

ارزیابی صفات بیوشیمیایی و بیان برخی ژن‌ها در ارقام هیبرید ذرت تحت شرایط تنش خشکی

فاطمه صحرائی قمش^۱، سعید نواب پور^۲، احد یامچی^۲ و ابوالفضل مازندرانی^۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۹

چکیده

ذرت باتوجه به تامین غذای انسان از جایگاه ویژه‌ای در بین گیاهان زراعی برخوردار است. پژوهشگران دریافته‌اند که خشکی رابطه مستقیمی با محدودیت توسعه کشت و تولید ذرت در دنیا دارد. تنش خشکی عامل کاهش ۱۷ درصدی عملکرد سالانه ذرت دانه‌ای در جهان است. این مطالعه به منظور ارزیابی اثر تنش خشکی بر بیان برخی ژن‌ها و صفات بیوشیمیایی مرتبط با تحمل به خشکی در ارقام ذرت تحت شرایط مزرعه‌ای صورت گرفت. آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اصلی، تنش خشکی در سه سطح شامل تبخیر از تشتک کلاس A با مقدار 75 ± 5 میلی‌متر (شرایط نرمال به عنوان شاهد)، 115 ± 5 میلی‌متر (تنش متوسط) و 140 ± 5 میلی‌متر (تنش شدید) و فاکتور فرعی شامل سه هیبرید ذرت (هیبرید دیررس کارون، هیبرید دیررس ۷۰۴ و هیبرید متوسط‌رس مبین) بود. صفات مورد ارزیابی نیز شامل مقادیر آبسزیک اسید و ایندول استیک اسید و میزان بیان ژن‌های *ZmPR10* و *ZmFER1*، *MIPS* بود. نمونه‌برداری در سه مرحله چهار برگی، گرده‌افشانی و ۱۰ روز بعد از گرده‌افشانی صورت گرفت. نتایج نشان داد که هیبرید کارون اختلاف معنی‌داری با سایر ارقام از لحاظ محتوای آبسزیک اسید و ایندول استیک اسید (به ترتیب ۳۴۵ و ۴۶۸ نانوگرم بر گرم وزن تر) تحت شرایط تنش شدید و ده روز بعد از گرده‌افشانی داشت و تحمل بیشتری نسبت به تنش خشکی نشان داد. ارزیابی ژن‌های *ZmPR10* و *ZmFER1*، *MIPS* نیز نشان داد که در بین هیبریدهای مورد مطالعه، هیبرید کارون بیان ژن بیشتری نسبت به شاهد در سطوح مختلف تنش و تقریباً در تمام مراحل مورد اندازه‌گیری داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که محتوای بیش‌تر هورمون‌های آبسزیک اسید و ایندول استیک اسید و نیز بیان بالاتر ژن‌های مورد مطالعه در القای تحمل به تنش خشکی مؤثر است و در بین هیبریدهای مورد مطالعه نیز هیبرید کارون با داشتن محتوای بالاتر این هورمون‌ها و بیان بالاتر ژن‌ها نسبت به سایر ارقام، از تحمل بالاتری نسبت به تنش خشکی برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: آبسزیک اسید، ایندول استیک اسید، بیان ژن، ذرت، تنش خشکی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- دانش‌آموخته دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

* نویسنده مسئول: s.navabpour@gau.ac.ir

مقدمه

و پاسخ گیاهان به تنش خشکی می‌تواند به صورت پاسخ کوتاه‌مدت، میان‌مدت و بلندمدت طبقه‌بندی شود. پاسخ کوتاه‌مدت به تنش کم آبی با کاهش حداکثر جذب CO_2 همراه است. از جمله واکنش‌های میان‌مدت به خشکی تنظیم اسمزی با واسطه تجمع نمک (پمپ‌های سدیم-پتاسیمی غشا) و پاسخ بلندمدت شامل الگوی ژنتیکی و بیان ژن‌ها می‌باشد (Zaltev and Lidon, 2012). بهبود ژنتیکی در تحمل به کمبود آب در ذرت بخش مهمی از راه حل برای تثبیت عملکرد ذرت و هدف بسیاری از برنامه‌های تحقیقاتی است (Wang et al., 2011). جیانگ و همکاران (Jiang et al., 2011) بیان داشتند بیان ژن‌های *ZmPR10*، *ZmFer1*، *MIPS* در ذرت تحت تنش خشکی افزایش یافت که بیانگر نقش آن‌ها در تحمل به خشکی بود. هدف از این پژوهش بررسی ارقام هیبرید ذرت دیررس و متوسط‌رس از نظر فعالیت صفات بیوشیمیایی و بیان برخی ژن‌های فعال در واکنش به تنش خشکی می‌باشد که در نتیجه می‌توان این ارقام را برای کشاورزان پیشنهاد داد و نیز از آن‌ها در پیشرفت نسل‌ها و پژوهش‌های آینده استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

آزمایش به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط مزرعه تحقیقاتی (شهرستان کردکوی) در سال ۱۴۰۰ اجرا شد. فاکتور اصلی تنش خشکی در سه سطح شامل 5 ± 7.5 میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A (تیمار بدون تنش یا شاهد (Control)، آبیاری پس از 11.5 ± 5 میلی‌متر تبخیر (تنش متوسط) و آبیاری پس از 14.0 ± 5 میلی‌متر تبخیر (تنش شدید) و فاکتور فرعی هیبریدهای ذرت شامل هیبرید دیررس ۷۰۴ (SC 704)، هیبرید دیررس کارون (Karoon) و هیبرید متوسط‌رس مبین (Mobin) بود. هر کرت شامل ۶ ردیف کشت به فاصله ۷۵ سانتی‌متر و طول ۶ متر بود و فاصله بین کرت‌ها ۱/۵ متر در نظر گرفته شد. فاصله بین بذرها ۱۸ سانتی‌متر (تراکم 75.000 بوته در هکتار) بود و تنش خشکی از ابتدای فصل کاشت اعمال شد. نمونه‌برداری در سه مرحله ۴ برگی، گرده‌افشانی و ۱۰ روز بعد از گرده‌افشانی انجام شد. صفات مورد ارزیابی مقدار آبسزیک اسید (ABA)، ایندول استیک اسید (IAA) و بیان ژن‌های *ZmFER1*، *MIPS* و *ZmPR10* بودند. حدود یک گرم نمونه برگ در تیمارهای

