

مطالعه کمی الگوی بیان ژن $Na^+ Transporter$ تحت تیمارهای مختلف شوری در ارقام جو

Quantitative gene expression pattern analysis of $Na^+ Transporter$ in barley under salinity stress

سارا غفاریان^۱ و سید ابوالقاسم محمدی^{*۲}

Sara Ghaffarian¹ and Seyyed Abolghesem Mohammadi^{*2}

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۲- استاد گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

1. Assistant Professor of Biology Department, Faculty of Natural Science,
Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Maragheh Road, Iran

2. Professor of Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of
Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sa_mohammadi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۹)

چکیده

واژه‌های کلیدی

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد و عملکرد گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. پاسخ گیاهان به شوری بسته به ژنوتیپ، شدت و مدت تنش شوری متفاوت است. کده‌بندی یون Na^+ مهم‌ترین مکانیسم گیاهان در تحمل شوری است. در این مطالعه الگوی بیان ژن $Na^+ Transporter$ در ریشه سه ژنوتیپ جو (Sahara3771) و لاین امید بخش ایرانی متاحمل به شوری و Clipper حساس به شوری) توسط Real-Time PCR کمی مطالعه شد. گیاهان در مرحله گیاهچه‌ای تحت تیمار صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl فرار گرفتند و در سه مرحله ۲۴ ساعت، سه روز و سه هفته پس از اعمال شوری نمونه برداری از ریشه انجام شد. طول، وزن تر و وزن خشک ریشه نیز در این سه مرحله اندازه گیری شد. نتایج نشان دهنده کاهش وزن تر و خشک ریشه با افزایش شدت و مدت تنش شوری بود. تجزیه واریانس بر مبنای اختلاف بیان ژن بین سطوح شوری نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپ‌ها، تیمارهای شوری و مراحل نمونه برداری بود. اثرات متقابل شوری×ژنوتیپ، شوری×زمان نمونه برداری، ژنوتیپ×زمان نمونه برداری و شوری×ژنوتیپ×زمان نمونه برداری معنی دار بود. تحمل به شوری در ارتباط با افزایش بیان ژن $Na^+ Transporter$ بود. در پاسخ به شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl، میزان رونوشت‌های ژن $Na^+ Transporter$ در Clipper در Sahara3771 کاهش یافت. بیان ژن در $Na^+ Transporter$ و لاین امید بخش در پاسخ به شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl به ترتیب کاهش و سپس افزایش یافت. افزایش بیان ژن در لاین امید بخش بیشتر از Sahara3771 بود. احتمالاً تحمل این ژنوتیپ‌ها به شوری در ارتباط با توانایی بالای آن‌ها در تجمع دادن یون‌های Na^+ در واکوئل‌ها است.

جو،

شوری،

الگوی بیان ژن،

طول مدت تنش،

ژن $Na^+ transporter$

مقدمه

یک ویژگی ساختاری متمایز کننده سلول‌های گیاهی داشتن واکوئل است. بر اساس مطالعات بیوشیمیابی نقل و انتقالات تونوپلاست مدلی برای جداسازی Na^+ مازاد در واکوئل‌ها تحت تنش شوری توسط آنتیپورترهای Na^+/H^+ جای گرفته در غشای واکوئلی ارائه شد (Blumwald and Poole 1987). اعضای خانواده $\text{Na}^+ \text{ transporter}$ به عنوان آنتیپورترهای Na^+/H^+ واکوئلی شناخته شده‌اند. از این خانواده ژن‌های $\text{Na}^+ \text{ transporter}$ واکوئلی و غشایی به ترتیب در انتقال Na^+ به درون واکوئل و آپوپلاست نقش دارند (Yokoi *et al.* 2002). نتیجه جداسازی Na^+ واکوئلی حفاظت واکنش‌های آنزیمی سیتوپلاسم از سطوح مازاد Na^+ در عین حفاظت از تورژسانس سلولی است (Glenn *et al.* 1999). Apse *et al.* (1999) جایگیری $\text{Na}^+ \text{ transporter}$ در تونوپلاست و انتقال پروتون وابسته به Na^+ را با فوق بیان این ژن در گیاهان آربیدوپسیس به لحاظ بیوشیمیابی اثبات کردند.

بسیاری گزارشات در دسترس نشان دهنده تغییر در سطح رونوشت‌ها طی تنش شوری هستند. تغییر معنی دار در سطح رونوشت ترانسپورترها در طول تنش شوری می‌تواند با نقص سوبستراها و یا محصولات این ژن‌ها در طول تنش شوری در ارتباط باشد. آنتی پورترهای کاتیون-پروتون از جمله ناقلين کاتیون القا شده‌ی دارای نقش در انتقال کاتیون‌های غیرآلی هستند. این رونوشت‌ها با اعمال شوری تغییرات بیش از سه برابر در فراوانی رونوشت نشان دادند. ژن‌های آنتی پورترهای کاتیون-پروتون با تحمل به شوری در گیاهان ارتباط دارند و در یک کلاس عملکردی رده‌بندی می‌شوند (Pardo *et al.* 2006). پروژه توالی یابی ژنوم آربیدوپسیس منجر به شناسایی ژن آنتی پورتر Na^+/H^+ گیاهی و ۵ همولوگ دیگر آن در آربیدوپسیس شد (Apse *et al.*, 1999). این ژن همولوژی بالایی با آنتی پورترهای (Gaxiola *et al.* 1999) از مخمر، نماتدها و انسان نشان داد.

