتی اکسیدانی	MTI
Buchanan Wollaston <i>et al.</i> , 1997	ژن کاتالاز کنترل کننده میزان $H_2O_2$	CATI
Mackerness <i>et al.</i> , 1999	ژن سوپر اکسید دیسموتاز کنترل کننده میزان یون سوپر اکسید	SODI
Noh and Amasino, 1999	ژن اختصاصی پیری کدکننده سیستمین پروتئاز	SAG12



شکل ۱. میزان کلروفیل a و b در برگ پرچم و سایر برگ‌ها طی زمان‌های نمونه برداری شامل: ۱. حداکثر رشد رویشی سایر برگ‌ها (کد GS35 زادوکس)، ۲. ظهور کامل برگ پرچم (کد GS39 زادوکس) و ۳. پرشدن دانه (کد GS71 زادوکس) است. میزان کلروفیل برگ پرچم در نمونه‌های مراحل ۲ و ۳ اندازه‌گیری شد. محاسبه میانگین‌ها در هر مرحله از ۴ نمونه تصادفی برگ انجام شد. مقدار خطای معیار برای هر میانگین در شکل نشان داده شده است.

معنی‌داری نسبت به سایر برگ‌ها نشان داد. این مسأله می‌تواند توجیه فیزیولوژیک خوبی از نقش ارزنده برگ پرچم در تولید ماده فتوسنتزی در زمان پرشدن دانه را فراهم آورد (۱۷). هم‌چنین نزدیک بودن مقادیر کلروفیل a و b، با توجه به نقش آنها در سیستم فتوسنتزی I و II، درخور توجه است (۲).

دلیل تجزیه سریع‌تر کلروفیل b و یا تبدیل کلروفیل b به a باشد. اگرچه ساز و کار فیزیولوژیک چرخه تبدیل کلروفیل a و b کاملاً مشخص نیست (۳۵) ولی دو مکانیزم شیمیایی و آنزیمی در این ارتباط معرفی شده‌اند (۱۶). مقادیر کلروفیل a و b، به خصوص در مراحل پایانی رشد، در برگ پرچم برتری

میزان تثبیت  $CO_2$ 

میزان تثبیت  $CO_2$  خالص و شاخص  $Fv/Fm$  برگ پرچم و سایر برگ‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان تثبیت  $CO_2$  خالص در برگ پرچم بیشتر از مقدار مربوطه در سایر برگ‌ها بود و روند کاهش مقدار آن طی مراحل نمونه‌برداری شدت بیشتری نسبت به برگ پرچم نشان داد. هم‌چنین میزان نسبت  $Fv/Fm$  در برگ پرچم ضمن برتری نسبت به سایر برگ‌ها، ثبات بیشتری طی مراحل پایانی نمونه‌برداری نشان داد. بر این اساس، چنین به نظر می‌رسد که فعالیت فتوسنتزی در برگ پرچم طی فرآیند پیری تداوم بیشتری داشته است. این مسأله که در ارقام با پتانسیل بالای تولید گزارش شده است (۱۹) می‌تواند به دلیل میزان بالای پروتئین  $Lhc$  باشد. وجود این پروتئین در صفحات تیلاکوئید کلروپلاست مانع از بروز اکسیداسیون تشعشع نوری و کنترل تولید سطوح بالای  $ROS$  و به تبع آن جلوگیری از تنش اکسیداتیو می‌گردد (۱۹). بیان بیشتر ژن  $Lhc$  طی زمان‌های نمونه‌برداری در برگ پرچم در مقایسه با سایر برگ‌ها و سطوح نسبی پایین‌تر شاخص سطح اکسیداسیون سلولی ( $TBRAM$ ) مؤید صحت این نتیجه‌گیری می‌باشد. نتایج مشابهی توسط سایر محققین در این خصوص گزارش شده است (۳۷). در عین حال، نتایج مطالعه سبات و همکاران (۳۶) متفاوت بود. این مسأله به دلیل روش بررسی آنها و انجام اندازه‌گیری‌ها در برگ جدا شده از گیاه حاصل شده است. به نظر می‌رسد نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری روی گیاه دقت عمل بیشتری داشته باشد.

