ارزیابی ریشه گیاهان تراریخت RD29A-IPT، ناتراریخت و نمونه های محلی چاوی چند ساله پس از تنش خشکی

سمیه اسماعیلی خویگانی*[۱]، حسن صالحی[۲]، مرتضی خوشخوی[۲]، علی نیازی[۳]
[۱]* دکتری گیاهان زینتی بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز
[۲] استاد بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز
[۳] استاد پژوهشکده زیست فناوری دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز
*نویسنده مسئول: esmaili.somayeh@yahoo.com

چکیده

تحمل به خشکی ریشه گیاهان چاوی چندساله تراریخت *RD29A-IPT* با نمونه های محلی جمع آوری شده از استان فارس، براساس ویژگی های مورفوفیزیولوژیک ریشه، در گلخانه پژوهشی بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز مورد ارزیابی قرار گرفتند. گیاهان پس از ۱۰ روز در شرایط تنش خشکی، سرزنی و به مدت ۲ هفته دوباره آبیاری شدند. واکاوی مورفوفیزیولوژیک ریشه ها نشان داد بیشترین تحمل به خشکی مربوط به لاین های GM12، GC8 و GM24 در مقایسه با گیاهان ناتراریخت و محلی می باشد. افزون بر این، در میان نمونه های محلی کمهر ۱ بیشترین تحمل به خشکی را نشان داد. بهبود رشد ریشه در گیاهان تراریخت می تواند با افزایش بیان ژن *IPT* مرتبط باشد که منجر به افزایش میزان سایتوکینین های درون زا و در نتیجه افزایش زنده ماندن ریشه ها و حفظ غشا های سلولی در شرایط تنش خشکی شود.

کلمات کلیدی: ایزوپنتنیل ترانسفراز (*IPT*)، پیشبر RD29A، چاوی چند ساله، ریشه، کم آبی

مقدمه

تنش خشکی مهمترین عامل محیطی است که رشد ریشه سبزفرش ها[۱] را کاهش می دهد. سازوکارهای تحمل به تنش خشکی شامل مسیرهای چند گانه پیچیده فیزیولوژیک و بیوشیمیایی می باشد که ویژگی های کمی فرایندهای متابولیکی مختلف مانند روابط آبی، تغذیه ای، متابولیسم کربوهیدرات ها، پروتین ها، هورمون ها و همچنین سیستم های دفاعی آنتی اکسیدانت ها را کنترل می نمایند (Beard, 1989; Fry and Huang, 2004).

تکنیک های مولکولی مانند تراریزش با ژن کد کننده ایزوپنتنیل ترانسفراز (*IPT*) با افزایش میزان سایتوکینین های درون زا در شرایط تنش خشکی به منظور بهبود تحمل خشکی در گونه های گیاهی مختلف شامل گندم (Sýkorová *et al*., 2008)، برنج (Peleg *et al*., 2011)، چمانواش بلند[۲] (Hu *et al*., 2005) و اروای خزنده[۳] (Merewitz *et al*., 2011a; Merewitz *et al*., 2011b; Xu *et al*., 2010) کارا بوده است.

بر اساس گزارش های پیشین کاهش در میزان سایتوکاینین های ریشه و برگ در تنش خشکی با افزایش بیان *IPT* با پیشبرهای انگیزشی مانند *SAGE*، *SARK* و *RD29A* در سبز فرش ها می تواند بهبود یابد (Merewitz *et al*., 2010a, b; Rivero *et al*., 2007). تا کنون هیچ گزارشی بر انتقال ژن *IPT* با پیش بر *RD29A* در سبزفرش ها به ویژه چاوی چند ساله[۴] در تنش خشکی گزارش نشده است. هدف این پژوهش، بررسی افزایش بیان ژن *IPT* بر ویژگی های مورفوفیزیولوژیک ریشه دو رقم چاوی چند ساله در شرایط پس از تنش خشکی می باشد.

