دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۲، صفحه ۳۲۳-۳۱۴ (۱۳۹۶)

تأثیر قارچ *Funneliformis mosseae* در بیان ژن دهیدرین در نهال‌های پسته ایرانی تحت تنش خشکی

توران فیضی کمره[۱]، رامین رحمانی[۲*]، حسن سلطانلو[۳] و محمد متینی‌زاده[۴]

۱- دانشجوی دکترای جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
پست الکترونیک: rahmani@gau.ac.ir

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- دانشیار پژوهشی، بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۳

چکیده

قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار یکی از مهمترین و فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های خاک‌زی هستند. این قارچ‌ها با ۸۰ تا ۹۰ درصد از گونه‌های گیاهی همزیستی برقرار می‌کنند. همزیستی میکوریزی می‌تواند الگوی بیان ژن دهیدرین را تحت تنش خشکی تغییر دهد. پروتئین‌های دهیدرین، در زمان تنش خشکی باعث آبگیری سلول‌های گیاهی می‌شوند، در سلول تجمع کرده، از ساختار غشاها و ماکرومولکول‌ها حفاظت می‌کنند. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی عملکرد قارچ *Funneliformis mosseae* در تغییر بیان ژن دهیدرین نهال‌های میکوریزی پسته ایرانی در طول دوره تنش خشکی است. همه نهال‌ها به‌مدت دو سال، سه بار در هفته آبیاری شدند، سپس تنش خشکی به‌مدت نه روز اعمال شد که در این مرحله علائم پژمردگی در برگ نهال‌ها مشاهده شد، سپس نهال‌ها آبیاری دوباره شدند. نتایج نشان داد که تنش خشکی منجر به کاهش درصد کلونیزاسیون قارچ در ریشه نهال‌های پسته ایرانی شد. بیان ژن دهیدرین در نهال‌های پسته ایرانی (بدون میکوریز) در نهمین روز اعمال تنش خشکی به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت، اما همزیستی پسته ایرانی با قارچ *F. mosseae* بیان ژن دهیدرین را تحت تنش خشکی، به‌طور معنی‌داری کاهش داد. در نهایت می‌توان گفت که افزایش بیان ژن دهیدرین راهکار استفاده شده توسط همزیستی میکوریزی برای مقاومت به خشکی نهال‌های پسته ایرانی نبوده است، شاید مهمترین عملکرد قارچ‌های میکوریزی در تحمل به خشکی گیاهان، از طریق اجتناب از تنش خشکی در گیاهان است.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، پسته ایرانی، دهیدرین، کلونیزاسیون، نهال میکوریزی.

مقدمه

کمبود آب یکی از فاکتورهای محیطی تأثیرگذار در رشد گیاهان است. کمبود آب در توسعه، رشد، زنده‌مانی و تولید محصولات گیاهان عامل مداخله‌گر است (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). اگرچه گیاهان از طریق ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و ژنتیک در برابر تنش‌های خشکی می‌توانند مقاومت نشان دهند (Bray, 1997)، اما سازگاری‌های مورفولوژیک و آناتومی مهمترین