شاخص اکسیداسیون سلولی ( $TBAR$ )

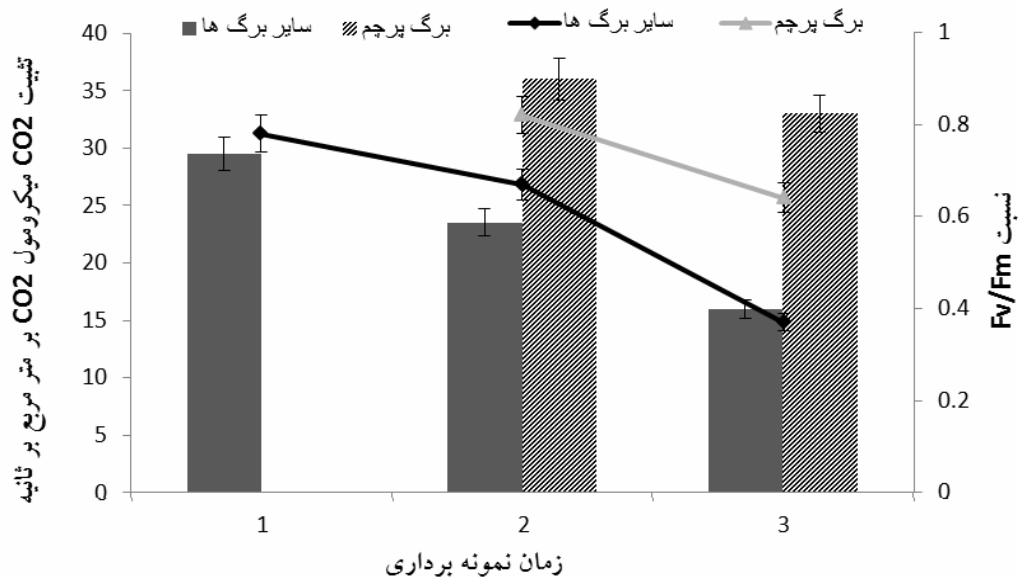
از منظر مولکولی، پیری برگ مرحله‌ای با تشدید فرآیندهای اکسیداتیو است که طی آن فراوانی رادیکال‌های فعال اکسیژن بالا می‌رود (۲۸). تعداد این رادیکال‌ها زیاد است و عموماً طول عمر کوتاهی در حد اعشار ثانیه دارند. از

طرفی، در واکنش تبادلی مرتباً به یکدیگر تبدیل می‌شوند. از این رو، اندازه‌گیری مستقیم آنها توسط کیت‌های پرهزینه اگر چه میسر است ولی برخی اوقات به دلیل پیچیدگی کاربرد، این روش‌ها دقت کافی را ندارند (۱۴). در این ارتباط، استفاده از سنجش  $TBRAM$  ضمن سهولت نسبی انجام آن، دقت قابل توجهی داشته و در مطالعات زیادی مد نظر قرار گرفته است (۷ و ۳۲). نتایج سنجش  $TBRAM$  در این مطالعه در شکل ۳ نشان داده شده است. میزان شاخص  $TBRAM$  در برگ پرچم طی دو مرحله نمونه‌برداری تفاوت چشمگیری نشان نداد، در حالی که در مورد سایر برگ‌ها با پیشرفت روند پیری برگ افزایش معنی‌داری در مقدار  $TBRAM$  حاصل شد. به نظر می‌رسد که ثبات بیان نسبی ژن‌های پاد اکسیدان طی مراحل نمونه‌برداری در برگ پرچم در مقایسه با سایر برگ‌ها (شکل ۴) دلیل موجهی در این ارتباط باشد. همبستگی منفی و معنی‌دار ( $-0.76$ ) بین مقادیر  $TBRAM$  و میزان کلروفیل به دست آمد.