جو از خانواده Poaceae رتبه پنجم تولید ماده خشک در دنیا و رتبه‌ی دوم سطح زیر کشت در ایران را به خود اختصاص داده است (FAO 2014) و به دلیل تحمل بالای آن به تنش‌های غیرزیستی خشکی، سرما و بیوژه شوری اهمیت اقتصادی زیادی در نواحی خشک و نیمه خشک متاثر از شوری دارد (Al-Karaki 2001). همچنین جو به دلیل چرخه زندگی نسبتاً کوتاه و خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و ژنتیکی مناسب به عنوان Harlan and گیاه مدل در آزمایش‌های مختلف استفاده می‌شود (Zohary 1966).

شوری خاک از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی بیوژه در مناطق خشک و نیمه خشک است (Parvaiz and Satyawati 2008) و بیش از شش درصد از کل زمین‌های دنیا تحت تأثیر شوری قرار دارند (FAO, 2014). تنش اسمزی، سمیت یونی حاصل تجمع نمک و تنش ثانویه ناشی از شوری سه آسیب مهم وارد به گیاهان تحت تنش شوری هستند (Munns and Teaster 2008). اولین تاثیر شوری بر گیاهان تنش اسمزی است. بهبود روابط آبی گیاه به طور معمول نیازمند حذف مواد اسموتیکوم به ویژه یون‌های سدیم (Na^+) و کلر (Cl^-) است. این یون‌ها اغلب در واکوئل‌ها ذخیره می‌شوند و این امر با آزاد شدن یون‌های پتانسیم (K^+) همراه است. غیر از تنش آبی سریع، افزایش غلظت نمک‌هایی نظری Cl^- و بیوژه Na^+ در محیط می‌تواند منجر به تجمع آن‌ها در غلظت‌های سمی درون سلول شود. این امر تاثیر منفی بر جذب و هموستازی عناصر غذایی ضروری نظری پتانسیم (K^+) و کلسیم (Ca^{+2}) دارد. اثر متقابل بین Ca^{+2} و اجزای سلولی به حضور بیش از حد کاتیون‌هایی نظری Na^+ حساس است و نسبت مولی بالای Ca^{+2} به Na^+ موجب تفکیک Ca^{+2} از جایگاه‌های اتصال آن شده، یکپارچگی دیواره و غشاهای سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. حضور K^+ در سیتوپلاسم برای فعال سازی بسیاری آنزیم‌ها مورد نیاز است. به دلیل تشابهات فراوان فیزیوشیمیابی بین Na^+ و K^+ ، Na^+ مازاد تمایل به جایگزینی با K^+ در جایگاه‌های اتصال آن دارد و از این رو بیوشیمی سلول را دچار اختلال می‌کند. در سطوح بالای شوری همچنین نقل و انتقال عناصر غذایی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Maathuis 2006).

زیرزمیتی است مطالعات کمتری در رابطه پاسخ آن به شوری انجام شده است (Eshel and Waisel 1996). اثر غالب شوری در گیاهان بازدارندگی رشد است (Tester and Devenop 2003). با وجود تنوع بالا در تحمل شوری در گیاهان فاکتورهای ژنتیکی و مولکولی اساسی درگیر در این مکانیسم کاملاً شناسایی نشده‌اند. تعیین خصوصیات ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های گیاهان به تنش برای تولید ارقام جدید با تحمل بالا به شوری امری ضروری است (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000).

هدف از این مطالعه بررسی الگوی بیان ژن Na^+ transporter یکی از اعضای خانواده ترانسپوزترهای Na^+ اختصاصی القا شونده تحت شوری در ریشه جو ارقام Clipper و لاین امید بخش، تعیین الگوی بیان ژن Sahara3771 تحت تنش و بررسی و مقایسه واکنش ارقام به تنش شوری طی زمان‌های متفاوت پس از اعمال تنش سطوح مختلف شوری در خلال دوره رویشی در جوهای متحمل و حساس بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد مطالعه شامل ارقام جو Clipper و لاین امید بخش متحمل به شوری حاصل از تلاقی ارقام کویر و صحرا بود. Clipper یک رقم تجاری استرالیایی، بهاره، دو ردیفه و حساس به شوری و Sahara3771 بومی آفریقایی شمالی با منشا الجزایر، زمستانه، شش ردیفه و متحمل به شوری است. ارقام Clipper و Sahara3771 از دانشگاه استرالیای غربی و لاین امید بخش مقاوم به شوری از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد.

