بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه زنجان
دانشکده کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M. SC.) در رشته اصلاح نباتات

عنوان

تجزیه بیان ژنی ذخایر ساقه در گندم (*Triticum aestivum L.*) تحت تنش کم آبی

تحقیق و نگارش

حمیدرضا پازکی

استادان راهنما

دکتر رضا فتوت **دکتر زهراسادات شبر**

استاد مشاور

دکتر افشین توکلی

۱۳۹۱/۱۱/٤ شماره پایان‌نامه: ٦٣

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

که سیاهی موهایشان را به قلمم هدیه کردند...

سپاسگزاری

خدای را شاکرم که ما را از هیچ آفرید، از روح خود بر ما دمید و اختیار یافتن حقایق را در وجود ما قرار داد.

از پدر و مادر عزیزم سپاسگزارم که با جان‌مایه عشق معنی استقامت را به من آموختند.

از استادان راهنما، دکتر رضا فتوت و دکتر زهرا سادات شبر؛ استاد مشاور، جناب آقای دکتر افشین توکلی و استادان ممتحن، دکتر جلال صبا و دکتر محمدرضا عظیمی بینهایت سپاسگزارم.

از مدیر گروه و اساتید گروه زراعت و اصلاح نباتات، ریاست محترم دانشکده کشاورزی، مسئولین آزمایشگاه و پرسنل دانشکده کشاورزی سپاسگزارم.

همچنین از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) بویژه مهندس کاظم رضایی، مهندس ماهرخ شربتخواری، مهندس راضیه سرآبادانی و خانم دکتر شهبازی سپاسگزارم.

چکیده

به منظور تجزیه بیان ژن‌های دخیل در ذخیره‌سازی و انتقال مجدد ذخایر ساقه و قندهای محلول آزمایشی در ۲۰ام اسفند ماه سال ۱۳۸۸ در گلخانه تحقیقاتی گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان در قالب یک طرح کرت‌های خرد شده بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. فاکتور اصلی شامل سطوح آبیاری (آبیاری نرمال و تنش خشکی) و فاکتور فرعی شامل ۱۰ ژنوتیپ گندم بود. نمونه‌برداری در سه مرحله جهت بررسی روند ذخیره‌سازی و انتقال مجدد از ساقه انجام گردید. نتایج آزمایش نشان داد تنش خشکی به طور کلی بر صفات عملکردی، صفات ذخیرای، قندهای محلول و بیان ژن‌های دخیل اثر معنی‌داری دارد. بین ژنوتیپ‌ها نیز از نظر صفات فوق الذکر تفاوت معنی‌داری مشاهده شده و اثر متقابل سطوح آبیاری و ژنوتیپ معنی‌دار بود. پس از بررسی صفات مربوط به انتقال مجدد و تحلیل نتایج با صفات عملکردی، دو ژنوتیپ C_{14} و C_6 (به ترتیب متحمل و حساس) جهت تجزیه بیان ژن‌های درگیر در انتقال مجدد انتخاب شدند. نتایج تجزیه بیان ژنی نشان داد که میزان و زمان فعالیت (بیان) ژن‌های مورد مطالعه هم از نظر نوع فعالیت و هم در ژنوتیپ متحمل و حساس تحت شرایط آبیاری نرمال و تنش خشکی متفاوت است؛ بطوریکه ژن‌های درگیر در ذخیره‌سازی (*1-SST* و *6-SFT*) در زمان گرده‌افشانی و ژن‌های درگیر در هیدرولیز و انتقال مجدد (*1-FEH* و *SUT1*) ۱۰ روز بعد از گرده‌افشانی فعالیت بیشتری داشتند. همچنین در زمان گرده‌افشانی فعالیت ژن‌های درگیر در ذخیره‌سازی در ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ حساس بیشتر بود و تنش خشکی موجب القای بیان ژن *6-SFT* شد. ژن‌های *1-FEH* و *SUT1* تحت تنش خشکی در مرحله گرده‌افشانی افزایش بیان داشتند که بیانگر تسریع فعالیت این ژن‌ها توسط تنش می‌باشد.