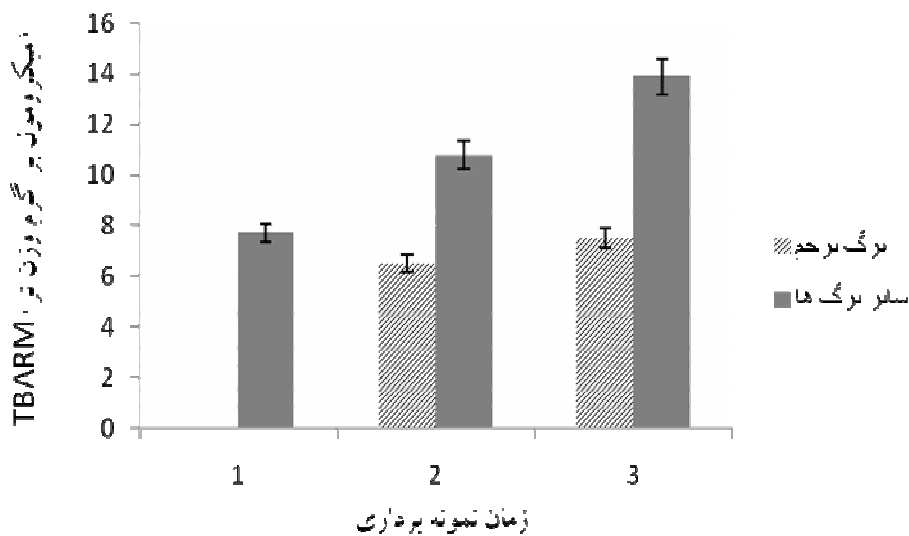
به طور مشابهی، همبستگی منفی و معنی‌داری نیز بین  $TBRAM$  و میزان تثبیت  $CO_2$  ( $-0.68$ ) ملاحظه شد. بالا بودن شاخص  $TBRAM$  مبین فراوانی رادیکال‌های فعال اکسیژن و شدت فرآیندهای اکسیداتیو است. اصولاً غلظت‌های زیاد رادیکال‌های مزبور در اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها نقش دارند (۱۱). در حالی که سطوح متعادل این رادیکال‌ها در القای سازگاری نسبی سلول‌ها برای ایجاد تداوم فعالیت‌های حیاتی سلولی واجد اهمیت زیادی است (۲۰). بر این اساس، و با توجه به نتایج این مطالعه، چنین به نظر می‌رسد که تداوم روند فعالیت‌های سلولی در برگ پرچم در مقایسه با سایر برگ‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بوده است.

## بیان ژن‌ها

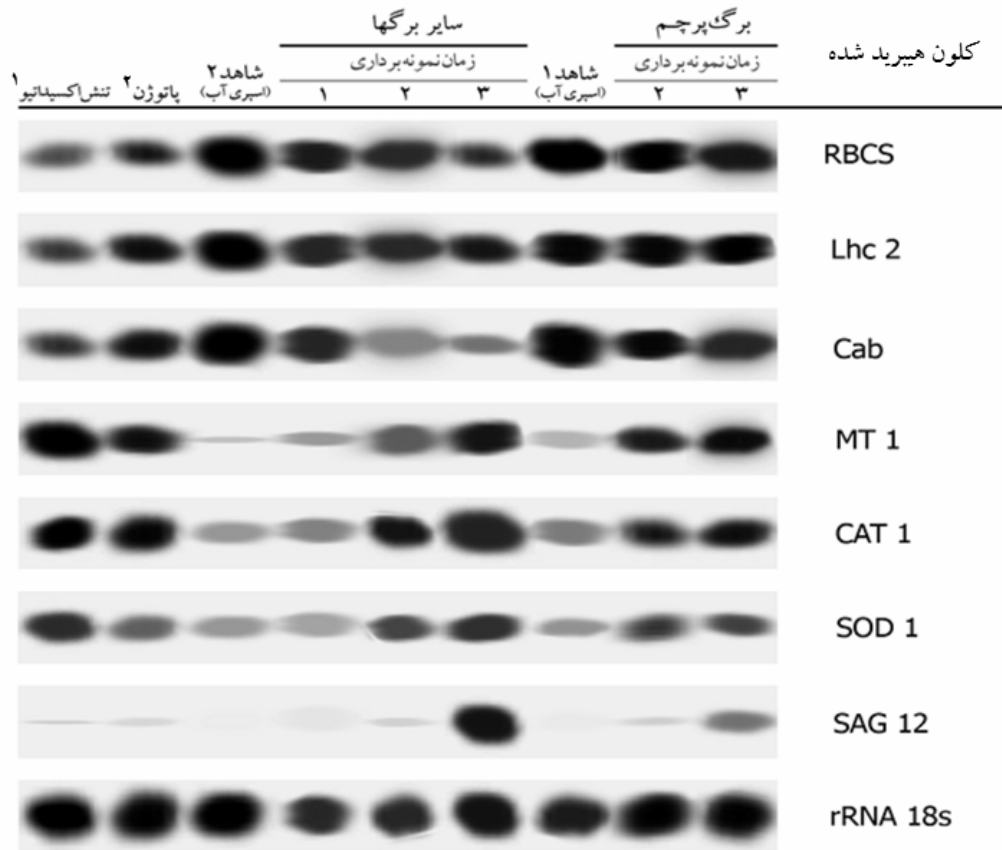
روند بیان ژن‌های فتوسنتزی با اندک تفاوت، شباهت زیادی در