مواد و روش‌ها

گیاهان تراریخت دو رقم Grassland و Numan با گیاهان ناتراریخت و نمونه های محلی چاوی چند ساله جمع آوری شده از استان فارس، پس از یک ماه استقرار در گلخانه پژوهشی بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز برای

[1]. Turfgrasses
[2]. *Festuca arundinacea* Scherb.
[3]. *Agrostis stolonifera*
[4]. *Lolium perenne* L.

IrHC2019

بررسی تحمل به خشکی گیاهان ارزیابی شدند. پس از اعمال تیمار خشکی به مدت ۱۰ روز، گیاهان سرزنی شدند و دوباره به مدت ۲ هفته به منظور رشد دوباره آبیاری شدند. پس ازبازیابی[5]، ویژگی های مورفوفیزیولوژیک شامل طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه، نشت یونی ریشه بر اساس روش (Blum and Ebercon 1981)، محتوای نسبی آب ریشه بر اساس روش (Barrs and Weatherley 1962) و میزان مالون دی آلدهید (MDA) بر اساس روش (Dhindsa and Matowe, 1981) اندازه گیری شدند.

نتایج و بحث

همانطور که در جدول ۱ آمده است، طول ریشه در میان لاین های ۲ رقم تراریخت و نا تراریخت متفاوت بود. در میان لاین های تراریخت NC14، GC6، GM21 و NS14 بیشترین طول ریشه را نسبت به سایر گیاهان تراریخت نشان دادند. در نمونه های محلی، کمهر ۱ بیشترین طول ریشه را در مقایسه با سایر نمونه های محلی نشان داد. افزون بر این، بالاترین وزن تر و خشک ریشه برای NC14 و GM12 یافت شد. افزایش طول ریشه، و وزن تر و خشک آن در گیاهان تراریخت مرتبط با افزایش میزان سایتوکینین در ریشه ها در شرایط تنش خشکی می باشد. تجمع سایتوکینین در ریشه ها تولید ریشه و طویل شدن ریشه در گیاهان تراریخت چاوی چند ساله در شرایط تنش خشکی افزایش می دهد. در نتیجه سیستم ریشه گسترده تر که می تواند در جذب بیشتر آب از خاک های خشک داشته باشد و سبب تاخیر در پیری برگ ها شود. مقایسه ظاهری بین طول و زنده بودن ریشه های گیاهان تراریخت، ناتراریخت و نمونه های محلی چاوی چند ساله در شکل ۱ نشان داده شده است.

شکل ۱. مقایسه ظاهری طول ریشه و زنده ماندن ریشه های گیاه تراریخت (A)، ناتراریخت (B) و نمونه محلی (C-D).

نتایج میزان محتوای نسبی ریشه نشان داد تمام گیاهان تراریخت محتوای نسبی آب بالای ۵۰ درصد داشتند درحالی که در گیاهان ناتراریخت این میزان به کمتر از ۲۰ درصد کاهش یافت. افزون بر این نتایج خوبی از گیاهان محلی چاوی چند ساله پس از بازیابی به دست آمد. کمهر ۱ و مارگون محتوای نسبی بالاتری در مقایسه با دیگر نمونه های محلی نشان دادند (جدول ۱).

[5]. Recovery

IrHC2019

جدول ۱. نتایج ویژگی های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ریشه گیاهان تراریخت، ناتراریخت و نمونه های محلی ۲ هفته پس از بازیابی.