پاسخ حیاتی گیاهان محسوب می‌شود (Ruiz-Lozano, 2003). ولی این سازگاری‌ها در تمامی گیاهان یک پاسخ عمومی نیست. در مقابل، پاسخ‌های سلولی به کمبود آب، یک نوع حفاظت از قلمرو گیاهان است. علاوه بر این، بسیاری از گیاهان در شرایط کمبود آب از طریق همزیستی با قارچ‌های میکوریزی آربسکولار می‌توانند استقرار یابند (Gupta *et al.*, 2002). همزیستی میکوریزی آربسکولار در همه اکوسیستم‌ها، حتی اکوسیستم‌هایی با شرایط محیطی نامناسب وجود دارد (Urgiles *et al.*, 2014). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که قارچ‌های میکوریزی می‌توانند از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی ازجمله تنش خشکی محافظت کنند (Aroca *et al.*, 2006; Muhsin & Zwiazek, 2002). تحقیقات نشان داده است که این قارچ‌ها از طریق چند سازوکار از گیاهان میزبان در برابر تنش‌ها محافظت می‌کنند. مهمترین سازوکار قارچ میکوریز، جذب مستقیم آب و انتقال آن به گیاهان میزبان از طریق هیف‌ها است (Hardie, 1985; Marulanda *et al.*, 2007; Maurel *et al.*, 2008; Ruiz-Lozano & Azcon, 1995). علاوه بر این گیاهان می‌توانند از طریق ژن‌هایی مانند دهیدرین (Dehydrin) در برابر خشکی مقاومت نشان دهند (Zhu *et al.*, 1997). این ژن در برابر تنش‌های خشکی، شوری و سرما واکنش نشان می‌دهد (Battaglia *et al.*, 2008). از بین تنش‌های اشاره شده، تنش خشکی بیشترین تأثیر را در بیان ژن دهیدرین داشته است (Cellier *et al.*, 1998; Close, 1997; Forrest & Bhave, 2007; Maurel *et al.*, 2008; Birhane *et al.*, 2015). بیشترین محل حضور ژن دهیدرین درون هسته، سیتوپلاسم و اندامک‌هایی مثل کلروپلاست و میتوکندری است (Chang-Cai, 2012; Rorat, 2006; Saavedra *et al.*, 2006; Velasco-Conde *et al.*, 2012). در حالت عادی، دهیدرین درون اندامک سیتوپلاسم و کلروپلاست فعالیتی ندارد، اما افزایش بیان آن تحت شرایط خاص درون اندامک سیتوپلاسم و کلروپلاست رخ می‌دهد. یکی از عواملی که می‌تواند منجر به تغییر بیان ژن دهیدرین در سیتوپلاسم و کلروپلاست شود، همزیستی میکوریزی آربسکولار است (Porcel *et al.*, 2005). هر چند در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری تأثیر قارچ میکوریز را در برابر تنش خشکی از طریق پاسخ‌های فیزیولوژیک و فاکتورهای مورفولوژیک گیاهان میزبان آشکار کرده‌اند، اما تاکنون در دنیا مطالعات اندکی در زمینه بیان ژن مقاومت به خشکی انجام شده است (Ruiz-Lozano, 2003). البته تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای در این زمینه در ایران انجام نشده است.

پسته ایرانی (*Pistacia vera* L.) به‌صورت طبیعی در استان‌های خراسان و گلستان یافت می‌شود. از گذشته‌های دور، بهره‌برداری بی‌رویه و تغییر کاربری موجب تخریب جنگل‌های طبیعی پسته شده‌اند. چرای شدید دام مانع استقرار و تجدیدحیات قابل قبول در توده‌های پسته ایرانی شده است. جنگل‌های طبیعی پسته در حوزه آبریز اترک در گستره‌ای بالغ بر ۲۰ هزار هکتار به‌صورت توده‌های تنک و به‌ندرت نیمه انبوه و در هفت هزار هکتار به‌صورت توده‌های انبوه مشاهده می‌شوند (Karimi Doost, 2001). منطقه قازان‌قایه با داشتن توده‌های طبیعی پسته ایرانی، بانک ژن مهمی از این نوع گونه در ایران به‌شمار می‌آید (Karimi doost, 2001). منطقه قازان‌قایه که بخشی از شهرستان مراوه‌تپه در شرق استان گلستان است، با عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۵۸ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۶ درجه و ۱۸ دقیقه شرقی و با دامنه ارتفاعی بیشینه و کمینه (۶۸۳-۵۲۲) متر از سطح دریا قرار دارد. خاک این منطقه دارای بافت لومی (رس ۲۳/۶، سیلت ۳۱/۸ و شن ۴۴/۶ درصد) و واکنش آن قلیایی (pH = ۸/۴) است. نزدیک‌ترین ایستگاه سینوپتیک در فاصله ۴۰ کیلومتری منطقه قازان‌قایه و یک ایستگاه باران‌سنجی در درون منطقه قرار دارد. آمار ایستگاه باران‌سنجی قازان‌قایه میانگین بارش سالانه این منطقه را ۲۴۲ میلی‌متر نشان می‌دهد. مراوه‌تپه ۶ ماه فصل خشک دارد. در منطقه قازان‌قایه طول فصل خشک حدود ۷/۵ ماه (از فروردین تا نیمه آبان) است. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی عملکرد قارچ *Funneliformis mosseae* در تغییر الگوی بیان ژن دهیدرین مقاومت به خشکی در نهال‌های

پسته ایرانی است.

مواد و روش‌ها

تولید نهال‌ها با قارچ میکوریزی

به‌منظور تولید نهال میکوریزی پسته ایرانی، بذرها از توده‌های پسته ایرانی منطقه قازان‌قایه جمع‌آوری شدند. پس از اعمال شکستن خواب بذر (بر اساس تیمار سرمادهی مرطوب)، بذرهای تازه جوانه زده، همراه با ۱۰۰ گرم مایه تلقیح تجاری حاوی ۳۳۰۰ اسپور قارچ *F. mosseae* در گلدان‌های پلاستیکی به‌قطر ۳ و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر کاشته شدند. نهال‌های تولید شده (میکوریزی و بدون میکوریز) برای انجام مطالعه مولکولی، در نهالستان مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور قرار داده شدند.