شکل ۲. میزان خالص تثبیت CO<sub>2</sub> و نسبت Fv/Fm در برگ پرچم و سایر برگ‌ها طی زمان‌های نمونه برداری شامل: ۱. حداکثر رشد رویشی سایر برگ‌ها (کد GS35 زادوکس)، ۲. ظهور کامل برگ پرچم (کد GS39 زادوکس) و ۳. پرشدن دانه (کد GS71 زادوکس) است. اندازه‌گیری مقادیر در مورد برگ پرچم در مراحل ۲ و ۳ انجام شد. محاسبه میانگین‌ها در هر مرحله از ۴ نمونه تصادفی برگ انجام شد. مقدار خطای معیار برای هر میانگین در شکل نشان داده شده است.



شکل ۳. میزان شاخص اکسیداسیون سلولی (TBARM) در برگ پرچم و سایر برگ‌ها طی زمان‌های نمونه برداری شامل: ۱. حداکثر رشد رویشی سایر برگ‌ها (کد GS35 زادوکس)، ۲. ظهور کامل برگ پرچم (کد GS39 زادوکس) و ۳. پرشدن دانه (کد GS71 زادوکس) است. میزان TBARM در مورد برگ پرچم در مراحل ۲ و ۳ انجام شد. محاسبه میانگین‌ها در هر مرحله از ۴ نمونه تصادفی برگ انجام شد. مقدار خطای معیار برای هر میانگین در شکل نشان داده شده است.



شکل ۴. مقایسه روند بیان ژن‌های فتوسنتزی و پیری در برگ پرچم و سایر برگ‌ها در جو زراعی. مراحل نمونه‌برداری شامل: ۱. حداکثر رشد رویشی سایر برگ‌ها (کد GS35 زادوکس)، ۲. ظهور کامل برگ پرچم (کد GS39 زادوکس) و ۳. پر شدن دانه (کد GS71 زادوکس) است. در هر مرحله استخراج RNA برگ انجام و با انتقال به غشای حساس با کلون‌های فوق هیبرید گردید. با انتقال غشا به کاست رادیوگرافی و ظهور فیلم رادیوگرافی، نتایج به صورت فوق مرتب شد. شاهد ۱ و ۲: به ترتیب شامل محلول پاشی آب بر برگ پرچم و سایر برگ‌ها. ۱. تنش اکسیداتیو با محلول پاشی نیترات نقره با غلظت ۱ میلی‌مولار اعمال و نمونه‌برداری ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی انجام شد. ۲. پاتوزن مورد استفاده ایزوله سازگار 2 *Ahco* (*peronospora parasitica*) بود. نمونه‌برداری ۵ روز پس از آلودگی (اسپورپاشی برگ) انجام شد. به منظور حصول اطمینان از میزان بارگیری برابر در هر چاهک از rRNA 18s استفاده شد.