کلمات کلیدی: تنش خشکی، گندم، ذخایر ساقه، قندهای محلول، انتقال مجدد، بیان ژن

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱- فصل اول (مقدمه و کلیات) ۱

۲- فصل دوم (مرور منابع) ۳

۲-۱- اثر تنش خشکی در صفات عملکردی و در مراحل مختلف گندم ۳

۲-۲- صفات ذخیره‌ای و قندهای محلول ٤

۲-۳- انتقال مجدد ٦

۲-۵- بیان ژن‌های دخیل در ذخیره‌سازی و انتقال مجدد ذخایر ساقه ۹

۳- فصل سوم (مواد و روش‌ها) ۱۳

۳-۱- مواد گیاهی ۱۳

۳-۲- کاشت نمونه گیاهی ۱۳

۳-۳- نمونه‌گیری ۱٤

۳-٤- روش تخمین میزان ماده خشک انتقال یافته از هر میانگره ۱٤

۳-۵- استخراج قندهای محلول ۱۵

۳-۵-۱- آماده کردن نمونه ۱۵

۳-۵-۲- هضم ۱۵

۳-۵-۳- عیارسنجی شیمیایی قندهای محلول در آب ۱٦

۳-٦- کارهای مربوط به ترانسکریپتومیکس ۱۸

۳-٦-۱- انتخاب ژن و طراحی آغازگر ۱۸

۳-٦-۲- آماده‌سازی مواد و وسایل لازم برای استخراج RNA ۱۹

۳-٦-۳- استخراج RNA کل ۱۹

۳-٦-٤- بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده ۲۰

۳-٦-۵- نرمال کردن RNA ها ۲۰

۳-٦-٦- تیمار RNA استخراج شده با آنزیم DNase1 ۲۰

۳-٦-۷- واکنش PCR جهت اطمینان از حذف آلودگی DNA از RNA های استخراج شده ۲۱

۳-٦-۸- سنتز cDNA ۲۳

۳-٦-۹- بررسی نسبی بیان ژن با روش Real time - PCR ۲٤

۳-٦-۱۰- تجزیه آماری داده‌های حاصل از روش Real time - PCR ۲٦

٤- فصل چهارم (نتایج و بحث) ۲۷
٤-١- صفات عملکردی ۲۷
٤-١-١- تجزیه واریانس صفات عملکردی ۲۷
٤-١-٢- بررسی اثر تنش خشکی بر صفات زراعی ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه ۲۷
٤-١-٣- تاثیر تنش خشکی بر صفات عملکردی ۳۲
٤-٢- ذخیره‌سازی و انتقال مجدد ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی: طول، وزن و چگالی خطی ۳۳
٤-٢-١- تجزیه واریانس صفات ذخیره‌ای ۳۳
٤-٢-٢- بررسی اثر تنش خشکی بر صفات ذخیره‌ای ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه ۳۸
٤-٢-٣- بررسی روند تغییرات صفات ذخیره‌ای طی مراحل سه‌گانه ٥٦
٤-٢-٤- انتقال مجدد ذخایر ساقه ٦٥
٤-٢-٥- تاثیر تنش خشکی بر صفات ذخیره‌ای و انتقال مجدد ذخایر ساقه ۷۱
٤-٣- ذخیره‌سازی و انتقال مجدد ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی: محتوای کل، غلظت و محتوای خطی قند ۷۳
٤-٣-١- نتایج تجزیه واریانس قندهای محلول ۷۳
٤-٣-٢- بررسی اثر تنش خشکی بر قندهای محلول ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه ۷۷
٤-٣-٣- بررسی روند تغییرات قندهای محلول طی مراحل سه‌گانه ۹٥
٤-٣-٤- انتقال مجدد قندهای محلول ۱۰۸
٤-٣-٥- تاثیر تنش خشکی بر قندهای محلول و انتقال مجدد آن‌ها ۱۱۳
٤-٤- همبستگی صفات ذخیره‌ای و قندهای محلول با صفات عملکردی ۱۱٦
٤-٥- بیان ژن‌های دخیل در سنتز، ذخیره‌سازی و انتقال مجدد ذخایر پدانکل ۱۲۸
٤-٥-١- تجزیه واریانس بیان ژن‌ها ۱۲۸
٤-٥-٢- بررسی اثر تنش خشکی بر بیان ژن‌های مورد مطالعه ۱۳۰
٤-٥-٣- نقش ژن‌های دخیل در ذخیره‌سازی و انتقال مجدد ۱۳۸
نتیجه‌گیری ۱٤۰
پیشنهادها ۱٤۱
منابع ۱٤۲

مقدمه و کلیات

۱- مقدمه و کلیات

جمعیت جهان با سرعت قابل توجهی در حال افزایش است و انتظار می‌رود که تا اواخر سال ۲۰۵۰ به نه میلیارد نفر برسد. از طرف دیگر تولید غذا به خاطر اثر تنش‌های غیرزیستی مختلف کاهش می‌یابد. به این خاطر کاهش تلفات ناشی از تنش‌های غیرزیستی در همه کشورها مورد توجه قرار گرفته است. در بین تمامی تنش‌های غیرزیستی، خشکی مهمترین تنشی است که رشد و تولید گیاهان زراعی را در سرتاسر جهان محدود می‌کند.