روش اعمال تنش

نهال‌های پسته به‌مدت دو سال با تکرار سه بار در هفته آبیاری شدند، سپس تنش خشکی در نهال‌های دو ساله پسته در مرداد ماه ۱۳۹۴ (میانگین دمای ماهانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد) از طریق قطع آبیاری انجام شد. پس از مشاهده علائم پژمردگی در برگ بیشتر نهال‌ها دوباره آبیاری شد. در این مرحله از برگ و ریشه نهال‌ها برای اندازه‌گیری درصد کلونیزاسیون و بیان ژن دهیدرین قبل از اعمال تنش خشکی (شاهد) و در روزهای چهارم، ششم و نهم پس از قطع آبیاری و در نهایت دو روز بعد از آبیاری دوباره از نهال‌ها نمونه‌برداری شد.

برای مطالعه مولکولی (بیان ژن دهیدرین) از پنج بلوک و در هر تکرار از پنج نهال برای هریک از تیمارها (میکوریزی و بدون میکوریزی) استفاده شد (در مجموع ۵۰ نهال). علاوه بر این ارزیابی درصد کلونیزاسیون قارچ نیز با پنج بلوک انجام شد. هر تکرار شامل پنج نهال بود. چون نهال‌ها در هر مرحله باید برداشت می‌شدند. این تعداد نهال جداگانه بررسی شدند (۲۵ نهال میکوریزی و ۲۵ نهال شاهد). تعداد کل نهال‌های مورد مطالعه ۱۰۰ اصله (۵۰ نهال میکوریزی و ۵۰ نهال شاهد) بود.

ارزیابی کلونیزاسیون قارچ در ریشه‌ها

در زمان‌های نمونه‌برداری (شاهد قبل از اعمال تنش، روزهای چهارم، ششم و نهم بعد از قطع آبیاری و دو روز پس از آبیاری دوباره) از ریشه‌های نهال‌ها، ۲۰ قطعه به‌طول یک سانتی‌متر و قطر حدود یک میلی‌متر جدا و رنگ‌آمیزی شدند (Gutjahr *et al.*, 2008). درصد کلونیزاسیون ریشه‌های فرعی با مشاهده نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به‌وسیله میکروسکوپ نوری ارزیابی و بر اساس روش Biermann و Linderman (۱۹۸۱) درصد کلونیزاسیون مشخص شد.

بیان ژن دهیدرین

یک گرم برگ نهال‌های پسته ایرانی که در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود برداشته شد و با استفاده از ازت مایع در هاون چینی پودر شد.

محتوی RNA برگ نهال‌های پسته ایرانی با استفاده از P-Biozol (BioFlux, Japan) استخراج شد (Chomczynski & Sacchi, 1987). برای اطمینان از کیفیت مطلوب و تعیین غلظت RNA، نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز بررسی شدند.

تیمار با آنزیم DNase

ابتدا محلول master از ترکیب یک میکرولیتر آنزیم DNase، یک میکرولیتر بافر DNase و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Ribolack inhibitor به ازای یک نمونه آماده شد. سپس از هر تیوب RNA، ۲۰۰۰ نانوگرم RNA برداشته و در یک تیوب جداگانه ریخته شد و با افزودن آب دپس (DEPC Water) به‌حجم ۶/۷۵ میکرولیتر رسانده شد، بعد به‌هر تیوب ۲/۲۵ میکرولیتر محلول master اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس برای متوقف کردن واکنش، یک میکرولیتر EDTA ۰/۱ مولار به‌هر تیوب اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از اتمام تیمار با DNase، دوباره غلظت

RNA با دستگاه نانودراپ سنجیده شد.