پیری داشته باشد (۲۵). میزان کاهش این ژن‌ها در برگ پرچم به طور قابل توجهی کمتر بود که با نتایج حاصله در مورد مقادیر کلروفیل، تثبیت  $CO_2$  و نسبت Fv/Fm مطابقت دارد (شکل‌های ۱ و ۲). هم‌چنین افت میزان نسخه‌برداری ژن‌های مزبور تحت تأثیر عامل بیماری‌زا نیز چندان زیاد نبود. از اینرو امکان تفاوت مسیر ژنتیکی بیان آنها محتمل به نظر می‌رسد (۶). ژن MT1 کدکننده پروتئین متالوتاینین است. این پروتئین با

نمونه‌های مختلف نشان دادند (شکل ۴). در مورد هر سه ژن فتوسنتزی RBCS، LhcII و Cab کاهش محسوسی در میزان نسخه‌برداری تحت تأثیر تنش اکسیداتیو ناشی از محلول پاشی نیترات نقره دیده شد. این روند کاهش بیان ژن‌های مزبور با پیشرفت پیری برگ طی مراحل نمونه‌برداری در سایر برگ‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای دیده شد. این مسأله می‌تواند دلالت بر مسیر مشترک بیان این ژن‌ها طی تنش اکسیداتیو و مرحله

بسته شدن روزنه‌ها را تنظیم می‌نماید (۲۹). از این‌رو، بررسی میزان فعالیت CAT1 و در پی آن تنظیم سطح متعادل میزان  $H_2O_2$  اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه، میزان نسخه‌برداری این ژن در شرایط تنش اکسیداتیو نیترات نقره و طی مراحل پیری در سایر برگ‌ها افزایش چشمگیری نشان داد (شکل ۴). این افزایش تحت تأثیر عامل بیماری‌زا نیز ملاحظه شد. بر این اساس، وجود مسیر ژنتیکی مشترک، به ویژه در مقاطع نهایی بیان ژن، محتمل به نظر می‌رسد.

ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD1) کدکننده گروه پروتئین‌های متالوآنزیم است. محصول آنزیمی این ژن توانایی پاک‌سازی یون سوپراکسید را داراست. یون سوپراکسید قابلیت تبدیل به پراکسید هیدروژن را با شدت بالایی دارد (۴). در شرایط پیری سلولی، افزایش غلظت یون سوپراکسید به عنوان اولین حلقه زنجیره رادیکال‌های آزاد رخ می‌دهد (۷). بنابراین نقش ژن SOD1 در کاهش فراوانی یون سوپراکسید و تعدیل غلظت آن به طور مؤثر در تنظیم غلظت متعادل سایر رادیکال‌های فعال، از جمله پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل، مهم خواهد بود (۲۹). این مسأله با توجه به شدت مضاعف فعالیت یون هیدروکسیل و خسارت مستقیم آن به DNA اهمیتی دو چندان دارد (۴). تأثیر سطوح متعادل یون سوپراکسید در فعال نمودن ژن‌های دفاعی نظیر PR1 و PR5 ثابت شده است. از طرفی این یون به عنوان یک مولکول انتقال پیام ثانویه با کنترل میزان تولید پراکسید هیدروژن روند بیان برخی ژن‌های درگیر در فرآیند پیری و فتوستتزی را تعدیل می‌نماید (۲۴). در این مطالعه، میزان بیان ژن SOD1 طی مراحل پیری چندان زیاد نبود. ضمناً اختلاف زیادی بین روند تغییرات نسخه‌برداری در برگ پرچم و سایر برگ‌ها دیده نشد. میزان بیان این ژن تحت تأثیر عامل بیماری‌زا نیز افزایش محسوسی نسبت به شاهد نشان نداد. درحالی که ژن مزبور واکنش مثبت و معنی‌داری به تنش اکسیداتیو ناشی از نیترات نقره نشان داد. براساس این نتایج، به نظر می‌رسد مسیرهای ژنتیکی متفاوتی در بیان این ژن وجود دارد. کلون SAG12 کدکننده پروتئین آنزیمی سیستین پروتئاز