ذرت (*Zea mays* L.) یک محصول اصلی مهم در سراسر جهان است. در میان بسیاری از عوامل محدود کننده تولید، تنش کمبود آب مهمترین عامل محدود کننده محیطی رشد و عملکرد ذرت است (Su et al., 2011). در مناطق گرمسیری به دلیل بروز تنش خشکی عملکرد دانه ذرت به طور متوسط در حدود ۱۷ درصد کاهش می‌یابد، اما بسته به شدت تنش و زمان وقوع آن، کاهش عملکرد می‌تواند به ۸۰ درصد هم برسد (Ribaut et al., 2012). خشکی عامل محدودکننده تولید محصولات زراعی در سرتاسر جهان می‌باشد. زمان وقوع تنش خشکی، مرحله رشد گیاه، رقم، روش کشت، کیفیت خاک و تغییرات شرایط محیطی مؤثر بر تنش خشکی و عملکرد ذرت هستند. عموماً ارقام ذرت در واکنش به خشکی متفاوت عمل می‌کنند. آبسزیک اسید یک هورمون گیاهی است، که در بازدارندگی رشد گیاهان مؤثر و نسبت به سایر بازدارنده گیاهی قوی‌تر می‌باشد. این هورمون فرآیندهای رکود بذرها، جوانه‌ها و نیز ریزش اندام‌ها را کنترل می‌نماید (Fujii et al., 2009). تنش‌های محیطی مانند خشکی، باعث بسته شدن روزنه‌ها در برگ و همچنین در ریشه به عنوان یک سیگنال برای سلول‌های نگهبان روزنه عمل کرده و موجب بسته شدن روزنه‌ها می‌گردد؛ در نتیجه فرایند جذب دی اکسید کربن با محدودیت مواجه شده و فتوسنتز کاهش پیدا می‌کند. موارد ذکر شده برخی از دلایلی هستند که نشان می‌دهند که چرا خشکی باعث کاهش محصول می‌شود (Jiang and Zhang, 2002). به‌طور کلی عقیده بر این است که هورمون‌های گیاهی از قبیل اسید ایندول-۳-استیک (IAA)، اسیدآبسزیک (ABA)، زئاتین ریبوزید (ZR) و جیبرلین (GA) ارتباط نزدیکی با نمو دانه دارند که از طریق وساطت در تقسیم و بزرگ شدن سلول‌های آندوسپرم و یا کنترل ورود و خروج مواد پرورده به دانه، اندازه مخزن را تعیین می‌کنند (Hansen and Grossmann, 2000). هورمون ABA نقش مهمی در سازگاری به تنش آب در انواع مختلف تنش ایفا و بقای گیاه را با تغییر دادن فیزیولوژی و رشد تضمین می‌کند (Zhang et al., 2016). اعتقاد بر این است که ABA تنظیم کننده اصلی فرایند پیری و انتقال مجدد مواد فتوسنتزی به دانه است (Yang et al., 2013). واکنش گیاهان به تنش خشکی به ماهیت کمبود آب وابسته است

در بیان فعالیت ژن‌های مورد مطالعه از روش ارزیابی نسبی استفاده شد (Bustin, 2000). در این روش میزان افزایش یا کاهش بیان ژن در هر تیمار نسبت به تیمار کنترل (شاهد) به صورت نسبت بیان می‌شود که در این حالت امکان اندازه‌گیری میزان بیان ژن در تیمار کنترل وجود ندارد و به عبارتی یک در نظر گرفته می‌شود. بنابراین بیان نسبی ژن‌ها از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه و هر تیمار با گیاهان کنترل مربوط به زمان خود مقایسه شد. برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار REST استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان هورمون‌های آبسزیک اسید و ایندول استیک اسید

استخراج هورمون آبسزیک به روش یوکوتا و همکاران (Yokota *et al.*, 1994) انجام و میزان غلظت هورمون با استفاده از دتکتور UV/VIS در طول موج ۲۵۷ نانومتر تعیین شد. برای استخراج ایندول استیک اسید نیز از روش دوبرف (Dobrev, 2005) استفاده شد.

مختلف برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها برداشت شد و در نیتروژن مایع منجمد و تا مرحله استخراج RNA در فریزر منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شد.

ارزیابی بیان ژن‌ها

مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. استخراج RNA توسط کیت بایوزول (شرکت بایوفلکس ژاپن) از نمونه‌های برگ منجمد، صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شد. برای ساخت cDNA، از روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد که در آن از آنزیم DNase1 برای از بین بردن آلودگی DNA استفاده شد. برای تایید سنتز cDNA از روش PCR و الکتروفورز روی ژل دو درصد آگارز استفاده شد. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌ها از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و سایبر گرین استفاده شد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار بتا اکتینین که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها بود، استفاده شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش

Table 1. Primers sequences used in this experiment

Primer name	Access number	Primer sequence	Melting temperature °C	Sequence length
ZmPR10	AC215303	F: 5' CACCTCAGTCATGCCGTTCA 3' R: 3' CCCTCGATGAGCGTGTCTT 5'	60	159
ZmFER1	S108423	F: 5' GGCACCTTCGATCAGATGCTGC 3' R: 3' CCCAGAGTTGTCAGTTGACCC 5'	60	94
MIPS	AF056326	F: 5' CCCAAGTCCGTCGAAGTACAAC 3' R: 3' CCCTGTTGGCAATGACCCAG 5'	60	165
β ACT	J01238	F: 5' TGTCCATCACTTGTGAAGCCTCCT 3' R: 3' ACGACCTTAGCCAATATCGCACCA 5'	63	135

کاهش گشودگی روزنه‌ها کاهش می‌دهد (Katrina and Zeevart, 1986). این امر می‌تواند یکی از دلایل افزایش سطح ABA در هیبرید کارون در سطح تنش شدید خشکی برای کاهش خسارت حاصل از تنش باشد. سلول‌های محافظ روزنه دارای گیرنده ویژه ABA هستند که در لایه بیرونی غشاء پلاسمایی آن‌ها قرار گرفته است (Stewart and Voetberg, 1985). وجود این گیرنده و عمل آن باعث تغییر در باز شدن کانال‌های یونی شده و شیب پروتئینی را فعال می‌نمایند (Hartung, 1983). در واقع بسته شدن روزنه‌ها در پاسخ به عواملی مثل آسزیک