در حدود یک‌سوم اراضی جهان با کمبود بارندگی مواجه‌اند و نیمی از این اراضی دارای بارندگی سالیانه کمتر از ۲۵۰ میلیمتر می‌باشند.

در مناطق خشک و نیمه خشک علاوه بر میزان بارندگی کم، توزیع بارندگی از فصلی تا فصل دیگر و از سالی به سال دیگر متغیر بوده و بنابراین پیش‌بینی میزان و توزیع آن بسیار مشکل است. در کشور ما نیز به جز سواحل دریای خزر و قسمت‌های کوچکی از شمال غربی کشور، بقیه مناطق تماما جزء نقاط خشک و نیمه خشک محسوب می‌گردند.

به لحاظ محدودیت آب و میزان بارندگی کم، بخش اعظمی از سطح زیر کشت محصولات زراعی در ایران در شرایط دیم کشت می‌شوند که اهمیت توجه به عومل تاثیرگذار در کاهش تنش خشکی را گوشزد می‌نماید.

خشکی را می توان دوره‌ای که بارندگی آن کمتر از حد طبیعی می‌باشد و باعث محدودیت تولید گیاهی در یک سیستم کشاورزی یا طبیعی می شود تعریف کرد.

گندم، غذای ۳۵ درصد از مردم جهان را تشکیل می‌دهد. باتوجه به اینکه گندم قسمت اعظم سطح زیر کشت مناطق خشک و نیمه خشک را بخود اختصاص داده است و همچنین به دلیل وجود

نوسانات زیاد در میزان و دفعات بارندگی از سالی به سال دیگر و از مکانی به مکان دیگر در یک سال، خشکی جدی‌ترین مسئله‌ای است که تولید و کیفیت گندم را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

لویت (۱۹۸۰) مقاومت به خشکی را به دو دسته تقسیم کرد:

۱- **اجتناب از خشکی**[1]: اجتناب از خشکی به ظرفیت گیاه برای نگهداری وضعیت آب گیاهی بالا یا جذب آب سلولی تحت شرایط خشکی گفته می‌شود.

۲- تحمل خشکی[2]: در این مکانیسم گیاهان از طریق القا و برقراری انواعی از پاسخ‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تحت تنش خشکی سازگار می‌شوند و توانایی ادامه حیات می‌یابند.

تحت شرایط مطلوب عملکرد نهایی دانه بیشتر از ناحیه فتوسنتز جاری در طول دوره پرشدن دانه تأمین می‌شود و سهم انتقال مجدد مواد ذخیره‌ای ساقه ناچیز می‌باشد؛ در حالیکه تحت شرایط تنش خشکی سهم انتقال مجدد از ساقه در تعیین عملکرد نهایی دانه به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. از این‌رو گندم‌هایی که در نواحی خشک کشت می‌شوند به نسبت ارقامی که در شرایط آبی خوب کشت می‌شوند، بیشتر وابسته به انتقال مجدد مواد از ساقه در طول پر شدن دانه می باشند.

تفاوت در تجمع کربوهیدرات‌های محلول در ساقه در بین ژنوتیپ‌ها با ظرفیت فتوسنتز، کارایی استفاده از کربن، توزیع کربن و سایر فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند تنفس، نگهداری رشد و سنتز دیواره سلولی مرتبط می‌باشد. این فرآیندها مستلزم دخالت ژن‌های متعددی است که در مسیرهای متابولیسم کربوهیدرات‌ها مانند چرخه کالوین و مسیرهای سنتز ساکارز و فروکتان نقش دارند.

این تحقیق به منظور بررسی تغییرات بیان تعدادی از ژن‌های عملکردی درگیر در متابولیسم کربوهیدرات‌های محلول در سطح رونویسی طی شرایط خشکی انتهایی و تاثیر آن‌ها در ذخیره‌سازی و انتقال مجدد و نهایتا تحمل به خشکی انجام شد.