ساخت DNA مکمل (cDNA)

ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis K1622 شرکت فرمنتاز انجام شد. برای تهیه محلول master ساخت cDNA، ابتدا یک میکرولیتر oligo dT، چهار میکرولیتر RT buffer، دو میکرولیتر dNTP و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Ribolock inhibitor به ازای یک نمونه با هم ترکیب شدند و به‌مدت پنج دقیقه در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس ۱۰۰۰ نانو گرم RNA تیمار شده در یک تیوب جداگانه ریخته شد و به‌حجم پنج میکرولیتر رسانده شد. به‌محتوای هر تیوب، ۷/۵ میکرولیتر master و ۶/۵ میکرولیتر آب دپس افزوده شد. در پایان به‌هر تیوب ۱ میکرولیتر آنزیم RT (Reverse transcriptase) افزوده شد. طی چرخه زمانی PCR، ابتدا نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و بعد ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از ساخت cDNA، نمونه‌ها برای نگهداری به‌دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

طراحی آغازگر

آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer 3، با توجه به‌ویژگی‌های مورد نظر برای استفاده در آزمون با روش QRT-PCR، بر اساس توالی ژن‌های مورد نظر در سایت NCBI طراحی شدند. ساخت آغازگرها توسط شرکت Bioneer انجام شد. مشخصات آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس ژن دهیدرین به‌ترتیب 5´-AGCACCACGGCGAATACA-3´ و 5´-TTGATCTGCTCCACCATTCC-3´ وآغازگرهای مستقیم و معکوس ژن 18s به‌عنوان ژن مرجع به‌ترتیب 5´GCGCGCTACACTGATGTATT3´ و 5´TTCCTCGTTGAAGACCAACA3´ بودند.

انجام PCR استاندارد برای تأیید ساخت cDNA

برای بررسی کیفیت cDNAهای ساخته شده، cDNAها توسط ژن مرجع در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد توسط PCR استاندارد تکثیر شدند. چرخه حرارتی PCR در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- چرخه حرارتی PCR استاندارد برای تأیید ساخت cDNA و آزمون آغازگرها

زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	مرحله	تعداد چرخه	چرخه
۵ دقیقه	۹۵	۱	۱	۱
۲۰ ثانیه	۹۵	۱		
۲۰ ثانیه	۶۲	۲	۴۰	۲
۳۰ ثانیه	۷۲	۳		
۵ دقیقه	۷۲	۱	۱	۳

واکنش Real-time RT-PCR

برای ارزیابی کمی بیان ژن، از تکنولوژی رنگ سایبرگرین و کیت سایبربیوپارس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در دستگاه iQ5 شرکت BIO-RAD که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد، استفاده شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

بیان نسبی ژن با استفاده از فرمول ۱ محاسبه شد (Pfaffl, 2001).

$$\text{فرمول ۱- بیان نسبی ژن} = \frac{(\text{راندمان ژن هدف})^{\text{تغییرات ژن هدف}}}{(\text{راندمان ژن مرجع})^{\text{تغییرات ژن مرجع}}}$$

در فرمول ۱، «بیان نسبی ژن» معادل بیان نسبی ژن هدف در Real time PCR، «راندمان ژن هدف» معادل راندمان واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن هدف، «راندمان ژن مرجع» معادل راندمان واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن مرجع، «تغییرات ژن هدف» معادل تغییرات نقطه تقاطع ژن هدف (تفاضل میانگین شاهد و نمونه ژن هدف) و «تغییرات ژن مرجع» معادل تغییرات نقطه تقاطع ژن مرجع (تفاضل میانگین شاهد و نمونه ژن مرجع» هستند.

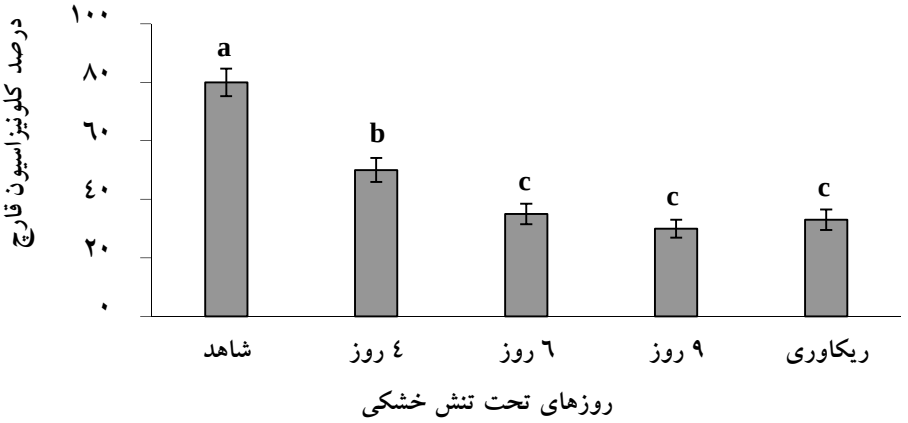
تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از طرح فاکتوریل دو عامله در قالب بلوک‌های کامل (پنج بلوک) با ده تکرار انجام شد. لازم به‌ذکر است که هر نهال به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. تیمارها شامل همزیستی میکوریزی در دو سطح (نهال میکوریزی و بدون میکوریز) و تنش خشکی در پنج سطح (شاهد، چهار روز، شش روز، نه روز بعد از اعمال تنش خشکی و ریکاوری آبیاری دوباره به‌مدت ۲ روز بعد) نمونه‌برداری بودند.