نتایج و بحث

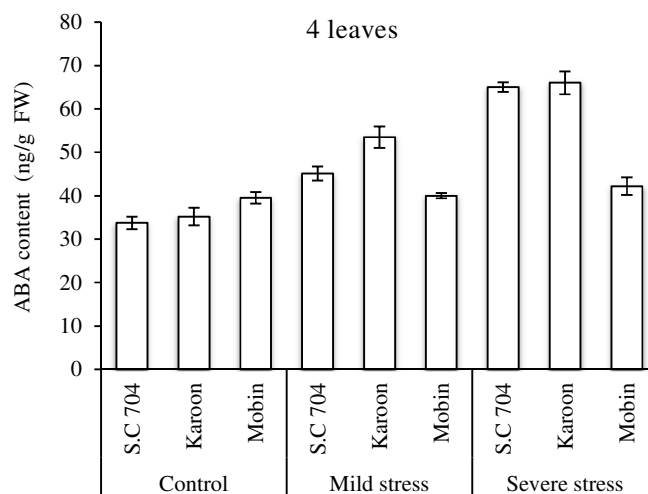
در رابطه با تغییر محتوای آبسزیک اسید تحت تنش خشکی، نتایج نشان داد که میزان آبسزیک تحت تیمار سطوح مختلف تنش خشکی در هیبریدهای مختلف متفاوت بود (شکل ۱). بالاترین میزان آبسزیک اسید در هیبریدهای کارون و سینگل کراس ۷۰۴ در سطح تنش شدید خشکی دیده شد که اختلاف آن با هیبریدهای دیگر در همان سطح تنش و سطوح دیگر تنش معنی‌دار شد. شواهد معتبری وجود دارد که تأیید می‌کنند افزایش غلظت ABA بافت برگ، خروج آب از گیاه را از طریق

بیشترین مقدار آبسزیک اسید را در سطح تنش شدید داشت که اختلاف آن با هیبریدهای دیگر در تمام سطوح معنی‌دار شد. استفاده از مواد تنظیم کننده رشد مانند سالیسیلیک اسید، جیبرلین و آبسزیک اسید و بعضی عناصر غذایی می‌تواند به‌عنوان سازوکار مدیریت زراعی برای کاهش خسارت ناشی از تنش کمبود آب قرار توجه گیرند (Khan, 2006). آبسزیک اسید یکی از عوامل بازدارنده رشد گیاهی می‌باشد که دارای چند نقش فیزیولوژیک مختلف در گیاهان از جمله تحریک خواب جوانه‌ها و دانه‌ها، جدا شدن برگ‌ها و میوه‌ها از گیاه، القای پیری و ایجاد مقاومت در گیاهان تحت تنش است. تحقیقات پژوهش‌گران نشان داده است که دلیل سازگاری گیاهان سیب زمینی، گوجه فرنگی، گندم زمستانه، اسفناج و آرابیدوپسیس نسبت به تنش خشکی، افزایش سطح آبسزیک اسید است (Bray, 1988). کمترین میزان آبسزیک اسید در این پژوهش برای هیبرید مبین در سطح تنش متوسط خشکی طی مرحله ده روز پس از گرده‌افشانی به‌دست آمد (شکل ۳). غلظت‌های ABA در بین قسمت‌های مختلف اندام گیاهی و مراحل نمو در نوسان بوده و به همین خاطر بافت خاص یا مرحله نمو خاصی که بیشترین تأثیر را در افزایش سطح ABA تحت اثر خشکی داشته باشد، تشخیص داده نشده است.

اسید یک راه‌کار اجتناب از خشکی محسوب می‌شود (Alscher and Cumming, 1990).

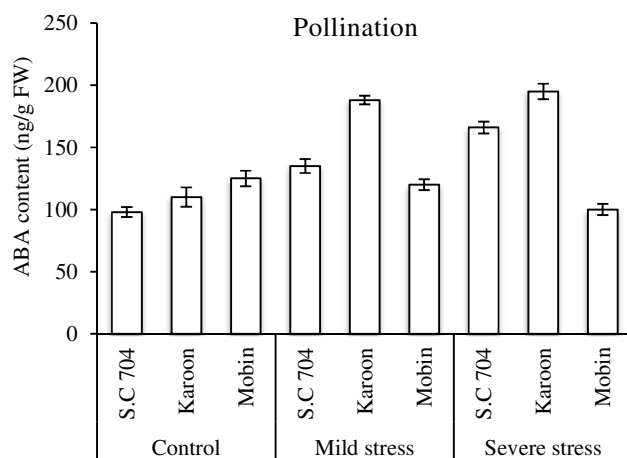
میزان آبسزیک اسید در مرحله گرده‌افشانی طی سطوح مختلف تنش در هیبریدهای مورد مطالعه روند متفاوتی نشان داد (شکل ۲). کمترین مقدار آن در هیبرید مبین طی تنش شدید با مقدار ۱۰۰ نانوگرم بر گرم وزن تر بود و بیشترین مقدار آبسزیک اسید در هیبرید کارون طی سطح تنش شدید در مرحله گرده‌افشانی به‌دست آمد که اختلاف آن با بقیه هیبریدها در سطوح مختلف به‌جز در سطح تنش متوسط برای همین هیبرید معنی‌دار شد. گزارش شده است که افزایش ABA در بافت گیاهی در اثر تنش خشکی می‌تواند بازدارنده رشد باشد که این فرآیند، مکانیسمی برای حفاظت از گیاه در شرایط تنش است (Wang *et al.*, 2018) مطالعات لی و همکاران (Li *et al.*, 2011) نشان داد که تیمار ABA تبدیل اسیدآمینو و تجمع پروتئین و نیز انتقال مجدد ازت را در غلات تسریع می‌کند که منجر به کاهش خسارت حاصل از تنش خشکی می‌شود.