[1] Drought avoidance
[2] Drought tolerance

مرور منابع

۲- مرور منابع

۲-۱- اثر تنش خشکی در صفات عملکردی و در مراحل مختلف گندم

خشکی از مهمترین تنش‌های غیر زنده می‌باشد که عملکرد گندم را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اجزای عملکرد گندم به نحو متفاوتی، بسته به مرحله فنولوژی گیاه که با تنش خشکی مواجه می‌شود، تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Johanson and Kanemasu, 1982). طبق اعلام شیلینگر[3] (۲۰۰۵) از سه جز اصلی عملکرد، تعداد دانه در واحد سطح و تعداد دانه در سنبله نقش اساسی در تعیین عملکرد ایفا می‌کند. کمبود آب در زمان گلدهی احتمالاً از طریق آسیب رساندن به فرایند باروری دانه می‌تواند تعداد دانه در سنبله را کاهش دهد چرا که تنش خشکی در مرحله زایشی می‌تواند عقیمی گلچه‌ها را در پی داشته باشد (Koonjul et al., 2005).

تنش خشکی از گرده‌افشانی تا رسیدگی که به تنش انتهای فصل معروف است که عملکرد دانه را از طریق کاهش در سرعت و طول دوره پر شده دانه کاهش می‌دهد (Stone and Nicolas, 1994, 1995). همچنین، تنش خشکی از مرحله گلدهی تا رسیدگی دانه، به ویژه اگر با دمای زیاد همراه باشد، پیری برگ را تسریع و دوره پرشدن دانه را کاهش داده و بنابراین، وزن دانه را کاهش می‌دهد (Hay and Walker, 1994 ; Royo et al., 2000). وزن دانه با سرعت و مدت پرشدن دانه ارتباط دارد (Davidson and Birch, 1978; Hay and Walker, 1994). براساس نتایج پژوهش بویر[4] (۱۹۹۶) در استرالیا، تنش خشکی بهاره در مرحله پر شدن دانه که به طور ناگهانی اتفاق می‌افتد، منجر به کاهش شدید وزن دانه

[3] Schillinger
[4] Boyer

می‌شود، همچنین مورگان[5] (۱۹۷۷) گزارش کرد که تنش خشکی در طی مرحله پرشدن دانه معمولاً وزن دانه را کاهش می‌دهد.

پاک‌نژاد و همکاران (۱۳۸٦) در بررسی تنش خشکی در مراحل مختلف رشد بر روی سه رقم گندم نتیجه گرفتند که تش خشکی موجب کاهش عملکرد و اجزای عملکرد شده است؛ بطوریکه کمترین عملکرد دانه مربوط به تیمار تنش خشکی در زمان گلدهی تا پایان دوره رشدی بوده است. گزارش نجفیان و همکاران[6] (۲۰۰٤) بر روی سه رقم گندم مرودشت، کراس البرز و آذر۲ نشان داد که رقم مرودشت در شرایط آبیاری نرمال می‌تواند نه تن در هکتار عملکرد داشته باشد در حالیکه در شرایط کمبود آب این میزان به کمتر از پنج تن در هکتار کاهش می‌یابد. بعضی از ارقام و لاین‌ها چنین اختلاف شدیدی را نشان نمی‌دهند. بنابراین می‌توان با استفاده از صفات مقاومت به تنش خشکی ارقامی را انتخاب نمود که این اختلاف در آن‌ها شدید نباشد.

۲-۲- صفات ذخیره‌ای و قندهای محلول

بطور کلی رشد و نمو دانه در گندم به تامین کربن از سه منبع وابسته است: ۱) کربوهیدرات‌های تولید شده بعد از گرده‌افشانی که مستقیما به طرف دانه‌ها جابجا می‌شوند (فتوسنتز جاری) ۲) کربوهیدرات‌های تولید شده بعد از گرده‌افشانی که قبل از انتقال مجدد به سمت دانه در ساقه ذخیره شده‌اند و ۳) کربوهیدرات‌های تولید شده قبل از گرده‌افشانی که عمدتا در ساقه ذخیره شده‌اند و در دوره پر شدن دانه به سمت دانه انتقال مجدد می‌یابند (Daniels et al., 1982; Gallagher et al., 1975; Kobata et al., 1992). در شرایط خشکی انتهای فصل به دلیل پیری سریع برگ‌ها و کاهش فتوسنتز جاری کربوهیدرات‌های تولید شده قبل از گرده‌افشانی که عمدتا در ساقه ذخیره شده‌اند، از مهمترین

[5] Morgan
[6] Najafian et al.