تجزیه‌وتحلیل داده‌های Real time PCR با استفاده از نرم‌افزار REST (Relative expression software tool) انجام شد. برای ترسیم شکل‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. میانگین درصد کلونیزاسیون قارچ روی ریشه در سطوح خشکی با همدیگر مقایسه شدند. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد به‌وسیله نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج

تغییر درصد کلونیزاسیون قارچ میکوریز در طی تنش خشکی

تنش خشکی منجر به کاهش درصد کلونیزاسیون قارچ در نهال‌های میکوریزی پسته ایرانی شد. بیشترین درصد کلونیزاسیون قارچ با ۸۰ درصد مربوط به زمان بدون تنش خشکی و کمترین درصد کلونیزاسیون با ۳۰ درصد مربوط به نهمین روز پس از اعمال تنش خشکی بود (شکل ۱). در دوره اعمال تنش خشکی، کلونیزاسیون اندام‌های قارچ درون ساختار ریشه نهال‌های بدون میکوریز پسته ایرانی مشاهده نشد.



شکل ۱- تأثیر تنش خشکی بر درصد کلونیزاسیون قارچ در نهال‌های میکوریزی پسته ایرانی

بین میانگین‌هایی که با حرف لاتین مشابه مشخص شده‌اند در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار وجود ندارد.

بیان نسبی ژن دهیدرین در زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش خشکی روی نهال‌های پسته ایرانی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد، تنش خشکی و قارچ میکوریز اثر متقابل معنی‌داری بر بیان ژن دهیدرین داشتند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین بیان ژن دهیدرین بین تیمارها (بدون تنش، روزهای چهارم، ششم و نهم تحت تنش خشکی و ریکاوری) در نهال‌ها نشان داد که همزیستی میکوریزی منجر به کاهش بیان ژن دهیدرین در نهال‌ها در مقایسه با نهال‌های بدون میکوریز تحت تنش خشکی شد (شکل ۲). تنش خشکی منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن دهیدرین در نهال‌های بدون میکوریز پسته ایرانی نسبت به شاهد شد. بیشترین بیان ژن در نهال‌های بدون میکوریز در نهمین روز بعد از اعمال تنش خشکی مشاهده شد، اما در نهال‌های میکوریزی تحت تنش خشکی، بیان ژن دهیدرین بسیار اندک بود و افزایش آن با روندی آهسته و منظم همراه بود (شکل ۲).

شکل ۲- بیان ژن دهیدرین در نهال‌های میکوریزی و بدون میکوریز پسته ایرانی

**: نمایانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین نهال‌های میکوریزی و بدون میکوریز در نهمین روز تحت تنش خشکی در سطح یک درصد است، بین میانگین‌هایی که دارای حرف لاتین مشابه هستند در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار وجود ندارد.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی منجر به کاهش درصد کلونیزاسیون قارچ در نهال‌های پسته ایرانی شد. زمانی که شرایط محیط نامساعد باشد، جوانه‌زنی اسپورها و توسعه هیف‌ها و اندام‌های تکثیر قارچ نیز محدود می‌شود، بنابراین توانایی همزیستی میکوریزی (کلونیزاسیون) کاهش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های مطالعه برخی از مطالعات دیگر (Barea *et al*., 2011; Lara-Pérez *et al*., 2014; Urgiles *et al*., 2014) هم مطابقت دارد. اما با یافته Liu و همکاران (۲۰۱۵) در مورد درختان صنوبر تفاوت دارد. در پژوهش Liu و همکاران (۲۰۱۵) تنش خشکی منجر به کاهش درصد کلونیزاسیون قارچ نشد. این پژوهشگران در تفسیر این یافته بیان کردند که طول دوره خشکی و شدت اعمال تنش برای کاهش درصد کلونیزاسیون قارچ کافی نبود.

گیاهان در طول زندگی در معرض انواع تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند. آبگیری سلول، وجه مشترک تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و سرما است و بسیاری از ژن‌های پاسخگو به خشکی، توسط این تنش‌ها نیز القاء می‌شوند (Puhakainen *et al*., 2004).