مقدار آبسزیک اسید در هیبریدهای کارون و سینگل کراس ۷۰۴ در مرحله ده روز پس از گرده‌افشانی روند افزایشی نسبت به شاهد در هر دو سطح تنش نشان داد (شکل ۳). هیبرید کارون با ۳۴۵ نانوگرم بر گرم وزن تر

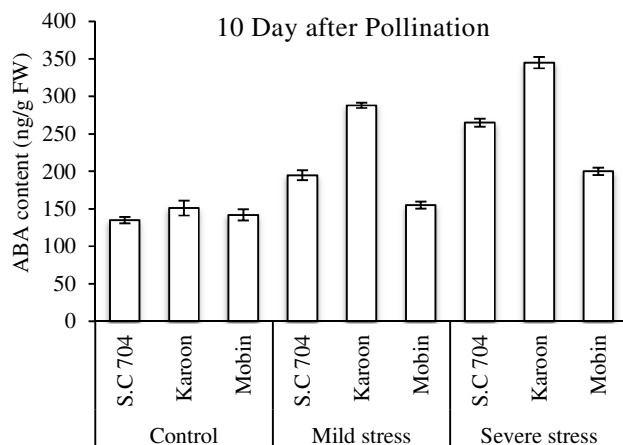


شکل ۱- تغییرات آبسزیک اسید نسبت به تیمار شاهد در هیبریدهای ذرت در مرحله چهار برگگی تحت شرایط تنش خشکی

Figure 1. Abscisic acid changes compared to control treatment in maize hybrids at 4-leaf stage under drought stress conditions



شکل ۲- تغییرات آبسزیک اسید نسبت به تیمار شاهد در هیبریدهای ذرت در مرحله گرده‌افشانی تحت شرایط تنش خشکی
Figure 2. Abscisic acid changes compared to control treatment in maize hybrids at pollination stage under drought stress conditions



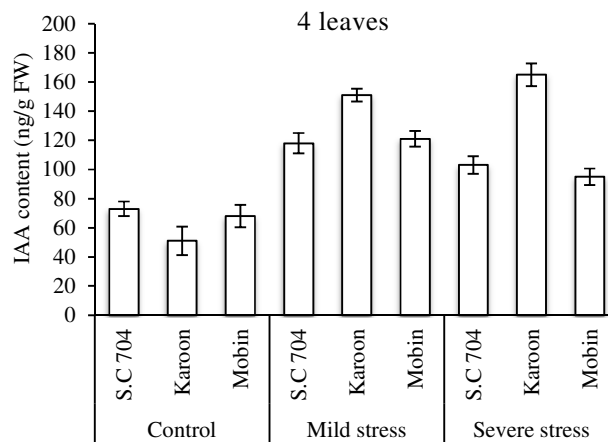
شکل ۳- تغییرات آبسزیک اسید نسبت به تیمار شاهد در هیبریدهای ذرت در مرحله ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی تحت شرایط تنش خشکی
Figure 3. Abscisic acid changes compared to control treatment in maize hybrids at 10 days after pollination stage under drought stress conditions

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان ایندول استیک اسید در هیبریدهای کارون و سینگل کراس ۷۰۴ نسبت به شاهد روند افزایشی نشان داد و این افزایش در هیبرید کارون در سطح تنش شدید، بیش‌تر بود. سیتتر (Setter, 1993) نیز افزایش میزان IAA را در مطالعات خود گزارش کرد. IAA با تغییر در تعداد و اندازه برگ‌ها، موازنه آبی گیاه را تنظیم می‌کند (Cleland, 1987). برگ‌های جوان و مریستم‌های انتهایی به‌عنوان اولین مراکز سنتز IAA شناخته شده‌اند. همین‌طور بیش‌ترین غلظت نوع فعال آن را در این مراکز ذکر می‌کنند (Lopes *et al.*, 1996). هاسین و همکاران (Hussain *et al.*, 2011) با بررسی غلظت‌های مختلفی از ایندول استیک اسید نشان دادند که ایندول استیک اسید باعث افزایش پارامترهای رشد و عملکرد ارقام گندم شد. در مرحله گرده‌افشانی میزان ایندول استیک اسید تحت سطوح مختلف تنش خشکی روند متفاوتی نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۵). بیش‌ترین محتوای ایندول استیک اسید در هیبرید کارون با ۲۹۸ نانوگرم بر گرم وزن تر در سطح تنش شدید خشکی بود که این مقدار اختلاف معنی‌داری با هیبریدهای دیگر در همه سطوح تنش نشان داد. کم‌ترین مقدار ایندول استیک اسید نیز مربوط به هیبرید مبین با ۱۱۵ نانوگرم بر گرم وزن تر در سطح تنش

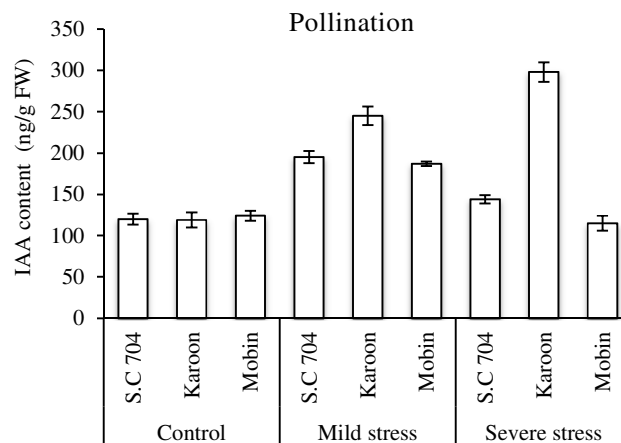
همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان ایندول استیک اسید در هیبریدهای کارون و سینگل کراس ۷۰۴ نسبت به شاهد روند افزایشی نشان داد و این افزایش در هیبرید کارون در سطح تنش شدید، بیش‌تر بود. سیتتر (Setter, 1993) نیز افزایش میزان IAA را در مطالعات خود گزارش کرد. IAA با تغییر در تعداد و اندازه برگ‌ها، موازنه آبی گیاه را تنظیم می‌کند (Cleland, 1987). برگ‌های جوان و مریستم‌های انتهایی به‌عنوان اولین مراکز سنتز IAA شناخته شده‌اند. همین‌طور بیش‌ترین غلظت نوع فعال آن را در این مراکز ذکر می‌کنند (Lopes *et al.*, 1996). هاسین و همکاران (Hussain *et al.*, 2011) با بررسی غلظت‌های مختلفی از ایندول استیک اسید نشان دادند که ایندول استیک اسید باعث افزایش پارامترهای رشد و عملکرد ارقام گندم شد. در مرحله گرده‌افشانی میزان ایندول استیک اسید تحت سطوح مختلف تنش خشکی روند متفاوتی نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۵). بیش‌ترین محتوای ایندول استیک اسید در هیبرید کارون با ۲۹۸ نانوگرم بر گرم وزن تر در سطح تنش شدید خشکی بود که این مقدار اختلاف معنی‌داری با هیبریدهای دیگر در همه سطوح تنش نشان داد. کم‌ترین مقدار ایندول استیک اسید نیز مربوط به هیبرید مبین با ۱۱۵ نانوگرم بر گرم وزن تر در سطح تنش