ارقام مورد مطالعه به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوك‌های کامل تصادفی با سه تکرار و در سه سطح شاهد، شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مolar NaCl در گلخانه و تحت سیستم هیدروپونیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این ترتیب که پس از سبز شدن گیاهچه‌ها ابتدا به مدت ۷۲ ساعت با محلول هوگلنده نصف غلظت و سپس با محلول هوگلنده کامل مورد آبیاری قرار

گزارش شده است که سطح رونوشت ژن Na^+ transporter با تنش شوری در ارتباط است و مطالعات انتقال ژن نشان دادند فوق بیان ایزوفرم‌های این ژن باعث بهبود تحمل به شوری می‌شود (Yokoi et al. 2002). در مجموع معلوم شده است افزایش بیان ایزوفرم‌های Na^+ transporter تا حد زیادی می‌تواند به محدود کردن بار Na^+ روی بافت گیاهی بویژه زمانیکه که محتوای Na^+ سیتوپلاسمی در مقادیر تنش‌زا است کمک کنند. گیاهان آرابیدوپسیس با فوق بیان Na^+ transporter نسبت به تیپ وحشی فنوتیپ متحمل‌تری به شوری نشان دادند و در گیاهان تاریخته با این ژن تحت تنش شوری Na^+ بیشتری در واکوئل‌ها جداسازی شد. بدین وسیله مدارک مولکولی فراهم شد که تبادل Na^+/H^+ در واکوئل‌ها فاکتور مهمی در تحمل تنش شوری است. در تایید این یافته‌ها گیاهان جهش یافته برای ژن *AtnhxI* یکی از اعضای خانواده آنتی پورترهای Na^+ حساسیت بیشتری به شوری نشان دادند (Apse et al. 1999). فوق بیان این ژن در کلم و گوجه فرنگی (Zhang and Blu 2001; Zhang et al. 2001) و برنج (Fukuda 2004) موجب افزایش تحمل به شوری شد.

برای تضمین عملکرد پایدار محصول و زیر کشت بردن زمین‌هایی که به دلایل مختلف مثل شوری خاک قابل کشت نیستند و در جهت تأمین غذای مورد نیاز جمعیت رو به رشد جهان، لازم است ارقامی با قدرت تحمل تنش‌های محیطی تولید شوند. اولین قدم برای دستیابی به چنین هدفی درک کامل ساز و کارهای پاسخ گیاهان به تنش‌های غیر زیستی مانند شوری می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی رایج‌ترین روش در تشخیص مولکولی میزان بیان ژن‌ها و بررسی صحت داده‌های ریزآرایه است. مهم‌ترین مزیت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی حساسیت بالا، عملکرد اختصاصی و توانایی تعیین کمیت دامنه وسیعی از رونوشت‌ها با فراوانی بسیار کم تا بسیار زیاد است (Bustin 2002).

از آنجائیکه ریشه در ارتباط مستقیم با خاک و آب است و نمک‌ها در ابتدا از این طریق وارد گیاه می‌شوند بنابراین اولین اندامی است که تنش شوری را دریافت می‌کند و اهمیت بسیاری در تحمل به شوری دارد اما با توجه به اینکه ریشه یک اندام

Thermo Scientific RevertAid میکرولیتر و با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis Kit انجام گرفت.

به منظور بررسی بیان نسی ژن Na^+ transporter واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت TAKARA و در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشته سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵–۴۰ چرخه با واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای اتصال اختصاصی تعیین شده آنها به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در ۷۲°C درجه به مدت ۵ ثانیه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بود. سپس به منظور رسم منحنی ذوب دما از ۶۵ درجه سانتی‌گراد طی ۶۰ چرخه ۵ ثانیه‌ای به ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسانیده شد.

در نهایت میزان بیان ژن بر اساس روش تصحیح کارایی داده‌های ژن مرجع α -tubulin به عنوان کنترل داخلی نرمال و میزان تغییرات بیان ژن در تنش‌های مختلف نسبت به شاهد سنجیده شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین کلیه داده‌ها به روش دانکن و به کمک نرم افزار MSTAT-C انجام گرفت.

گرفتند. آبیاری توسط سیستم اتوماتیک انجام گردید. پس از استقرار گیاهچه‌ها با توجه به اینگه حساس‌ترین مرحله رشدی جو نسبت به شوری مرحله سه برگچه‌ای است، تنش شوری در این مرحله اعمال شد. به این ترتیب که ابتدا گیاهچه‌ها به مدت ۱۰۰ ساعت تحت شوری ۵۰ میلی مولار، سپس تحت تیمار ۱۰۰ میلی مولار و ۲۰۰ میلی مولار NaCl قرار گرفتند. به منظور نگهداری نسبت غلاظت Na^+/Cl^- به میزان ۱:۱۰ در سطح مولی از CaCl₂ استفاده شد. آزمایش در شرایط کاملاً کنترل شده گلخانه تحت شرایط دمایی ۲۸°C در روز و ۱۸°C در شب، با فتوپریود ۱۸ ساعت روز به ۶ ساعت شب و در رطوبت نسبی ۷۰ درصد انجام شد. نمونه برداری در سه مرحله ۲۴ ساعت، سه روز و سه هفته پس از اعمال تنش در مرحله سه برگچه‌ای انجام شد. صفات مورد مطالعه شامل طول، وزن تر و وزن خشک ریشه بود. هر صفت روی سه بوته با ویژگی‌های مورفو‌لوژیکی مشابه از هر تیمار اندازه گیری شد.

به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن تحت تنش شوری از تکنیک Quantitative Real-Time RCR استفاده شد. ابتدا استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن) و با اندکی بهینه سازی انجام شد. سپس سنتز cDNA در حجم ۲۰

جدول ۱- نام، توالی و دمای اتصال اختصاصی آغازگرهای ژن‌های مورد مطالعه

Table 1. Primer name, sequence and annealing temperature of studied genes

نام ژن	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)
Na^+ transporter	F: 5'CCTACCGGCATAAGGAGCAGAT R: 5'TTTGCTGGAAGATGGAGCAA	۶۵
α -tubulin	F: 5'AGTGT CCTGTCCACCCACTC R: 5'AGCATGAAGTGGATCCTTGG	۶۵

تنش ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl و در سه مرحله نمونه برداری ۲۴ ساعت، سه روز و سه هفته پس از اعمال تنش انجام شد (جدول ۲).