پژوهش‌های بسیاری حکایت از آن دارد که ژن دهیدرین گیاهان در پاسخ به شرایط محیطی که باعث آبگیری می‌شود، بیان می‌شود. مطالعات بسیاری در گیاهان چوبی انجام شده که افزایش بیان ژن‌های مختلف دهیدرین را تحت تنش خشکی، سرما و شوری گزارش کردند (Yakubov, 2005; Puhakainen *et al*., 2004).

در این پژوهش نیز بیان ژن دهیدرین پس از تنش خشکی، در نهال‌های پسته ایرانی (بدون میکوریز) نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد که با گزارش‌هایی که روی سایر گیاهان انجام شده‌اند، همخوانی دارد. این نتایج با یافته‌های پژوهشی که روی پایه باغی پسته (*Pistacia vera* L.) تحت تنش سرما انجام شد (Bahramabadi *et al*., 2012) مطابقت دارد. آنان گزارش کردند که تنش سرما منجر به افزایش بیان ژن دهیدرین در نهال‌های پسته شد. اما بر اساس یافته‌های پژوهش پیش‌رو، همزیستی میکوریزی در پسته ایرانی، منجر به کاهش چشمگیر بیان ژن دهیدرین در طی تنش خشکی شد.

قارچ‌های میکوریزی آربسکولار از طریق سازوکارهای متنوعی از قبیل تغییر در عملکردهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و همچنین ژنتیک گیاهان در برابر تنش‌های مختلف محیطی مقاومت نشان می‌دهند. تاکنون در مطالعات بسیاری در مورد تأثیر قارچ‌های میکوریزی آربسکولار از طریق تغییر در فاکتورهای رویشی و پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهان میزبان تحت تنش‌های غیرزنده منتشر شده است (Abbaspour *et al*., 2012; Azevedo-Neto *et al*., 2006; Lara-Pérez *et al*., 2014; Marulanda *et al*., 2007; Navarro *et al*., 2011; Silva *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2010). اما مطالعات اندکی در زمینه پاسخ گیاهان میکوریزی به‌وسیله بیان ژن‌های دهیدرین انجام شده است (Porcel *et al*., 2005).

نتایج این پژوهش نشان داد که همزیستی میکوریزی آربسکولار منجر به کاهش بیان ژن دهیدرین نسبت به نهال‌های بدون میکوریز شد. مطالعات نشان داده‌اند که دهیدرین گروهی از پروتئین‌ها هستند که بدون ساختار و بی‌نظم در محلول آبی قرار دارند و در زمان تنش‌هایی که باعث آبگیری سلول می‌شوند (مانند سرما، خشکی و شوری)، از طریق بستن روزنه‌ها، کاهش میزان تبخیر و تعرق، و رسوب چربی در سطح برگ از هدررفت آب از غشاء و ماکرومولکول‌های سلول حفاظت می‌کنند (Battaglia *et al*., 2008). مهمترین عملکرد قارچ‌های میکوریزی در تحمل به خشکی گیاهان، از طریق راهبرد اجتناب از تنش خشکی در گیاهان است. به‌عبارت دیگر می‌توان گفت که قارچ میکوریزی منجر به افزایش قابلیت گیاه از نظر نگهداری بیلان مناسب آب و آماس، حتی در شرایط بروز تنش می‌شود. همزیستی میکوریزی آربسکولار از طریق حفظ محتوای نسبی آب طی تنش خشکی با تسریع انتقال آب از طریق هیف‌ها و افزایش تراکم ریشه‌های ظریف ثانویه در گیاهان منجر به تحمل بیشتر گیاهان در برابر تنش خشکی می‌شوند (Birhane *et al*., 2015)، به‌همین دلیل تا زمانی که قارچ میکوریزی می‌تواند به‌جذب بهتر آب در گیاه کمک کند (Gong *et al*., 2013)، بیان ژن دهیدرین در گیاهان میکوریزی نسبت به بدون میکوریز کمتر است. تحقیقات آینده می‌تواند بر مبنای آزمودن این فرضیه انجام شود که در گیاهان میکوریزی، احتمال بیان سایر ژن‌های مقاومت به خشکی (مانند ژن‌های وابسته به آبسزیک اسید) بیشتر از دهیدرین است. بنابراین بررسی این احتمال در آینده نیازمند پژوهش‌های تکمیلی است.