منابع پر شدن دانه‌ها در گندم بشمار می‌رود. در ارقام جدید گندم خصوصیاتی چون پاکوتاهی، زودرسی و تولید پنجه‌های کمتر موجب کاهش تولید زیست‌توده می‌شوند (Rebetzke et al., 2006). آردیونی و همکاران[۷] (۲۰۰۶) گزارش کردند که ارقام پرمحصول جدید دارای ذخایر ساقه کمتری بوده و در شرایط تنش خشکی در مرحله پرشدن دانه کاهش شدیدتری را در عملکرد دانه در مقایسه با ارقام قدیمی نشان می‌دهند. مشابه همین موضوع برای گندم زمستانه نیز گزارش شده است که ارقام جدید نسبت به ارقام قدیمی قابلیت کمتری برای مصرف ذخایر ساقه برای پرکردن دانه‌ها دارند (Ehdaei et al., 2006_a: Ehdaei et al., 2006_b).

در گزارشی از اهدایی و همکاران (۲۰۰۶) تنش خشکی طول و وزن میانگره‌ها و در نتیجه طول و وزن ساقه اصلی و به طور متوسط چگالی خطی میانگره‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داد. در این گزارش طول ساقه در اثر خشکی به طور متوسط نه درصد کاهش یافت. نظر به اینکه میانگره‌ها در گندم دائما از بالای ساقه توسعه می‌یابند (Borrel et al., 1993) کاهش در طول ساقه بیشتر به دلیل کاهش طول پدانکل (۱۵ درصد) و سپس پنالتیمیت (نه درصد) و میانگره‌های پایینی (سه درصد) بود (Ehdaei et al., 2006_a). در همین گزارش تنش خشکی به طور متوسط وزن ساقه اصلی را ۲۳ درصد کاهش داد. این کاهش بیشتر در اثر کاهش وزن پدانکل (۲۸ درصد) بود و سپس پنالتیمیت (۲۷ درصد) و میانگره‌های پایینی (۱۹ درصد). دلیل وجود اختلاف بین نسبت کاهش میانگره‌ها در اثر تنش خشکی تفاوت در زمان شروع خشکی و زمان رسیدن به حداکثر وزن هر بخش بود (Ehdaei et al., 2006_a). همچنین تنش خشکی چگالی خطی ساقه را ۱۶ درصد کاهش داد. این کاهش بیشتر در اثر کاهش وزن (۲۳ درصد) بود تا کاهش طول (۹ درصد) (Ehdaei et al., 2006_a).

[7] Arduini et al.

مواد ذخیره شده در ساقه به شکل کربوهیدرات‌های محلول در آب بوده و حدود ۲۵ تا ٤۰ درصد از کل وزن خشک ساقه را تشکیل می‌دهند (Ehdaie et al., 2006b). ذخایر کربوهیدرات ساقه از منابع مهم پر شدن دانه می‌باشند (Bonnett and Incoll, 1992; Schnyder, 1993). این ذخایر از ساقه منتقل شده و در مراحل نهایی پر شدن دانه نقش مهمی دارند (Willenbrink et al., 1998). میزان مشارکت ذخایر ساقه در عملکرد دانه گندم از حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد در شرایط تنش رطوبتی و از حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد در شرایط مساعد گزارش شده است (Wardlaw and Willenbrink, 1994).

کربوهیدرات‌های محلول (WSC) در ساقه گندم و جو معمولا ترکیبی از فروکتان، ساکارز، گلوکز و فروکتوز می‌باشد که در بین آن‌ها فروکتان‌ها سهم اصلی را در مراحل نهایی تجمع این مواد در ساقه دارند (Ruuska et al., 2006). فروکتان الیگوساراید محلول فروکتوزیل است که به صورت خطی یا منشعب بوده، از ساکارز مشتق شده و در واکوئل سنتز می‌شود. در شرایط تنش میزان فروکتان‌ها در گیاه افزایش می‌یابد (Kerepesi and Galiba, 2000).

میزان کربوهیدرات‌های محلول ساقه نیز مثل سایر صفات تحت تاثیر عوامل محیطی می‌باشد و تنوع ژنتیکی در بین ارقام گندم برای آن گزارش شده است (Blum et al., 1998; Ehdaei et al., 2006; Ruuska et al., 2006).