نتایج نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر هر سه صفت طول، وزن تر و وزن خشک

نتایج و بحث

تأثیر شوری بر رشد ریشه

تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی برای صفات مورفو‌لوژیکی مورد مطالعه در سه ژنوتیپ جو Sahara3771 و Clipper و لاین امید بخش مورد مطالعه تحت شرایط نرمال و

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورفو لوژیکی اندازه گیری شده در ارقام جو Sahara3771، Clipper و لاین امیدبخش تحت تیمارهای صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl در سه مرحله ۲۴ ساعت، سه روز و سه هفته پس از اعمال شوری

Table 2. Variance analysis of studied morphological traits in Sahara3771, Clipper and A-Line 24 hours, 3 days and 3 weeks after 0, 100 and 200 mM NaCl treatment

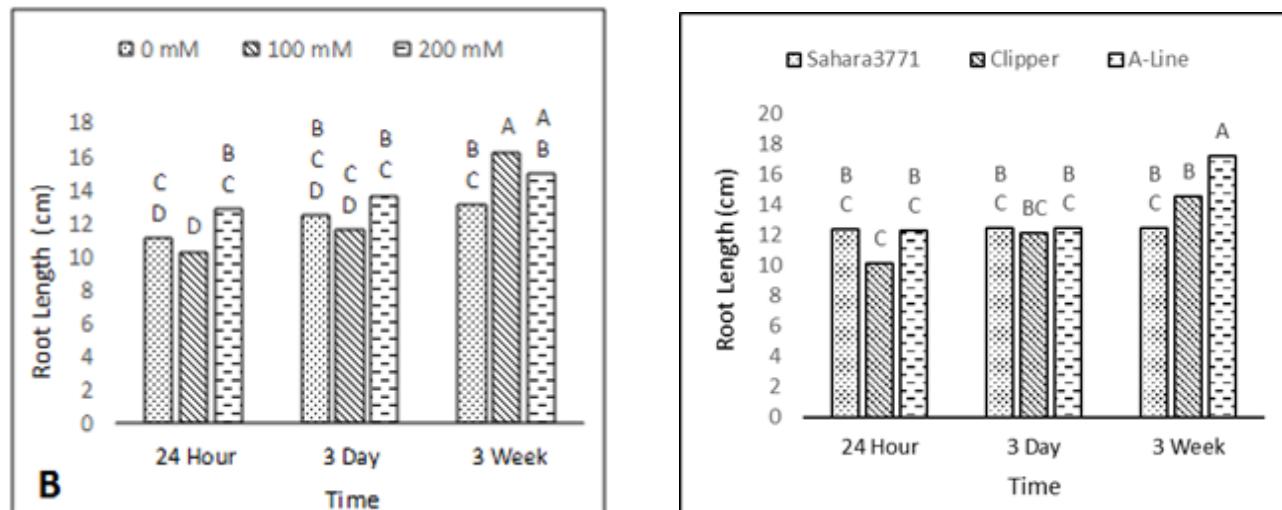
	متابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	طول ریشه	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	تکرار
۰/۱۳۹ ns	تکرار	۲	۴۲/۹۲ ns	۰/۱۳۶ ns	۰/۱۳۶ ns	۰/۱۳۹ ns	
۰/۱۳۷ ns	شوری	۲	۱۷/۴۷ ns	۰/۱۵۱ ns	۰/۱۳۷ ns	۰/۱۳۷ ns	
۰/۱۹۶	خطای اصلی	۴	۲۲/۸۷	۰/۳۹	۰/۱۹۶	۰/۱۹۶	
۰/۳۷۲**	ژنتیپ	۲	۲۳/۹۴*	۰/۶۵**	۰/۳۷۲**	۰/۳۷۲**	
۰/۰۴۵ ns	شوری×ژنتیپ	۴	۳/۴۳ ns	۰/۰۶۲ ns	۰/۰۴۵ ns	۰/۰۴۵ ns	
۱/۸۵۷**	زمان نمونه برداری	۲	۷۲/۸۵**	۷/۷۶۱**	۱/۸۵۷**	۱/۸۵۷**	
۰/۲۰۶**	شوری×زمان نمونه برداری	۴	۱۸/۶۹*	۰/۱۵۳*	۰/۲۰۶**	۰/۲۰۶**	
۰/۲۰۶**	ژنتیپ×زمان نمونه برداری	۴	۲۲/۱۵**	۰/۲۵۶**	۰/۲۰۶**	۰/۲۰۶**	
۰/۰۹*	شوری×ژنتیپ×زمان نمونه برداری	۸	۵/۸۵ ns	۰/۱۷۶**	۰/۰۹*	۰/۰۹*	
۰/۰۳۵	خطای فرعی	۴۸	۵/۶۴	۰/۰۵۷	۰/۰۳۵	۰/۰۳۵	
۲/۱۸	ضریب تغییرات (درصد)	۲/۶۲	۱۸/۴۳				