منابع مورد استفاده

- Abbaspour, H., Saeidi-Sar, S., Afshari, H. and Abdel-Wahhab, M.A., 2012. Tolerance of Mycorrhiza infected Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. Journal of Plant Physiology, 169: 704-709.
- Aroca, R., Ferrante, A., Vernieri, P. and Chrispeels, M.J., 2006. Drought, abscisic acid, and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. Annals of Botany, 98: 1301-1310.
- Azevedo-Neto, A.D., Prisco, J.T., Enás-Filho, J., Braga, D.E., Abreu, C.E. and Gomes-Filho, E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation maize genotypes.

two Glomus species on the growth and physiological performance of *Sophor davidii* seedlings under water stress, New Forest, 44: 399-408.
- Gupta, M.L., Prasad, A., Ram, M. and Kumar, S., 2002. Effect of the vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatumon* the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. Bioresource Technology, 81: 77-79.
- Gutjahr, C., Banba, M., Croset, V., Miyao, A., Hirochika, H., Imaizumi-Anraku, H. and Paszkowski, U., 2008. Arbuscularmycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. Plant Cell, 20: 2989-3005.
- Hardie, K., 1985. The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular–arbuscular mycorrhizal plants. New Phytologist, 101: 677-684.
- Karimi doost, A., 2001. Quantitative and qualitative study of natural stands of pistachio in the region Maravetappe, The East of Golestan. Final report of research project, 75p (In Persian).
- Lara-Pérez, L.A., Noa-Carrazana, J.C., Hernández-González, S., Alarcón-Gutiérrez, E., Sánchez-Velásquez, L.R., Zulueta-Rodríguez, R. and Andrade-Torres, A., 2014. Diversity and colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in the tree fern *Alsophila firma* in rainy and dry season. Symbiosis, 62(3): 143-150.
- Liu, T., Sheng, M., Wang, C.Y., Chen, H., Li, Z. and Tang, M., 2015. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, water status and photosynthesis of hybrid poplar under drought stress and recovery. Photosynthetica, 53(2): 250-258.
- Marulanda, A., Porcel, R., Barea, J.M. and Azcón, R., 2007. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive Glomus species. Microbial Ecology, 54(3): 543-552.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.T. and Santoni, V., 2008. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. Annual Review of Plant Biology, 59: 595-624.
- Muhsin, T.M. and Zwiazek, J.J., 2002. Colonization with Hebeloma crustuliniforme increases water conductance and limits shoot sodium uptake in white spruce (*Picea glauca*) seedlings. Plant and Soil, 238: 217-225.
- Navarro, G.A., Del, P., Banón, Á.S., Morte, A. and Sánchez-Blanco, M.J., 2011. Effects of nursery Environmental and Experimental Botany, 56: 87-94.
- Bahramabadi, E.Z., Rezanejad, F. and Hosseinali, S., 2012. Effects of cold and short day treatments on dehydrin gene expression in seedlings and regenerated shoots of pistachio (*Pistacia vera* L.). Journal of Plant Biology, 4(14): 35-48.
- Barea, J.M., Azcón, R. and Azcón-Aguilar, C., 2011. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. Antonie Van Leeuwenhoek, 81: 343-351.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garciarrubio, A., Campos, F. and Covarrubias, A., 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. Journal of Plant Physiology, 148: 6-24.
- Biermann, B. and Linderman, R.G., 1981. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: Proposed method towards standardization. New Phytologist, 87: 63-67.
- Birhane, E., Kuyper, T.W., Sterck, F.J., Gebrehiwot, K. and Bongers, F., 2015. Arbuscular mycorrhiza and water and nutrient supply differently impact seedling performance of dry woodland species with different acquisition strategies. Plant Ecology and Diversity, 8(3): 387-399.
- Bray, E.A., 1997. Plant responses to water deficit. Trends in Plant Sciences, 2: 48-54.
- Cellier, F., Conejero, G., Breitler, J.C. and Casse, F., 1998. Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Plant Physiology, 116: 319-328.
- Chang-Cai, L., 2012. Genome-wide identification and charactereization of a dehydrin gene family in poplar (*Populis trichocarpa*). Plant Molecular Biology Reporter, 30(4): 848-859.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinum thiocyanat phenol- chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 162: 156-159.
- Close, T.J., 1997. Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. Physiologia Plantarum, 100: 291-296.
- Colmenero-Flores, J.M., Campos, F., Garciarrubio, A. and Covarrubias, A.A., 1997. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. Plant Molecular Biology, 35: 393-405.
- Forrest, K.L. and Bhave, M., 2007. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: A complex gene family with major impacts on plant phenotype. Functional & Integrative Genomics, 7: 263-289.
- Gong, M.G., Tang, M. and Chen, H., 2013. Effects of