در مرحله ده روز پس از گرده‌افشانی میزان ایندول استیک اسید در دو هیبرید سینگل کراس ۷۰۴ و کارون در هر دو سطح تنش روند افزایشی نشان داد (شکل ۴). این افزایش تحت سطح تنش شدید خشکی برای هیبرید کارون بیش تر بوده و اختلاف این هیبرید با سطح تنش متوسط هم معنی دار شد. نتایج حاصل با مطالعات ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2019) مطابقت داشت، کم‌ترین مقدار ایندول استیک اسید در هیبرید مبین در سطح تنش متوسط خشکی بدست آمد. سیستم‌های دفاعی غیر آنزیمی و آنزیمی در اثر خشک‌سالی تغییر می‌یابند و پیش تیمار با IAA از این تغییرات جلوگیری می‌کند (Hao *et al.*, 2011).

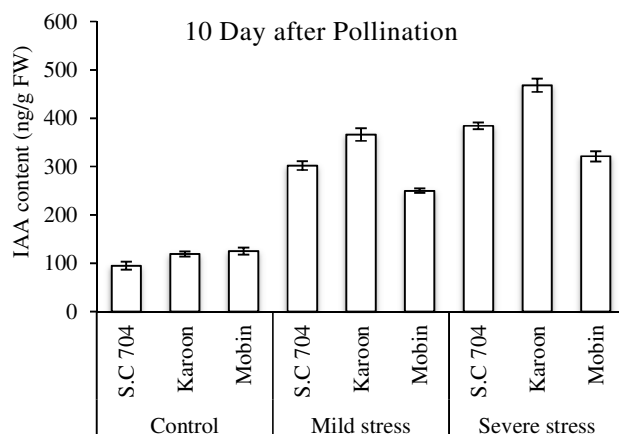
خشکی شدید به دست آمد. ایندول استیک اسید (IAA) یکی از هورمون‌های رشد طبیعی است که تقسیم و افزایش طول سلولی را افزایش می‌دهد. رفتار IAA در القای تحمل به خشکی نسبتاً متناقض است. برای مدت طولانی، به طور کلی تصور می‌شد که کمبود آب منجر به کاهش محتوای IAA می‌شود (Pustovoitova and Zholkevich, 1992) تنظیم دقیق غلظت IAA آزاد برای رشد و نمو مناسب گیاه و نیز سازگاری آن با شرایط تنش ضروری است، به‌ویژه آنکه اکسین در بسیاری از فعل و انفعالات فیتوهورمونال از جمله با هورمون‌های مرتبط با پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده ارتباط دارد (Ostrowski and Jakubowska, 2013).



شکل ۴- تغییرات ایندول استیک اسید نسبت به تیمار شاهد در هیبریدهای ذرت در مرحله چهار برگی تحت شرایط تنش خشکی
Figure 4. Indole acetic acid changes compared to control treatment in maize hybrids at 4-leaf stage under drought stress conditions



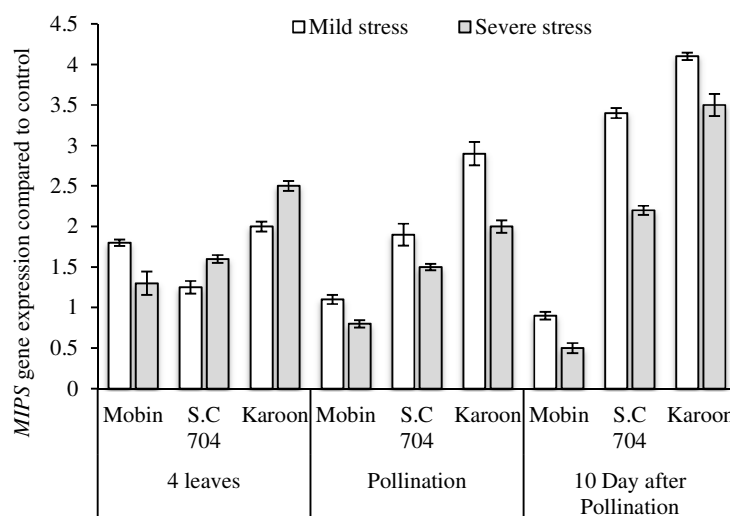
شکل ۵- تغییرات ایندول استیک اسید نسبت به تیمار شاهد در هیبریدهای ذرت در مرحله گرده‌افشانی تحت شرایط تنش خشکی
Figure 5. Indole acetic acid changes compared to control treatment in maize hybrids at pollination stage under drought stress conditions



شکل ۶- تغییرات ایندول استیک اسید نسبت به شاهد در هیبریدهای ذرت در مرحله ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی در شرایط تنش خشکی
Figure 6. Indole acetic acid changes compared to control treatment in maize hybrids at 10 days after pollination stage under drought stress conditions

ABA تحت تنش شوری و خشکی، منجر به فعال شدن یک‌سری مسیرهای متابولیکی و بیان ژن‌های رمزکننده پروتئازها، چاپرون‌ها، پروتئین‌های مشابه LEA، آنزیم‌های متابولیسم قندها و پروتئین‌های تنظیم کننده عوامل رونویسی می‌شود (Rock, 2020). میتسوهاشی و همکاران (Mitsuhashi *et al.*, 2018) در مطالعات خود نشان دادند که ژن کد کننده *MIPS* در اندام‌های مختلف از جمله برگ‌ها، ریشه‌ها و هسته‌های در حال رشد بیان شد. چان و همکاران (Chun *et al.*, 2003) گزارش داند که بیان *MIPS* در برگ طی تنش افزایش یافت.