* و ** به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ ns

هفته در ژنتیپ‌های Clipper و بویژه لاین امیدبخش معنی دار و بیشترین طول ریشه متعلق به لاین امیدبخش بود (شکل B-۱). اثر متقابل سه جانبی ژنتیپ × شوری × مرحله نمونه برداری برای وزن تر ریشه معنی دار بود (شکل ۲). در مقایسه با آنچه در مورد وزن خشک ریشه در این آزمایش مشاهده شد وزن تر ریشه تغییرات کمتری بین ترکیبات تیماری مختلف نشان داشت. بیشترین وزن تر ریشه سه هفته پس از اعمال شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl در لاین امیدبخش و کمترین آن در زمان نمونه برداری ۲۴ ساعت و تحت تیمار شاهد در Clipper بود.

ریشه بود. همچنین تفاوت بین مراحل نمونه برداری از نظر صفات مورد مطالعه معنی دار بود. اثر متقابل شوری در مرحله نمونه برداری و ژنتیپ در مرحله نمونه برداری برای طول، وزن تر و وزن خشک ریشه معنی دار بود. همچنین اثر سه جانبی شوری × ژنتیپ × زمان نمونه برداری برای وزن تر و خشک ریشه معنی دار و برای طول ریشه غیر معنی دار بود.

تحت تیمار شاهد و ۱۰۰ میلی مولار NaCl با پیشرفت مراحل نمونه برداری شاهد افزایش طول ریشه بودیم و حداقل طول ریشه در مرحله سه هفته حاصل شد. اما تحت تیمار ۲۰۰ میلی مولار NaCl اختلاف بین طول ریشه در زمان‌های مختلف نمونه برداری کمتر بود (شکل A-۱). به نظر می‌رسد تنفس شدید باعث کندی رشد شده است. در ژنتیپ Sahara3771 با پیشرفت مراحل نمونه برداری تغییر معنی داری در طول ریشه مشاهده نشد. اختلاف طول ریشه طول ریشه بین مراحل ۲۴ ساعت و سه

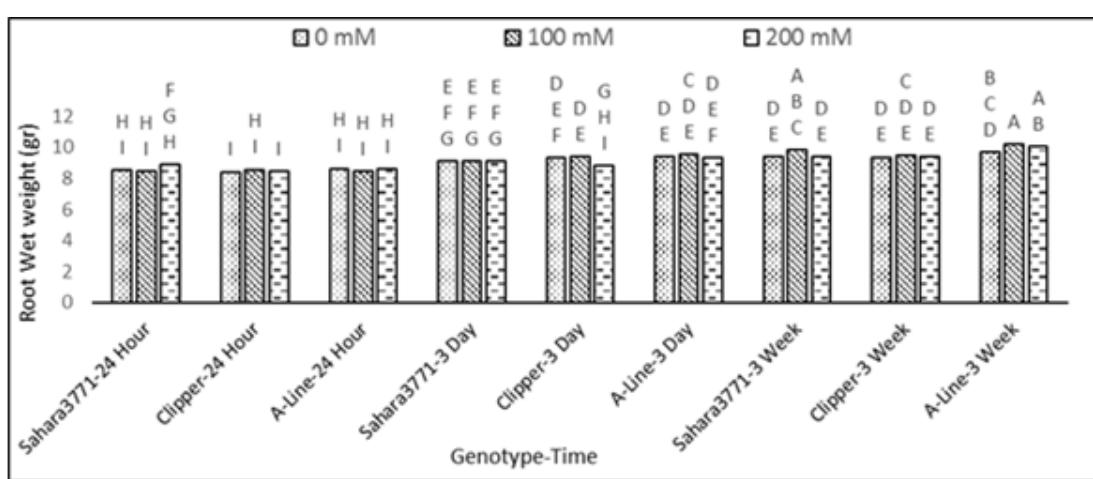


شکل ۱- مقایسه میانگین طول ریشه برای ترکیبات تیماری ژنتیک × زمان نمونه برداری (A) و شوری × زمان نمونه برداری (B)

Figure 1. Effects of different salinity levels on root length for; A: genotype × sampling stage and B: salinity × sampling stage

شد. بیشترین وزن خشک ریشه سه هفته پس از اعمال شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl در لاین امید بخش مشاهده شد. کمترین وزن خشک ریشه نیز متعلق به لاین امید بخش ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl بود. در مجموع در هر سه زمان نمونه برداری وزن خشک ریشه در لاین امید بخش بیشتر از دو ژنتیک دیگر بود.