Physcomitrella patens is required for salt and osmotic stress tolerance. The Plant Journal, 45(2): 237-249.
- Silva, E.M., Maia, L.C., Menezes, K.M.S., Braga, M.B., Melo, N.F. and Yano-Melo, A.M., 2015. Water availability and formation of propagules of arbuscular mycorrhizal fungi associated with sorghum. Applied Soil Ecology, 94: 15-20.
- Urgiles, N., Straub, A., Loján, P. and Schüßler, A., 2014. Cultured arbuscular mycorrhizal fungi and native soil inocula improve seedling development of two pioneer trees in the Andean region. New Forests, 45(6): 859-874.
- Velasco-Conde, T., Yakovlev, I., Majada, J., Aranda, I. and Johnsen, O., 2012. Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. Tree Genetics and Genomes, 8(5): 957-973.
- Yakubov, B., Barazani, O., Shachack, A., Rowland, L.J., Shoseyov, O. and Golan-Goldhirsh, A., 2005. Cloning and expression of a dehydrin-like protein from *Pistacia ver*a L. Trees, 19: 224-230.
- Zhang, Y., Zhong, C.L., Chen, Y., Chen, Z., Jiang, Q.B. and Wu, C., 2010. Improving drought tolerance of Causarina equisetifilia seedlings by arbuscular mycorrhizal under glasshouse conditions. New Forests, 40: 261-271.
- Zhu, J.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R., 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. Critical Review of Plant Science, 16: 253-277.

preconditioning through mycorrhizal inoculation and drought in *Arbutus unedo* L. plants. Mycorrhiza, 21: 53-64.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, 29(9): 2001-2007.
- Porcel, R., Azcon, R. and Ruiz-Lozano, M., 2005. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. Journal of Experimental Botany, 56(417): 1933-1942.
- Puhakainen, T., Li, C., Boije-Malm, M., Kangasjarvi, J., Heino, P. and Palva, T., 2004. Short-day potentiation of low temperature-induced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. Journal of Plant Physiology, 136: 4299-4307.
- Rorat, T., 2006. Plant dehydrins—tissue location, structure and function. Cell and Molecular Biology Letters, 11(4): 536-556.
- Ruiz-Lozano, J.M., 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: New perspectives for molecular studies. Mycorrhiza, 13: 309-317.
- Ruiz-Lozano, J.M. and Azcón, R., 1995. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. Physiologia Plantarum, 95: 472–478.
- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B. and Vidal, S., 2006. A dehydrin gene in

Evaluating the effects of *Funneliformis mosseae* on expression of dehydrin during drought stress on Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.)

T. Feizi Kamareh[1], R. Rahmani[*2], H. Soltanloo[3] and M. Matinizade[4]

1- Ph.D. student, College of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R.Iran.
2*- Corresponding author, Assoc. Prof., College of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I. R. Iran, Email: rahmani@gau.ac.ir
3- Assoc. Prof., College of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I. R. Iran
4- Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran

Received: 15.06.2016 Accepted: 03.02.2017

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi are one of the most important and the most abundant micro-organisms in soil. The fungi have symbiotic relation with 80 to 90 percent of plant species. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is able to alter pattern of dehydrin expression under drought stress. During period of drought acclimation that causes dehydration of cells, dehydrin proteins accumulate inside cells and protect membranes and macromolecules structures. All seedlings were irrigated three times per week during two years then were exposed to severe drought stress for nine days until wilt symptoms appeared on their leaves, then irrigated normally. It was evaluated whether *Funneliformis mosseae* is able to alter expression functions of dehydrin in the mycorrhiza seedlings of *Pistacia vera* under drought stress. Results showed that mycorrhizal colonization percentage in roots of *P. vera* declined significantly due to water stress treatments. The result revealed that the expression of dehydrin was increased significantly in non-mycorrhizal seedlings at 9 days exposure to the drought stress compared to the mycorrhizal seedlings, but the levels of dehydrin accumulation in mycorrhizal treatment subjected to drought were considerably lower than that of corresponding non-mycorrhiza seedlings, indicating that the accumulation of dehydrin proteins is not a mechanism by which the mycorrhizal symbiosis protects their host seedlings and suggesting that mycorrhizal seedlings were less strained by drought due to primary drought-avoidance mechanisms.

Key words: Colonization, dehydrin, drought stress, Iranian pistachio, mycorrizal seedling.