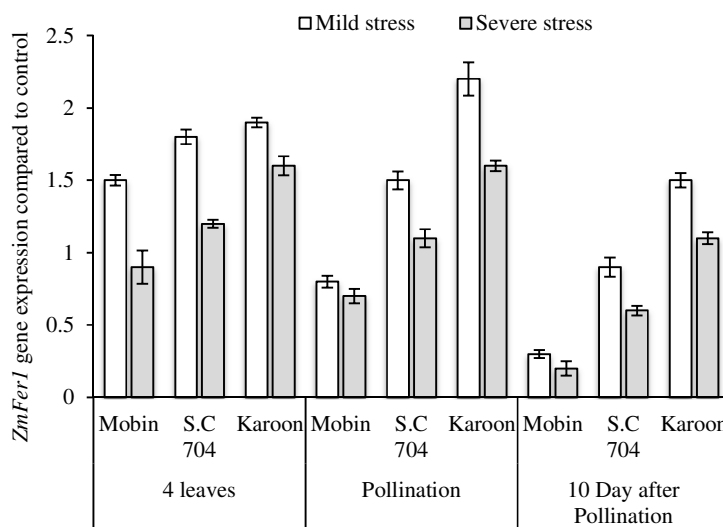
نتایج ارزیابی بیان ژن *MIPS* نسبت به شاهد (شکل ۷)، نشان داد که در هر سه مرحله رشدی (چهار برگگی، گرده‌افشانی و ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی) بیان ژن *MIPS* در همه هیبریدها طی تنش متوسط بیش‌تر بود. مقدار بیان این ژن در مرحله ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی در هیبرید کارون با ۴/۱ نسبت به شاهد طی سطح تنش متوسط بود که اختلاف آن با دو هیبرید دیگر در شرایط مشابه و بقیه شرایط معنی‌دار شد. کم‌ترین مقدار بیان این ژن هم برای هیبرید مبین در سطح تنش شدید خشکی و در مرحله ۱۰ روز پس از تنش به‌دست آمد. افزایش غلظت



شکل ۷- میزان بیان ژن *MIPS* نسبت به تیمار شاهد در هیبریدهای ذرت تحت شرایط تنش خشکی
Figure 7. Level of *MIPS* gene expression compared to control treatment in maize hybrids under drought stress conditions

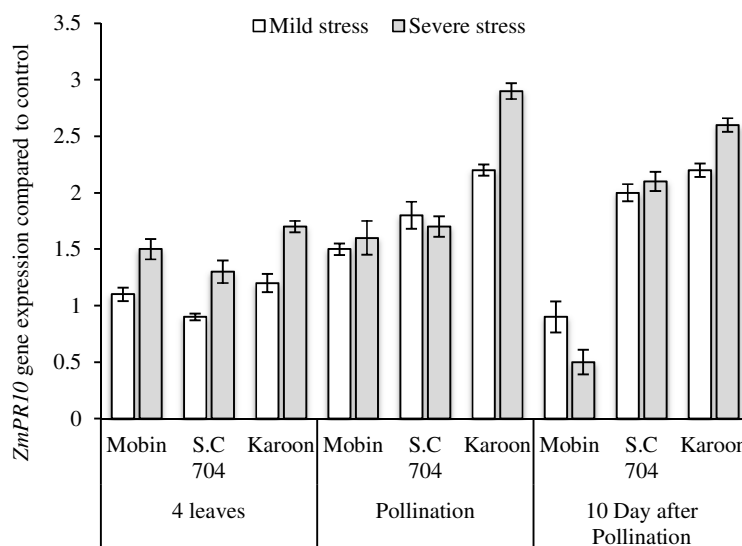
همان‌طور که در شکل ۹ نشان داده شده است، میزان بیان ژن *ZMPR10* به‌جز هیبرید مبین که بیان بیش‌تری در مرحله ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی در تنش متوسط داشت، در سایر هیبریدها در همه مراحل نمونه‌برداری طی تنش شدید خشکی بیش‌تر از تنش متوسط بود. بالاترین میزان بیان ژن برای هیبرید کارون با ۲/۹ برابر نسبت به شاهد تحت تنش شدید در مرحله گرده‌افشانی مشاهده شد که اختلاف آن با سایر سطوح تنش معنی‌دار بود. بیان ژن کد کننده برای *ZmPR10* می‌تواند توسط تنش خشکی و توسعه هسته القا شود. پروتئین‌های PR10 عملکردهای مختلفی از جمله فعالیت ضد میکروبی، فعالیت ریبونوکلاز، فعالیت‌های آنزیمی در متابولیسم‌های ثانویه گیاهی و نقش‌هایی در تنش‌های غیرزیستی دارند (Chen *et al.*, 2010). همچنین برخی از پروتئین‌های PR10 دارای فعالیت اتصال خاص سیتوکینین هستند که منجر به افزایش سطح سیتوکینین می‌شود (Gonneau *et al.*, 2001). این نشان می‌دهد که برخی از پروتئین‌های PR10 ممکن است از طریق تعدیل سطوح سیتوکینین درون‌زا در رشد و نمو گیاه نقش داشته باشند. مشخص شده است که پروتئین‌های PR-10 در مقاومت به تنش غیرزیستی در تعدادی از گونه‌های گیاهی نقش دارند (Liu and Ekramoddoullah, 2006).

نتایج این آزمایش در رابطه با میزان بیان ژن *ZmFer1* (شکل ۸) نیز نشان داد که بیان این ژن طی سطح متوسط تنش خشکی برای همه هیبریدها در تمامی مراحل رشدی نمونه‌برداری شده روند افزایشی داشت. بیش‌ترین مقدار بیان ژن *ZmFer1* در هیبرید کارون با ۲/۲ برابر نسبت به شاهد تحت تنش متوسط در مرحله گرده‌افشانی بود که اختلاف آن با سایر سطوح تنش معنی‌دار شد. تحت تنش متوسط و در مرحله چهار برگی، اختلاف معنی‌داری بین هیبرید سینگل‌کراس ۷۰۴ و کارون دیده نشد. در یک بررسی جیانگ و همکاران (Jiang *et al.*, 2011) بیان داشتند که بیان ژن‌های *ZmPR10* و *ZmFer1 MIPS* در ذرت تحت تنش خشکی افزایش یافت که بیانگر نقش آن‌ها در تحمل به خشکی است. ژن کد کننده *ZmFer1* عمدتاً در برگ‌ها بیان می‌شود، اما در سطوح بسیار پایین در ریشه‌ها در مرحله گیاهچه بیان می‌شود. همچنین مشخص شد که *fer-1* طی تنش کمبود آب در هر دو بافت برگ و ریشه بیان می‌شود. *fer-1* بیش‌ترین میزان بیان را در بافت برگ در هر دو مرحله رشد گیاهچه و پر شدن دانه داشت و در پاسخ به تنش خشکی تمایل به افزایش داشت (Jiang *et al.*, 2012). گزارش شده است که همه ژن‌های گروه *ZmPIP* به‌جز *ZmPIP2.7* در برگ‌های متنوع ذرت نسخه‌برداری می‌شوند (Chaumont *et al.*, 2001).