اختلاف بین تیمارهای شوری از نظر وزن تر ریشه در مرحله سه هفته بیشتر بود. همچنین اختلاف Sahara3771 و لاین امید بخش بین تیمارها در مقایسه با شاهد بیشتر بود. اثر متقابل سه جانبه ژنتیک × شوری × مرحله نمونه برداری برای وزن خشک ریشه نیز معنی دار بود (شکل ۳). در مجموع اختلاف زیادی بین تیمارهای مختلف از نظر وزن خشک ریشه مشاهده

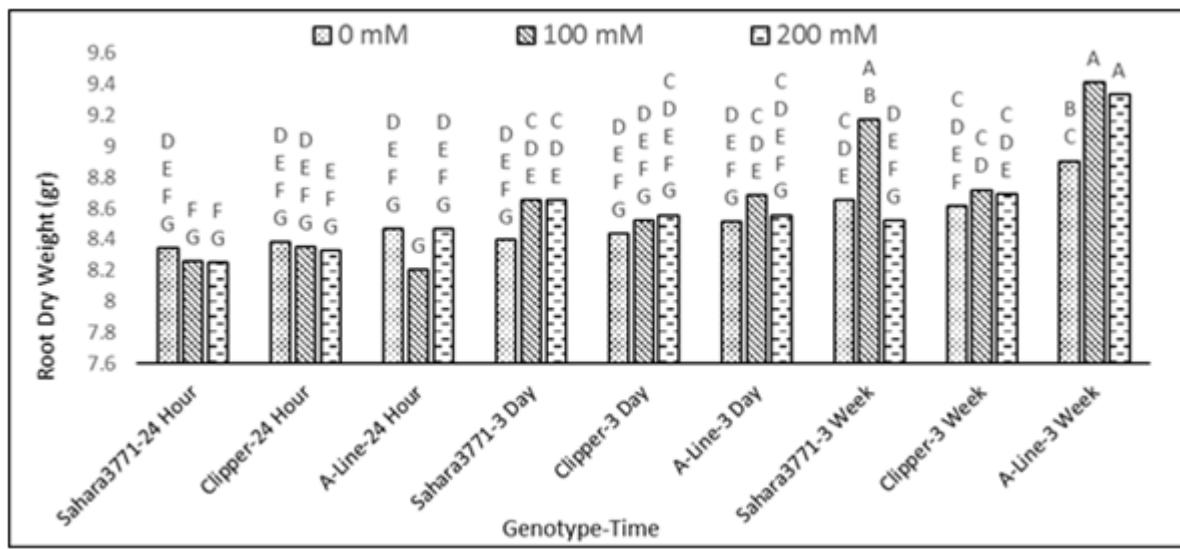


شکل ۲- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ژنتیک در شوری در مرحله نمونه برداری برای وزن تر ریشه

Figure 3-2. Effects of different salinity levels on root fresh weight for genotype × sampling × Salinity

کمترین وزن خشک ریشه نیز متعلق به لاین امیدبخش ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl بود. در مجموع در هر سه زمان نمونه برداری وزن خشک ریشه در لاین امید بخش بیشتر از دو ژنوتیپ دیگر بود.

اثر متقابل سه جانبی ژنوتیپ × شوری × مرحله نمونه برداری برای وزن خشک ریشه نیز معنی دار بود (شکل ۳). در مجموع اختلاف زیادی بین تیمارهای مختلف از نظر وزن خشک ریشه مشاهده شد. بیشترین وزن خشک ریشه سه هفته پس از اعمال شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl در لاین امید بخش مشاهده شد.



شکل ۳- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ژنوتیپ در شوری در مرحله نمونه برداری برای وزن خشک ریشه

Figure 3. Effects of different salinity levels on root dry weight for genotype × sampling × Salinity

نتایج نشان دادند رشد ریشه بویژه تحت تنش طولانی مدت در لاین امید بخش و Sahara3771 کمتر از Clipper تحت تأثیر شوری قرار گرفت هرچند این دو ژنوتیپ تفاوت‌هایی در پاسخ به شوری نشان دادند. Widodo (1999) با مقایسه دو ژنوتیپ Sahara3771 و Sahara3771 در شرایط هیدروپونیک گزارش کردند که Clipper کمتر تحت تأثیر شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl قرار گرفت، پنج هفته پس از اعمال شوری علائم برگی مشاهده نشد و یک کاهش معنی دار در ماده خشک Clipper حاصل شد.

تأثیر تیمار شوری بر الگوی بیان ژن Na^+ transporter

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن Na^+ Transporter در سه ژنوتیپ Sahara3771، Clipper و لاین امید بخش در سه زمان نمونه برداری ۲۴ ساعت، سه روز و سه هفته پس از اعمال تنش

سه هفته پس از اعمال تیمار ۱۰۰ میلی مولار NaCl وزن خشک ریشه در Sahara3771 بیشتر از وزن آن تحت تیمارهای صفر و ۲۰۰ میلی مولار NaCl بود. به نظر می‌رسد تحت غلظت‌های کم نمک ریشه سعی می‌کند اثرات نامطلوب آن را جبران و با افزایش حجم و در نتیجه سطح ریشه، سطح تماس با آب و جذب آن را افزایش دهد. اما با افزایش شدت شوری به ۲۰۰ میلی مولار NaCl احتمال دارد به دلیل افزایش محدودیت حاصل از غلظت نمک این قابلیت کاهش پیدا می‌کند. بطوریکه تحت تنش ۲۰۰ میلی مولار NaCl وزن خشک ریشه بسیار کمتر از وزن آن تحت تیمار شاهد بود.

به دلیل ارتباط مستقیم با خاک و آب ریشه اولین سد دفاعی گیاه در برابر تنش شوری محسوب می‌شود (Eshel and Waisel 1996). اولین تأثیر شوری بر گیاهان بازدارندگی رشد است

اثرات متقابل شوری \times ژنتیپ، شوری \times زمان نمونه برداری، ژنتیپ \times زمان نمونه برداری و شوری \times ژنتیپ \times زمان نمونه برداری معنی دار بودند. اثر متقابل سه جانبه ژنتیپ \times شوری \times زمان نمونه برداری برای برای ژن $Na^+ transporter$ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). میزان ضریب تغییرات برای بیان این ژن برابر با ۲۶/۲۶ درصد بود.