وزن مولکولی کم و غنی از اسید آمینه سیستین نقش مهمی در کنترل یون‌های فلزی سمی دارد (۲۸). در برخی سلول‌های جانوری و قارچ‌ها کنترل بیان این ژن توسط یون‌های فلزی صورت می‌پذیرد. این ژن گروه فامیلی گسترده داشته و ایزوژن‌های زیادی در بین موجودات مختلف دارد. از این‌رو الگوی بیان آن در اندام‌های مختلف تنوع زیادی دارد (۷). نتایج برخی مطالعات حکایت از نقش تعیین‌کننده این ژن در القای مقاومت نسبت به اثر اکسیدانی رادیکال‌های فعال اکسیژن دارد (۲۸). در این مطالعه نیز بیان قابل توجهی برای این ژن در تیمار القای تنش اکسیداتیو نیترات نقره و طی مراحل پیری در سایر برگ‌ها دیده شد (شکل ۴). هم‌چنین نقش این ژن در فرآیند پیری حائز اهمیت است. از مهم‌ترین رخدادها طی فرآیند پیری، انتقال مولکول‌های بزرگ پس از تجزیه از برگ‌های مسن‌تر به اندام‌های ذخیره‌ای و دانه می‌باشد (۵). از طرفی، شواهدی انکارناپذیر دال بر نقش MT1 در کمک به دوام و بقای سلول‌های برگ به منظور انتقال کامل مواد پروتئینی و ذخیره‌ای به دانه وجود دارد (۶ و ۲۸). این موضوع می‌تواند دلیل موجهی در تحلیل بیان بالای میزان نسخه‌برداری این ژن در نمونه‌های برگ پرچم باشد.

ژن CAT1 کدکننده آنزیم کاتالاز، و واجد نقش آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این ژن با پاک‌سازی رادیکال پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) نقش مهمی در تنظیم غلظت  $H_2O_2$  دارد. اگرچه غلظت زیاد پراکسید هیدروژن منجر به بروز تنش اکسیداتیو و خسارت‌های سلولی می‌گردد، ولی براساس نتایج برخی مطالعات، تأثیر غلظت‌های متعادل  $H_2O_2$  به عنوان یک فاکتور انتقال پیام در بیان ژن‌ها و تنظیم فعالیت‌های سلول گزارش شده است (۲۴، ۲۸ و ۳۳). از آن جمله، پراکسید هیدروژن در تشکیل دیواره لیگنینی سلول‌های گیاهی نقش مهمی دارد (۲۱). هم‌چنین این رادیکال در بیان ژن‌های مسیر تولید هورمون‌های اتیلن، اسید جازمونیک و اسید سالسیلیک نقش مهمی ایفا می‌کند (۲۳). پراکسید هیدروژن با افزایش فعالیت مسیر متابولیک آنزیم MAP کیناز الگوی زمان‌بندی باز و

صفات فیزیولوژیک و بیان ژن‌های مهم فتوسنتزی و پیری برگ بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان تغییرات کلروفیل طی مراحل نمونه برداری روند کاهشی داشت. میزان تثبیت  $CO_2$  خالص در برگ پرچم بیشتر بود و ثبات بیشتری نیز طی مراحل نمونه برداری نسبت به سایر برگ‌ها داشت. میزان شاخص سطح اکسیداسیونی سلولی در خلال مراحل پیری برگ به سرعت زیاد شد. بیان ژن‌های فتوسنتزی RCBS، LhcII و Cab شباهت نسبی زیادی داشتند و با پیشرفت پیری برگ به طور قابل توجهی کاهش یافتند. الگوی بیان ژن‌های پیری MTI و CATI شباهت زیاد و ژن‌های SODI و SAG12 تفاوت داشتند. به‌طورکلی، نتایج مبین نقش مهم برگ پرچم در افزایش تولید دانه جو بود. این مسئله با توجه به تداوم فتوسنتز، میزان کلروفیل و سرعت نسبی کمتر بروز تنش اکسیداتیو طی روند پیری در برگ پرچم، در مقایسه با سایر برگ‌ها، توجیه‌پذیر بود. ضمناً، فعالیت ژن‌های فتوسنتزی و ژن‌های واجد نقش هموستاتیک در خلال پیری بیان ممتازی در برگ پرچم نشان دادند.