۲-۳- انتقال مجدد

تحت شرایط مطلوب تقریباً ۷۰ الی ۹۰ درصد عملکرد نهایی دانه از فتوسنتز جاری در طول دوره پرشدن دانه تأمین می‌شود (Austin et al., 1977; Bidinger et al., 1977). در این شرایط فتوسنتز برگ پرچم بیشترین نقش را در تشکیل دانه جو و گندم دارد و گزارش شده است در حدود ٦۰ درصد ساکاریدهای دانه از فتوسنتز برگ پرچم حاصل می‌شود (Austin et al., 1977; Evans, 1972;

(Makunga et al., 1978; Thorne, 1973). در چنین شرایطی (نرمال) سهم انتقال مجدد مواد ذخیره‌ای ساقه ناچیز می‌باشد و حدود ٦ الی ١٠ درصد (بسته به ژنوتیپ) تخمین زده شده است؛ در حالیکه تحت شرایط تنش خشکی سهم انتقال مجدد از ساقه به بیشتر از ٤٠ درصد افزایش می‌یابد (Aggarwal and Sinha, 1984; Austin et al., 1977; Bidinger et al., 1977; Blum et al., 1994; Davidson and Chevalier, 1992; Ehdaie and Waines, 1996; Gent, 1994; Palta et al., 1994; Rawson and Evans, 1971; Yang et al., 2000). در مناطق خشک و نیمه‌خشک که تنش خشکی عامل محدود کننده محسوب می‌شود، اهمیت ذخایر کربوهیدرات‌های محلول در ساقه به علت محدود شدن فتوسنتز جاری بیشتر شده و سهم آن در تولید محصول نهایی به بیش از ٥٠٪ (٥٧٪ در گندم و ٧٤٪ در جو) می‌رسد (Brooks et al., 1982).

پاپاکوستا و گاگیاناس[8] (١٩٩١) نشان دادند که با افزایش شدت تنش خشکی و کاهش فتوسنتز جاری، انتقال قندهای محلول در ساقه به سمت دانه افزایش می‌یابد. بلام و همکاران[9] (١٩٩٤) در آزمایش روی ارقام مختلف جو و گندم مشاهده کردند هنگامی که ظرفیت فتوسنتزی گیاه به وسیله تنش خشکی یا گرمای بعد از گلدهی کاهش یافت، پرشدن دانه شدیدا وابسته به انتقال مجدد ذخایر ساقه گردید، آن‌ها میزان مشارکت این ذخایر در شکل‌گیری عملکرد دانه را در این شرایط ٢٢ تا ٦٦ درصد وزن خشک دانه گزارش کردند. سایر محققان نیز افزایش انتقال مجدد مواد فتوسنتزی از ساقه به دانه و افزایش سرعت پر شدن دانه را در شرایط تنش خشکی گزارش کردند و نشان دادند که ژنوتیپ‌های دارای سرعت تجمع و انتقال مواد بیشتر به میزان کمتری تحت تأثیر تنش‌های انتهای فصل قرار می‌گیرند (Ehdaei et al., 2006b; Yang and Zhang, 2006; Yang et al., 2000). طبق گزارش اهدایی و واینس (١٩٩٦) انتقال مجدد مواد ذخیره‌ای ساقه از اجزای زیر تشکیل شده است:

[8] Papakosta and Gagianas
[9] Blum et al.

۱- **ظرفیت ذخیره ساقه:** پتانسیل ذخیره ساقه به عنوان یک مخزن توسط طول ساقه و چگالی وزن خشک ساقه تعین می‌شود، چگالی وزن ساقه برابر وزن خشک ساقه به ازای هر واحد طول ساقه می‌باشد.

۲- **انتقال ذخایر ساقه:** شرایط محیطی که انتقال اسیمیلات‌های جاری را در طول پر شدن دانه کاهش می‌دهند، سبب تقاضای بیشتر ذخیره ساقه در طول پر شدن دانه می‌شوند.

آن‌ها همچنین بیان داشتند میزان و کارایی انتقال مجدد ترکیبات ذخیره‌ای به دانه، بویژه زمانی که گیاه در معرض تنش خشکی قرار گرفته باشد، تعیین کننده عملکرد نهایی دانه خواهد بود.

ظرفیت ذخیره و انتقال مجدد ممکن در طول ساقه نیز متفاوت باشد (Blum et al., 1998). طبق گزارشی از اهدایی و همکاران (۲۰۰٦) خشکی پایان فصل انتقال مجدد را ٦٥ درصد در پدانکل، ۱۱ درصد در پنالتیمیت و پنج درصد در میانگره‌های پایینی افزایش داد.