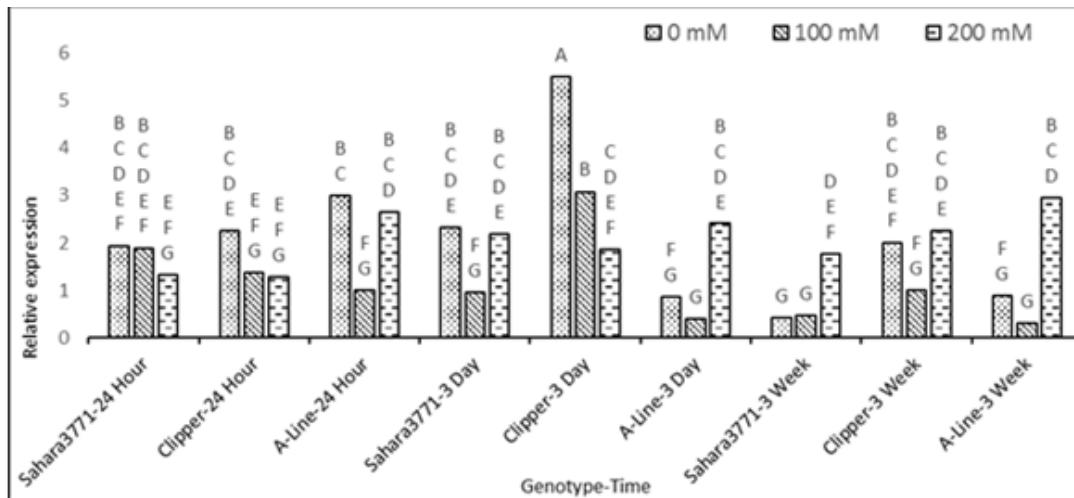
شوری و بر مبنای اختلاف بیان ژن‌ها بین ترکیبات سطوح شوری ۲۰۰-۰، ۱۰۰-۰ و ۰-۱۰۰ میلی مولار NaCl به صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در جدول ۳ آورده شده است. بر این اساس بین سه سطح شوری از نظر بیان این ژن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی دار وجود داشت. اختلاف بین ژنتیپ‌ها و زمان‌های نمونه برداری نیز در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود.

جدول ۳- تجزیه واریانس ژن $Na^+ transporter$ در سه ژنتیپ Clipper Sahara3771 و لاین امید بخش در سه زمان نمونه برداری ۲۴ ساعت، سه روز و سه هفته پس از اعمال تنش شوری و بر مبنای اختلاف بیان ژن‌ها بین ترکیبات سطوح شوری ۰-۱۰۰، ۱۰۰-۰ و ۰-۲۰۰ میلی مولار NaCl

Table 3. Variance analysis of $Na^+ Transporter$ gene expression in Sahara3771, Clipper and A-Line at 24 hours, 3 Days and 3 weeks after 0, 100 and 200 mM salt treatment

منابع تغییر	میانگین مربعات	درجه آزادی
تکرار	۱/۲۲۸ ns	۱
شوری	۶/۹۸۷**	۲
خطای اصلی	۰/۳۷۵	۲
ژنتیپ	۵/۷۲۲**	۲
شوری \times ژنتیپ	۴/۵۷۶**	۴
زمان نمونه برداری	۴/۹۹۹**	۲
شوری \times زمان نمونه برداری	۳/۰۱۸**	۴
ژنتیپ \times زمان نمونه برداری	۵/۱۳۰**	۴
شوری \times ژنتیپ \times زمان نمونه برداری	۱/۹۲۴**	۸
خطای فرعی	۰/۲۴۰**	۲۴

* و ** به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ NS



شکل ۴- تغییرات بیان ژن *Na⁺ transporter* در سه ژنتوتیپ Clipper، Sahara3771 و لاین امید بخش در سه زمان نمونه برداری ۲۴ ساعت، سه روز و سه هفته پس از اعمال شوری در سطوح شوری صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl

Figure 4. Effects of different salinity levels on *Na⁺ transporter* gene expression in Sahara3771, Clipper and A-Line at 24 hours, 3 Days and 3 weeks after 0, 100 and 200 mM salt treatment

برداری Sahara3771 متحمل به شوری در مواجهه با تنفس کاهش بیان کمتری در مقایسه با Clipper حساس به شوری داشت. با توجه به واکنش مطلوب Sahara3771 به شوری در این مکان ژنی احتمال دارد این ژن یکی از نقاط تعیین کننده در تفاوت میزان تحمل به شوری در این دو ژنتوتیپ است. گیلابا و کاتسوهارا (Ligaba and Katsuhara 2010) با بررسی پاسخ کولتیوارهای حساس و متحمل به شوری جو تحت تیمار شوری توسط تکنیک Real-Time PCR نشان دادند تحت تنفس شوری تعداد رونوشت ژن‌های *HvNHX1*, *HvNHX3* و *HvNHX4* از دیگر اعضای خانواده *Na⁺ transorter* در ریشه ژنتوتیپ متحمل به شوری بسیار بیشتر از تعداد رونوشت آنها در ریشه ژنتوتیپ‌های حساس به شوری بود. آن‌ها عملکرد بهتر ارقام متحمل به شوری را در مقابله با تنفس در ارتباط با توانایی بیشتر آن در جداسازی یون *Na⁺* به درون اندامک‌های سلولی دانستند.