شکل ۸- میزان بیان ژن *ZmFer1* نسبت به تیمار شاهد در هیبریدهای ذرت تحت شرایط تنش خشکی

Figure 8. Level of *ZmFer1* gene expression compared to control treatment in maize hybrids under drought stress conditions



شکل ۹- میزان بیان ژن *ZmPR10* نسبت به تیمار شاهد در هیبرید های ذرت تحت شرایط تنش خشکی

Figure 8. Level of *ZmPR10* gene expression compared to control treatment in maize hybrids under drought stress conditions

نتیجه گیری کلی

از آنجایی که گیاهان مکانیسم‌های محدودی برای اجتناب از تنش دارند، به ابزارهای انعطاف پذیری برای سازگاری با محیط نیاز دارند. پاسخ گیاه به کمبود آب یا تنش خشکی پدیده پیچیده‌ای است که به نظر می‌رسد سنتر هورمون‌ها و مجموعه جدیدی از پروتئین‌ها را در بر می‌گیرد. نتایج نشان داد که هیبرید کارون از لحاظ صفات بیوشیمیایی مورد اندازه‌گیری شرایط بهتری داشت و تحمل بیشتری نسبت به تنش خشکی نشان داد. ارزیابی ژن‌های *ZmPR10*، *ZmFer1* و *MIPS* نشان داد که هیبرید کارون بیان ژن بیشتری نسبت به شاهد در سطوح مختلف داشت، چنین بنظر می‌رسد این امر در القای تحمل به تنش خشکی در این رقم نسبت به سایر هیبریدهای دیگر تحت آزمایش موثر بوده است. بدیهی است پاسخ قطعی به این مسئله نیاز به آزمایشات تکمیلی دارد، که در صورت تایید قطعی، می‌تواند مسیری روشنی از امکان انتقال این ژن‌ها و استفاده از منابع ژنتیکی واجد آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی ایفا نمایند.

تضاد منافع

نویسنده (گان) تایید می‌کند که این تحقیق در غیاب هر گونه روابط تجاری یا مالی که می‌تواند به‌عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

رعایت اخلاق در نشر

نویسنده (گان) اعلام می‌کند که در نگارش این مقاله به‌طور کامل از اخلاق نشر از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پیروی کرده‌اند. همچنین این مقاله حاصل یک کار تحقیقاتی اصیل بوده و تا کنون به‌طور کامل به هیچ زبانی و در هیچ نشریه یا همایشی چاپ و منتشر نشده و هیچ اقدامی نیز برای انتشار آن در هیچ نشریه یا همایشی صورت نگرفته و نخواهد گرفت.

اجازه انتشار مقاله

نویسنده (گان) با چاپ این مقاله به صورت دسترسی باز موافقت کرده و کلیه حقوق استفاده از محتوا، جدول‌ها، شکل‌ها، تصویرها و غیره را به ناشر واگذار می‌کنند.

References

- Alscher, R. G. and Cumming, J. R. 1990.** Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. John Wiley and Sons, INC Publication.
- Bray, E. A. 1988.** Drought- and ABA- induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. **Plant Physiology** 88: 1210-1214.
- Bustin, S. A. 2000.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology** 25: 169-193.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M. J. and Jung, R. 2001.** Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. **Plant Physiology** 125: 1206-1215.
- Chen, Z. Y., Brown R. L., Damann, K. E. and Cleveland T. E. 2010.** PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. **Molecular Plant Pathology** 11: 69-81.
- Chun, J. A., Jin, U. H., Lee, J. W., Yi, Y. B., Hyung, N. I., Kang, M. H., Pyee, J. H., Suh, M. C., Kang, C. W., Seo, H. Y., Lee, S. W. and Chung, C. H. 2003.** Isolation and characterization of a myo-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: Functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. **Planta** 216: 874-80.
- Cleland, R. E. 1987.** Auxin and cell elongation. In: P. J. Davies (Ed.). Plant hormones and their role in plant growth and development. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. pp: 132-148.
- Dobrev, P. I., Havlicek, L. M., Vagner, J., Malbeck, M. and Kamnek, K. 2005.** Purification and determination of plant hormones auxin and abscise acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography** 1075: 159-166.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S. Y., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L. and Zhu, J. K. 2009.** In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. **Nature** 462: 660-664.
- Gonneau, M., Pagant, S., Brun, F. and Laloue, M. 2001.** Photoaffinity labeling with the cytokinin agonist azido-CPPU of a 34 kDa peptide of the intracellular pathogenesis related protein family in the moss *Physcomitrella patens*. **Plant Molecular Biology** 46: 539-548.
- Hansen, H. and Grossmann, K. 2000.** Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. **Plant Physiology** 124: 1437-1448.
- Hao, Z., Li, X., Su, Z., Xie, C., Li, M. and Liang, X. 2011.** A proposed selection criterion for drought resistance across multiple environments in maize. **Breeding Science** 61: 101.
- Hartung, W. 1983.** The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Valerianella locusta*. **Plant Cell Environment** 6: 427-428.
- Hussain, K. H., Hussain, M., Nawaz, K. H., Majeed, A. and Hayat Bhatti, K. H. 2011.** Morphochemical response of chaksu (*Cassia absus* L.) to different concentrations of indole acetic acid (IAA). **Pakistan Journal of Botany** 43: 125-129.
- Jiang, T., Zhou, B., Luo, M., Kemerait, R., Lee, R. D., Scully, B. T. and Guo, B. Z. 2011.** Expression analysis of stress-related genes in kernels of different maize (*Zea mays*) lines resistance to aflatoxin contamination. **Toxins** 3: 538-550.
- Jiang, M. and Zhang, J. 2002.** Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal of Experimental Botany** 53: 2401-2410.
- Jiang, T., Fountain, J., Davis, G., Robert Kemerait, R., Scully, B., Lee, D. and Guo, B. 2012.** Root morphology and gene expression analysis in response to drought stress in maize (*Zea mays*). **Plant Molecular Biology** 30: 360-369.
- Katrina, C. and Zeevart, J. A. D. 1986.** Abscisic acid accumulation by in situ and isolated guard cells of *Pisum sativum* L. and *Vicia faba* L. in relation to water stress. **Plant Physiology** 81: 1017-1021.
- Khan, A. G. 2006.** Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University Science B**. 7: 503-514.
- Li, Y., Zhao, H., Duan, B., Korpelainen, H. and Li, C. 2011.** Effect of drought and ABA on growth, photosynthesis and antioxidant system of *Cotinus coggygia* seedlings under two different light conditions. **Environmental and Experimental Botany** 71 (1): 107-113.