یانگ و همکاران (۲۰۰۱) بین میزان قندهای محلول ذخیره شده در قسمت‌های مختلف ساقه و میزان قند محلول منتقل شده از این میانگره‌ها، همبستگی معنی‌داری گزارش کردند که این خصوصیت می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب برای انتخاب ژنوتیپ‌ها با عملکرد باثبات بالاتر در شرایط تنش محسوب نشان شود.

مواد ذخیره شده و سهم آن‌ها در (عملکرد) دانه می‌تواند توسط اندازه‌گیری تغییرات ماده خشک میانگره‌ها (Borrel et al., 1993; Cruz-Aguado et al., 2000; Hunt, 1979; Pheloung and Siddique, 1991; Shakiba et al., 1996;) و یا در محتوای قندهای محلول میانگره‌ها در طی پر شدن دانه (Blum et al., 1994; Davidson and Chevalier, 1992; Kiniry, 1993; Shakiba et al., 1996) یا اختلاف ماده خشک کانوپی (بیوماس) به جز دانه‌ها در زمان گرده‌افشانی و رسیدگی فیزیولوژیک (Ehdaie and Waines, 1996; Flood et al., 1995; Takami et al., 1990) برآورده شود.

بر اساس گزارشات بونت و اینکول (۱۹۹۲) در جو زمستانه در میانگره‌های پایینی بیشترین تخصیص اسیمیلات‌ها در طول پر شدن دانه را دارد؛ ولی در مطالعات دیگر از دنیل و همکاران (۱۹۸۲)، پدانکل و میانگره ماقبل آخر (پنالتیمیت) بیشترین ذخیره را در جو دارا بودند. واردلا و ویلنبرینک (۲۰۰۰) نیز بیان داشتند در گندم پدانکل و میانگره ماقبل آخر حاوی بیشترین ذخیره می‌باشند. در زمینه بهبود پر شدن دانه در شرایط تنش خشکی با استفاده از ذخایر ساقه، تفاوت‌های ژنتیکی گزارش شده است (Ruuska et al., 2006).

۲-٤- بیان ژن‌های دخیل در ذخیره‌سازی و انتقال مجدد ذخایر ساقه

در یک مطالعه که بر روی میزان بیان ٤۰۲ فاکتور رونویسی انجام شد مشخص گردید که ۲۸ ژن مربوط به فاکتورهای رونویسی در اثر تنش القا می‌شوند (Chen et al., 2002).

مصرف کربوهیدرات‌ها منجر به افزایش بیان ژن‌های درگیر در فتوسنتز و انتقال مجدد مانند *1-SST* و *1-SFT* و کاهش بیان ژن‌های مرتبط با ذخیره و استفاده از کربوهیدرات‌ها مانند ساکارز سنتاز می‌شود (Xue et al., 2007). زمان حداکثر و حداقل فعالیت آنزیم‌های *1-SST* و *6-SFT* در شرایط نرمال و در شرایط تنش انتهای فصل در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت گزارش شده است (Goggin and setter, 2004; Joudi et al., 2012; Xue et al., 2008; Yang et al., 2004). آنزیم‌های *1-SST* و *6-SFT* تحت تنش خشکی انتهای فصل به طور قابل توجهی افزایش بیان نشان دادند (Joudi et al., 2012). طی بررسی انجام شده تحت تنش خشکی میزان بیان ژن‌های ساکارز ساکارز فروکتوزیل ترانسفراز *1- SST* و ساکارز فروکتان فروکتوزیل ترانسفراز 6- SFT در مرحله ۵۰ درصد گرده‌افشانی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که با افزایش تولید فروکتان در بافت میانگره‌های پدانکل و پنالتیمیت همراه بوده است (Xue et al., 2008).

در گزارش جودی و همکاران، پیک افزایش فعالیت آنزیم *1-SST* در تنش زودتر اتفاق افتاد (Joudi et al., 2012). در گزارش ژو و همکاران (۲۰۰۸)، بیشترین فعالیت آنزیم‌های بیوسنتز در بین میانگره‌های مختلف، در پدانکل و پنالتیمیت و در تحقیق جودی و همکاران (۲۰۱۲)، در پنالتیمیت مشاهده شد.