می‌باشد که نقش آن شکستن زنجیره پلی پپتیدی پروتئین‌های بزرگ و تجزیه آنها به اسیدهای آمینه است. اصولاً انتقال مواد ذخیره‌ای (مولکول‌های بزرگ) تنها از طریق تجزیه و تفکیک آنها به اجزای کوچک‌تر امکان‌پذیر می‌باشد (۲۵). اهمیت این مسئله در خلال فرآیند پیری با توجه به ضرورت انتقال مولکول‌های بزرگ قبل از نکرور و مرگ سلولی بسیار زیاد است (۲۷). در این تحقیق بیان ژن SAG12 تنها در مرحله نهایی پیری در سایر برگ‌ها چشمگیر بود. این موضوع در سایر مطالعات نیز گزارش شده است و بر این اساس این کلون جزو ژن‌های اختصاصی پیری معرفی شده است (۵، ۲۷ و ۲۸). از نتایج درخور توجه، میزان بیان این ژن در مرحله پر شدن دانه در برگ پرچم بود. از آنجا که ژن SAG12 در مرحله نهایی پیری بیان می‌شود، به نظر می‌رسد برگ پرچم تداوم بیشتری در ادامه ماده‌سازی را داراست. بیان بالای نسبی کلون‌های MTI، cab، LhcII و RBCS مؤید این موضوع می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

اهمیت برگ پرچم در جو زراعی (وارسته هوردا) از نظر برخی

## منابع مورد استفاده

1. Arzani, A. 1378. Breeding Field Crops. Isfahan University of Technology Press, 606 p. (In Farsi).
2. Basaga, H. S. 1989. Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry and Cell Biology* 68: 989-998.
3. Baum, M., S. Grando, G. Backes, A. Jahoor, A. Sabbagh and S. Ceccarelli. 2003. QTLs for agronomic traits in the Mediterranean environment identified in recombinant inbred lines of the cross 'Arta'×*H. spontaneum* 41-1. *Theoretical and Applied Genetics* 107(7): 1215-1225.
4. Bowler, C., M. Van Montagu and D. Inze. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.
5. Buchanan-Wollaston, V. and C. Ainsworth. 1997. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. *Plant Molecular Biology* 33: 821-834.
6. Butt, A., K. Mousley, K. Morris, J. Beynon, C. Can, E. Holub, J. T. Greenberg and V. Buchanan-Wollaston. 1998. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* 16(2): 209-221.
7. Choi, H. W., Y. J. Kim, S. C. Lee, J. K. Hong and B. K. Hwang. 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO<sub>2</sub> activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology* 145: 890-904.
8. Dat, J., E. Vandenabeele, M. Vranova, M. Van Montagu, D. Inze and F. Van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Molecular Life Science* 57: 779-795.
9. Escoubas, P., L. Lajide and J. Mizutani. 1995. Termite antifeedant activity in *Aframomum melegueta*. *Phytochemistry* 40: 1097-1099.
10. FAO. 2005. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/>.
11. Golden, T. A., D. Hinerfeld and S. Melov. 2002. Oxidative stress and aging: Beyond correlation. *Aging Cell* 1: 117-123.