- Liu, J. J. and Ekramoddoullah, A. K. 2006.** The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 68: 3-13.
- Lopes-Carobonell, M., Alegre, L., Pastor, A., Prinsen, E. and Van Onckellen, H. 1996.** Variation in abscisic acid, indol-3-acetic acid and zeatin riboside concentrations in two Mediterranean shrubs subjected to water stress. **Plant Growth Regulation** 20: 271-277.
- Mitsuhashi, N., Kondo, M., Nakaune, S., Ohnishi, M., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I., Richardson, A., Fukaki, H., Nishimura, M. and Mimura, T. 2018.** Localization of myo-inositol-1-phosphate synthase to the endosperm in developing seeds of Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany** 59: 3069-3076.
- Ostrowski, M. and Jakubowska, A., 2013.** *GH3* expression and IAA-amide synthetase activity in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings are regulated by light, plant hormones and auxinic herbicides. **Journal of Plant Physiology** 170: 361-368.
- Pustovoitova, T. and Zholkevich, V. 1992.** Basic trends in the investigation of drought effects on physiological processes in plants. **Fiziol Biokhim Kul't Rast** 24: 14-27.
- Ribaut, J. M., Betran, J., Monneveux, P. and Setter, T. 2012.** Drought tolerance in maize. In: Bennetzen, J. L. and Hake, S. C. (Eds.). Handbook of maize: Its biology. Springer, New York. pp: 11-34.
- Rock, C. 2020.** Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. **New Phytologist** 148: 357-396.
- Setter, T. L., Flannigan, B. A. and Melkonian, J. 2001.** Loss of kernel set due to water deficit and shade in maize: carbohydrate supplies, abscisic acid, and cytokinins. **Crop Science** 41: 1530-1540.
- Stewart, R. C. and Voetberg, G. 1985.** Relationship between stress-induced ABA and proline accumulation and ABA-induced proline accumulation in excised barely leaves. **Plant Physiology** 79 (1): 24-27.
- Su, Z., Li, X., Hao, Z., Xie, C., Li, M., Weng, J., Zhang, D., Liang, X., Wang, Z., Gao, J. and Zhang, S. 2011.** Association analysis of the *nced* and *rab28* genes with phenotypic traits under water stress in maize. **Plant Molecular Biology Reporter** 29: 714-722.
- Wang, C. T., Yang, Q. and Wang, C. T. 2011.** Isolation and functional characterization of *ZmDBP2* encoding a dehydration-responsive element-binding protein in *Zea mays*. **Plant Molecular Biology Reporter** 29: 60-68.
- Wang, C., Yang, A., Ying, H. and Zhang, J. 2018.** Influence of Water Stress on Endogenous Hormone Contents and Cell Damage of Maize Seedlings. **Journal of Integrative Plant Biology** 50 (4): 427-434.
- Yang, J. C., Zhang, J., Wang, Z. and Zhu, Q. 2013.** Hormones in the grains in relation to sink strength and postanthesis development of spikelets in rice. **Plant Growth Regulation** 41: 185-195.
- Yokota, T., Nahayama, M., Harasawa, I. and Kawabe, S. 1994.** Polyamines, indole-3 acetic acid and abscisic acid in rice phloem sap. **Plant Growth Regulation** 15: 125-128.
- Zhang, X., Ervin, E. H., Evanylo, G. K. and Haering, K. C. 2019.** Impact of biosolids on hormone metabolism in drought-stressed tall fescue. **Crop Science** 49 (5): 1893-1901.
- Zhang, J., Jiang, W., Yang, J. and Ismail, A. M. 2016.** Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. **Field Crops Research** 97: 111-119.
- Zlatev, Z. and Lidon, F. C. 2012.** An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. **Emirates Journal of Food and Agriculture** 24: 57-72.



Evaluation of biochemical traits and some gene expression in maize hybrids under drought stress conditions

Fatemeh Sahraei Ghamesh¹, Saeid Navabpour^{2*}, Ahad Yamchi² and Abolfazl Mazandarani³

Received: November 10, 2021

Accepted: February 21, 2022

Abstract

Among the crop plants, maize has a quite special status for supplying human food. Researchers have found that drought has a direct relationship with the limitation of corn cultivation and production in the world. Drought stress cause about 17% decrease in the annual grain maize yield in the world. This study was carried out to evaluate the effect of drought stress on some gene expression and biochemical traits related to drought tolerance in maize under field conditions. The experiment was conducted in split plot based on randomized complete block design with three replications. The main factor was drought stress in three levels including 75±5 mm (normal conditions as control), 115±5 mm (mild stress) and 140±5 mm (severe stress) evaporation from the class A evaporation pan, and sub-factor included three maize hybrids, Karoon and SC704 (late maturity hybrids) and Mobin (medium early maturity hybrid). The measured traits included the amount of abscisic acid (ABA) and indole acetic acid (IAA) and expression of *MIPS*, *ZmFer1* and *ZmPR10* genes. Sampling was done in three growth stages including four leaves, pollination and 10 days after pollination. The results showed Karoon hybrid had a significant difference with the other hybrids under severe stress conditions and ten days after pollination for ABA and IAA content (345 and 468 ng/g fresh weight, respectively) and showed more tolerance to drought stress. The evaluation of *MIPS*, *ZmFER1* and *ZmPR10* genes also showed that among the studied hybrids, Karoon hybrid had more gene expression in different stress levels than the control and in almost all measured stages. The results of this research showed that the higher content of abscisic acid and indole acetic acid hormones as well as the higher expression of the studied genes are effective in inducing drought stress tolerance and among the studied hybrids, Karoon with the higher content of these hormones and the higher expression of genes compared to the other cultivars had higher tolerance to drought stress.

Keywords: Biochemical traits, gene expression, maize, drought stress

1. M. Sc. Student, Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Assoc. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3. Ph. D. Graduated, Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

* Corresponding author: s.navabpour@gau.ac.ir