گیاهان تیمار شده	زنده بودن ریشه ها (cm)	محتوای نسبی آب (%)	میزان نشت یونی (%)	مالون دی آلدهید ($nmol^{-1}\ g^{-1}f.w$)
GW	۰/۲۰±۰/۰۲	۱۶/۲۴±۱/۱۴	۸۶/۶۰±۷/۵۴	۵۸/۳۷±۵/۵۱
NW	۰/۱۶±۰/۰۲	۱۴/۶۵±۱/۱۵	۹۵/۳۷±۲/۸۱	۵۸/۴۰±۷/۶۰
NC1	۴/۲۲±۰/۱۵	۵۴/۸۰±۱/۶۰	۲۸/۷۵±۳/۵۶	۳/۸۴±۰/۳۲
NC4	۹/۶۰±۰/۶۵	۶۲/۷۹±۳/۸۲	۲۶/۶۰±۱/۴۵	۹/۲۳±۰/۴۱
NC8	۴/۷۳±۰/۱۰	۴۲/۸۱±۱/۴۱	۴۹/۲۱±۳/۶۹	۳/۴۰±۰/۴۰
NC11	۷/۷۹±۰/۹۷	۵۲/۵۷±۴/۷۸	۳۵/۰۸±۱/۱۴	۲/۷۶±۰/۲۶
NC12	۵/۸۵±۰/۳۸	۵۳/۶۸±۱/۶۴	۲۷/۹۹±۱/۶۶	۲/۵۰±۰/۱۵
NC13	۷/۲۰±۰/۱۰	۵۲/۲۲±5.35	۹۲/۴۰±۲/۹۶	۸/۴۲±۰/۹۰
NC14	۱۰/۸۴±۱/۶۵	۵۳/۰۳±۴/۹۱	۳۹/۳۶±۷/۰۰	۷/۷۱±۲/۰۸
GC3	۵/۵۲±۰/۷۲	۵۱/۱۶±۶/۵۶	۳۸/۴۸±۲/۸۶	۱/۸۸±۰/۳۸
GC4	۷/۶۹±۱/۸۲	۶۳/۴۶±۳/۴۲	۳۳/۶۳±۰/۴۴	۲/۵۴±۰/۳۶
GC5	۲/۲۴±۰/۰۳	۵۵/۹۰±۲/۱۸	۳۹/۶۷±۰/۸۸	۸/۴۴±۱/۳۷
GC6	۷/۰۵±۰/۹۴	۶۲/۲۷±۲/۵۳	۲۲/۵۶±0.71	۷/۳۲±۱/۰۰
GC8	۱۰/۰۲±۰/۳۸	۶۶/۲۶±۱/۵۰	۱۹/۱۰±۲/۰۲	۱/۶۸±۰/۲۲
GC9	۵/۳۷±۰/۵۰	۶۴/۹۱±۷/۱۴	۳۸/۲۴±۵/۸۰	۶/۲۶±۰/۷۸
GC16	۱۰/۸۸±۱/۰۸	۵۶/۵۰±۲/۲۸	۴۸/۴۴±۱/۲۱	۴/۲۵±۱/۲۶
NS14	۷/۳۶±۰/۹۵	۵۹/۱۲±۳/۳۶	۴۰/۹۸±۴/۳۴	۳/۸۶±۱/۳۴
NS22	۷/۳۲±۱/۷۲	۵۹/۴۹±۰/۷۳	۳۷/۳۵±۴/۰۷	۳/۷۷±۱/۲۸
GS1	۳/۳۳±۰/۲۰	۶۳/۵۲±۱/۶۳	۲۵/۹۱±۰/۲۵	۳/۰۸±۰/۱۰
GM12	۱۴/۸۷±۰/۵۲	۷۲/۳۸±۲/۳۹	۱۸/۱۶±۱/۶۳	۱/۶۴±۰/۳۸