12. Hagege, D., A. Nouvelot, J. Boucard and T. Gaspar. 1990. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: Avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis* 1: 86-89.
13. Hirota, O., M. Oka and T. Takeda. 1990. Sink activity estimation by sink size and dry matter increase during the ripening stage of barley (*Hordeum vulgare*) and rice (*Oryza sativa*). *Annals of Botany* 65(4): 349-354.
14. Hodges, D. M., J. M. Delong, C. F. Forney and R. K. Prange. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.
15. Humbeck, K., S. Quast and K. Krupinska. 1996. Function and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell and Environment* 19: 337-344.
16. Ito, H., T. Ohtsuka and A. Tanaka. 1996. Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 1475-1479.
17. Jukanti, A., N. Heidlebaugh, D. Parrott, I. Fischer, K. McInnerney and A. Fischer. 2008. Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *New Phytologist* 77: 333-349.
18. Krause, G.H. and E. Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
19. Krupinska, K., M. Mulisch, J. Hollmann, K. Tokarz, W. Zschiesche, H. Kage, K. Humbeck and W. Bilger. 2011. An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during leaf senescence observed in a high-yield variety of barley. *Physiologia Plantarum* 118(2): 189-200.
20. Larkindale, J. D., J. R. Hall, M. Knight and E. Vierling. 2005. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermo tolerance. *Plant Physiology* 138: 882-897.
21. Lewis, N. G. and E. Yamamoto. 1990. Lignin-occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 455-496.
22. Li, Z., S. R. M. Pinson, J. W. Stansel and A. H. Paterson. 1998. Genetic dissection of the source-sink relationship affecting fecundity and yield in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding* 4(5):419-426.
23. Mackerness, S.A.H. 2000. Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280-320 nm) stress. What are the key regulators? *Plant Growth Regulators Journal* 32: 27-39.
24. Mackerness, S. A. H., B. R. Jordan and B. Thomas. 1999. Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet-B radiation (UV-B: 280-320 nm) in green and etiolated buds of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology* 48: 180-188.
25. Mackerness, S. A. H., C. F. John, B. Jordan and B. Thomas. 2001. Early signaling components in ultraviolet-B responses: Distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters* 489: 237-242.
26. Munné-Bosch, S. and L. Alegre. 2004. Die and let live: Leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31: 203-216.
27. Navabpour, S. and M. B. Bagherieh Najjar. 2008. Molecular and biochemical analysis of oxidative stress and UV-B radiation in Brassica napus. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources* 15(5): 23-33.
28. Navabpour, S., K. Morris, E. Harrison, S. Makerness and V. Buchanan-Wollaston. 2003. Expression of senescence enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 54: 2285-2292.
29. Neill, S. J., R. Desikan, A. Clarke, R. Hurst and J. T. Hancock. 2001. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 9-17.
30. Noh, Y. S. and R. M. Amasino. 1999. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology* 41: 181-194.
31. Orozco-Cardenas, M. L., J. Narvaez-Vasquez and C. A. Ryan. 2001. Hydrogen peroxide acts as a sound messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13: 179-191.
32. Page, T., G. Griffiths and V. Buchanan-Wollaston. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiology* 125: 718-727.
33. Pitzschke, A., C. Forzani and H. Hirt. 2006. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidative Redox Signal* 8: 1757-1764.
34. Porra, R. J. 1997. Recent progress in porphyrin and chlorophyll biosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* 65: 492-516.
35. Porra, R. J., W.A. Thompson and P.E. Kriedmann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochemistry and Biophysics Acta* 975: 384-394.

36. Sabat, S. C., A. Grover and P. Mohanti. 1989. Senescence induced alternations in the electron transport chain in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf chloroplasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 3: 175-183.
37. Saito, A., T. Iino, K. Sonoike, E. Miwa and K. Higuchi. 2010. Remodeling of the major light-harvesting antenna protein of PSII protects the young leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) from photoinhibition under prolonged iron deficiency. *Plant Cell Physiology* 51(12): 2013-2030.
38. Scharrenberg, C., J. Falk, S. Quast, K. Haussühl and K. Humbeck. 2003. Isolation of senescence-related cDNAs from flag leaves of field grown barley plants. *Physiologia Plantarum* 118(2): 278-288.
39. Zheng, T. 1999. Effects of some photosynthetic organs on milking and grain yield of barley. *Barley Science* 1: 21-22.