واردلاو و ویلنبرینک (۲۰۰۰) مشاهده کردند که در ژنوتیپ‌های گندم با شروع تنش خشکی پس از گرده‌افشانی و قبل از تحریک انتقال مجدد، فروکتان‌های موجود در ساقه به واحدهای فروکتوز تبدیل شده و غلظت فروکتوز در ساقه‌ها افزایش می‌یابد. از این‌رو می‌توان نتیجه گرفت با اینکه فرم ذخیره‌ای قندهای محلول فروکتان می‌باشد لیکن جهت انتقال قندهای ذخیره شده به سمت دانه فرم دیگری از قندهای محلول درگیر است. در این رابطه ویلنبرینک و همکاران (۱۹۹۸) اعلان داشتند مهم‌ترین کربوهیدرات انتقال یابنده در مسیرهای طولانی دی‌ساکارید ساکارز می‌باشد. در زمان انتقال مجدد، آنزیم-های فروکتان اگزوهیدرولاز که اتصال فروکتوز را از فروکتوز انتهایی در ساختار فروکتان ذخیره شده در ساقه جدا می‌کنند، نقش مهمی در انتقال مقادیر زیاد فروکتان دارند (Le Roy et al., 2007). نتایج آزمایش اشنایدر[10] (۱۹۹۳) نیز نشان داد که در شرایط تنش خشکی برای شروع تجزیه فروکتان‌ها و نهایتاً انتقال آنها به دانه‌های در حال رشد گندم، به افزایش فعالیت آنزیم فروکتان اگزوهیدرولاز نیاز است.

بیان ژن مربوط به آنزیم فروکتان اگزوهیدورلاز *1- FEH* در زمان گرده‌افشانی ارتباط مشخصی با کربوهیدرات‌های محلول ساقه نداشت (Xue et al., 2008). همچنین زمان حداکثر و حداقل فعالیت آنزیم *1-FEH* در شرایط نرمال و در شرایط تنش انتهای فصل در ژنوتیپ‌های مختلف، متفاوت گزارش شده است؛ به طوری که بر طبق نتایج تحقیقات ژانگ و همکاران (۲۰۰۸) و همچنین جودی و همکاران (۲۰۱۲) بیشترین فعالیت این آنزیم تحت تنش انتهای فصل در روزهای ۲۲ و ۲٤ روز پس از گرده

[10] Schnyder

افشانی مشاهده شده است ولی ژو و همکاران (۲۰۰۸) حداکثر بیان را در ژنوتیپ های مختلف ۲۱ و ۲۷ روز پس از گرده افشانی گزارش کردند. تحت شرایط نرمال حداکثر بیان این ژن و فعالیت این آنزیم در گزارشات مختلف در زمان ۳۰ روز پس از گرده افشانی بوده است (Joudi et al., 2012; Van den Ende et al., 2003; Van Riet et al., 2006; Willenbrink et al., 1998; Zhang et al., 2008).

در اغلب مطالعات زمان حداقل فعالیت آنزیم *1-FEH* روزهای آغازین پس از گرده افشانی بوده است و با گذشت زمان میزان آن افزایش یافته است (Joudi et al., 2012; Xue et al., 2008; Yang et al., 2004; Zhang et al., 2008). محققین زیادی گزارش کردند که تنش خشکی انتهایی فعالیت آنزیمی و همچنین بیان ژن *1-FEH* را به طور قابل توجهی افزایش داد (Willenbrink et al., 1998; Xue et al., 2008; Yang et al., 2004; Zhang et al., 2008). ولی طی بررسی میزان فعالیت این آنزیم و نمونه-برداری از مرحله گرده‌افشانی با فواصل زمانی شش روزه تا ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی و از ۲۷ روز پس از گرده‌افشانی تا بلوغ مشخص گردید. میزان فعالیت *1-FEH* طی پر شدن دانه‌ها افزایش می‌یابد و طی شرایط تنش در ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی به حداکثر می‌رسد که در مقایسه با حالت نرمال زودتر اتفاق می‌افتد (Yang et al. 2004). واردلاو و ویلنبرینک (۲۰۰۰) نیز گزارش کردند که کاهش غلظت فروکتان‌های میانگره آخر و میانگره ماقبل آخر در ساقه گندم در مراحل اولیه تنش خشکی، همراه با افزایش فعالیت آنزیم‌های فروکتان اگزوهیدرولاز و اینورتاز بود.

در مورد ژن *SUT* آئوکی و همکاران (۲۰۰۲) در یک بررسی که روی دانه انجام دادند حداکثر بیان این ژن را ۱۶ تا ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی در طی پر شدن دانه مشاهده کردند. حداکثر بیان این ژن در اندام های رویشی در گندم و برنج چهار روز قبل از خروج خوشه بود (Aoki et al., 2004;