GM21	۱۶/۲۸±۰/۴۵	۶۵/۶۰±۱/۳۶	۲۲/۲۶±۰/۷۹	۳/۶۳±۰/۴۲
GM24	۱۵/۴۰±۱/۴۲	۸۰/۶۹±۴/۶۱	۲۰/۳۰±۰/۷۱	۲/۲۷±۰/۱۷
Bereshneh1	۲/۷۱±۰/۱۰	۲۷/۶۳±۴/۰۷	۶۳/۵۹±۵/۱۵	۳/۰۳±۰/۴۰
Bereshneh2	۶/۱۸±۱/۲۷	۵۱/۴۱±۱/۰۰	۵۰/۲۰±۲/۳۲	۱۱/۲۶±۰/۶۳
Chamsohrabkhani	۳/۳۹±۰/۷۵	۵۷/۷۲±۰/۳۸	۴۸/۸۴±۲/۸۴	۲/۳۵±۰/۱۳
Delkhan1	۷/۳۷±۱/۰۹	۳۴/۵۵±۰/۴۵	۲۶/۵۸±۰/۶۲	۳/۰۶±۰/۲۰
Delkhan2	۵/۸۶±۰/۲۷	۴۶/۸۲±۰/۷۸	۴۴/۳۴±۰/۷۷	۳/۷۳±۰/۵۸
Homayjan1	۰/۹۷±۰/۳۳	۵۲/۸۱±۱/۵۹	۴۵/۰۷±۰/۳۹	۱۰/۶۰±۰/۵۰
Homayjan2	۵/۹۴±۰/۴۳	۴۹/۲۵±۳/۳۲	۳۵/۳۰±۱/۵۰	۱۲/۹۷±۱/۴۳
Homayjan3	۴/۱۱±۰/۳۹	۲۶/۸۸±۰/۴۴	۴۴/۹۹±۵/۲۷	۴/۵۰±۰/۵۳
Homayjan-Bereshneh	۴/۰۲±۰/۹۹	۳۳/۰۱±۰/۲۹	۲۸/۸۰±۲/۴۰	۴/۱۵±۰/۴۵
Komehr1	۹/۲۳±۰/۲۳	۶۴/۲۲±۲/۷۶	۲۹/۷۵±۱/۹۲	۲/۴۹±۰/۰۷
Komehr2	۶/۱۱±۰/۹۱	۳۶/۶۸±۲/۶۴	۳۷/۱۰±۴/۳۶	۳/۱۷±۰/۰۴
Khosroshirin	۶/۴۸±۰/۶۳	۵۰/۷۰±۲/۴۹	۸۲/۴۲±۰/۲۴	۱۱/۰۳±۰/۶۹
Margon	۶/۴۵±۰/۷۴	۵۸/۶۷±۱/۴۰	۴۷/۰۸±۰/۴۰	۴/۶۷±۰/۳۳
Pirsabzali	۲/۶۱±۰/۰۳	۴۴/۳۳±۲/۸۱	۴۰/۱۵±۴/۴۶	۳/۰۰±۰/۲۲
Shirmohamadi	۵/۱۶±۰/۷۴	۴۸/۲۰±۲/۲۰	۳۰/۶۰±۱/۵۱	۵/۸۵±۰/۵۸
Sheshpir	۴/۹۱±۰/۷۹	۴۲/۷۳±۱/۴۰	۳۸/۴۰±۰/۹۹	۹/۳۳±۱/۲۴
Tangeh Ardakan	۸/۵۱±۰/۶۸	۵۴/۷۰±۰/۶۷	۲۶/۰۹±۰/۷۲	۱/۹۷±۰/۱۹

داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است.G: رقم Grassland، N: رقم Numan.

C: گیاهان تولید شده از پینه، M: گیاهان تولید شده از مریستم، S: گیاهان تولید شده از بذر،W: گیاهان ناتراریخت.

IrHC2019

به طور کلی میزان نشت یونی در ریشه گیاهان تراریخت کمتر از گیاهان نا تراریخت و نمونه های محلی بود. کاهش نشت یونی در لاین های GM12، NC8، GM24 و GM21 در مقایسه با گیاهان ناتراریخت حدود ۷۹ درصد، ۷۶/۹ درصد، ۷۶ درصد و ۷۴/۳ درصد به ترتیب می باشد (جدول ۱). پایین بودن میزان نشت یونی در ریشه گیاهان تراریخت با میزان بالاتر سایتوکینین در ارتباط است که به حفظ غشاهای سلولی در برابر آسیب توسط اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع جلوگیری می کند. این نتایج با بررسی های پیشین توسط Xu و همکاران (۲۰۱۶) همسویی دارد. MDA فراورده نهایی پراکسیداسیون چربی ها می باشدکه به عنوان شاخص میزان آسیب غشاء به کار می رود. میزان MDA ریشه گیاهان تراریخت پس از بازیابی کمتر از گیاهان ناتراریخت بود. گرچه بیشترین کاهش MDA در ریشه گیاهان GM12، GC8، GM24، GM21، کمهر ۱ و تنگه سرچشمه یافت شد. در گزارش های پیشین، افزایش بیان ژن *IPT* در برخی سبزفرش ها مانند اروای خزنده منجر به کاهش MDA در برگ ها و ریشه ها شد که با افزایش میزان فعالیت آنتی اکسیدانت ها مرتبط می باشد که در نتیجه افزایش سایتوکینین های درون زا است (Merewitz *et al*., 2011a; Xu *et al*., 2016).

منابع

Hu, Y., Jia, W., Wang, J., Zhang, Y., Yang, L., Lin, Z., (2005) Transgenic tall fescue containing the Agrobacterium tumefaciens ipt gene shows enhanced cold tolerance. Plant Cell Reports 23, 705-709.

Merewitz, E.B., Gianfagna, T. and Huang, B. (2010a) Effects of *SAG12-ipt* and *HSP18. 2-ipt* expression on cytokinin production, root growth, and leaf senescence in creeping bentgrass exposed to drought stress. Journal of the American Society for Horticultural Science 135: 230-239.

Merewitz, E.B., Gianfagna, T. and Huang, B. (2010b) Photosynthesis, water use, and root viability under water stress as affected by expression of *SAG12-ipt* controlling cytokinin synthesis in Agrostis stolonifera. Journal of Experimental Botany 62: 383-395.

Merewitz, E. B., Du, H., Yu, W., Liu, Y., Gianfagna, T., & Huang, B. (2011a). Elevated cytokinin content in ipt transgenic creeping bentgrass promotes drought tolerance through regulating metabolite accumulation. Journal of Experimental Botany, 63, 1315-1328.

Xu, Y., Burgess, P., Zhang, X. and Huang, B. (2016). Enhancing cytokinin synthesis by overexpression *ipt* alleviated drought inhibition of root growth through activating ROS-scavenging systems in *Agrostis stolonifera*. Journal of Experimental Botany, 67 :1979-1992.

Root evaluation of RD29A-IPT transgenic, WT and local accessions of perennial ryegrass exposed to drought stress

Somayeh Esmaeili Khuygani[1]*, Hassan Salehi[2], Morteza Khosh-Khui, Ali Niazi[3]
[1*] PhD in Ornamental Plants, Dept. of Horticultural Science, Agriculture College, Shiraz University, Shiraz
[2] Prof., of Dept. of Horticultural Science, Agriculture College, Shiraz University, Shiraz
[3] Prof., of Dept. of Institute of Biotechnology, Agriculture College, Shiraz University, Shiraz
[*]*Corresponding Author: esmaili.somayeh@yahoo.com*

Abstract
Drought tolerance *RD29A-IPT* transgenic perennial ryegrass plants based on morpho-physiological characteristics of the root in comparison with local accessions, which was collected from Fars province, were evaluated at the Research Horticultural Science, Agriculture College, Shiraz University, Iran. After 10 days under drought stress, plants were clipped and irrigated for 2 weeks. Root morpho-physiologic analysis showed the highest drought tolerance in transgenic lines GM12, GC8 and GM24 was found in comparison with non-transgenic plants and local accessions. In addition, the highest drought tolerance among local accessions was recorded for Komehr1. Root growth improvement could be associated with increasement in *IPT* gene expression, which led to, thereby results in the increasement of the survival of the roots and maintaining cell membranes.

***Keywords*:** Isopentenyl transferase (*IPT*), RD29A promoter, Perennial ryegrass, Water stress, Root.

IrHC2019