تحت تنفس شوری طولانی مدت عملکرد لاین امید بخش در این مکان ژنی بهتر از Sahara3771 بود. در سه مرحله نمونه برداری پاسخ ژن *Na⁺ transporter* به شوری در لاین امید بخش مشابه بود. بطوریکه در آن تحت تنفس ۱۰۰ میلی مولار

در دو زمان ۲۴ ساعت و سه روز پس از اعمال تنفس شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl بیان ژن *Na⁺ transporter* Clipper در میزان کاهش معنی داری داشت. سه روز پس از اعمال شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl میزان کاهش بیان ژن در Clipper به ترتیب نصف و یک سوم میزان بیان آن تحت تیمار شاهد بود. سه هفته پس از اعمال تنفس ۱۰۰ میلی مولار NaCl بیان ژن در Clipper کاهش یافت. اما تحت تنفس شدید ۲۰۰ میلی مولار NaCl بیان ژن در آن در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی داری داشت. در Sahara3771 میزان کاهش بیان ژن در زمان‌های ۲۴ ساعت و سه روز پس از اعمال شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار در مقایسه با Clipper کمتر بود. در این ژنتوتیپ سه هفته پس از اعمال شوری میزان بیان ژن تحت تنفس ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl در مقایسه با شاهد به ترتیب کاهش و افزایش نشان داد.

مرحله گیاهچه‌ای حساس‌ترین مرحله رشدی غلات به شوری است و میزان تحمل به شوری در آن نقش مهمی در رشد و عملکرد نهایی گیاه خواهد داشت (Greenway 1965; Heenan et al. 1988; Mass and Poss 1996).

شوری به عنوان یک تنش غیرزیستی سبب ایجاد سمیت یونی Na^+ و تنش اسمزی می‌شود. ژن‌های خانواده آنتی پورترهای Na^+ در تنظیم تعادل اسمزی، حفاظت از تورژسانس سلولی، حفظ هموستازی عناصر غذایی ضروری نظیر K^+ و Ca^{+2} ، محافظت از اجزای سلولی نظیر پکتین دیوارهای سلولی و فسفولیپیدهای غشا و حفاظت از واکنش‌های آنزیمی سیتوپلاسم با ممانعت از افزایش مقادیر یون‌های Na^+ و Cl^- درون سلول به محدوده سمیت نقش دارند. با توجه به تاثیر پذیری کم بیان ژن Na^+ transporter از تنش ۱۰۰ میلی مولار NaCl در لاین امیدبخش متتحمل به شوری، حفظ بیان آن در مقادیر برابر با آن بیان تحت تیمار شاهد ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری بیان ژن NaCl در لاین امیدبخش متتحمل به شوری، حداقل دو برابری در مقایسه با شاهد در زمان سه روز و سه هفته پس از اعمال تنش ۲۰۰ میلی مولار NaCl و با توجه به نقش مثبت ترانسپورترهای Na^+ transporter در تحمل به شوری این جایگاه نقش مهمی در تحمل به شوری در گیاه جو دارد و می‌تواند هدف مطالعات انتقال ژن جهت تولید جو متتحمل به شوری باشد. همچنین با توجه به وزن خشک و تر ریشه بیشتر و واکنش مناسب لاین امید بخش به شوری در این مکان ژنی، این ژنوتیپ در مقایسه با Sahara3771 می‌تواند جهت معرفی برای کشت در مناطق شور مورد هدف باشد. همچنین به نظر می‌رسد تحت تنش طولانی مدت گیاه با افزایش میزان ناقلین Na^+ سعی در تجمعی هرچه بیشتر یون‌های Na^+ ورودی در واکوئل‌ها و کاهش اثرات آن‌ها بر سلول دارد. بیان ژن NHX1 از اعضای خانواده ترانسپورترهای Na^+ تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار NaCl در لاین امید بخش در مقایسه با Sahara3771 افزایش ۷ برابری نشان داد (Ghaffarian et al. 2015).

در مجموع با توجه به کاهش بیان ژن Na^+ transporter در اولین نمونه برداری و افزایش آن در آخرین نمونه برداری به نظر می‌رسد گیاه به تدریج توانسته خود را با شرایط سازگار و با اثرات ناشی از تنش مقابله کند بطوریکه تحت تنش شدیدتر بیان آن بیشتر بود. با توجه به واکنش متفاوت ژنوتیپ‌های متتحمل و حساس به شوری به نظر می‌رسد این ژن از نقاط کلیدی در پاسخ به شوری باشد. همچنین با توجه به افزایش بیان ژن تحت تنش ۲۰۰ میلی مولار NaCl در مقایسه با تنش ۱۰۰ میلی مولار NaCl

در هر سه زمان نمونه برداری و بویژه در ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری بیان ژن در مقایسه با شاهد کاهش معنی داری داشت. اما تحت تنش ۲۰۰ میلی مولار NaCl و در هر سه مرحله نمونه برداری میزان بیان ژن در لاین امیدبخش با اختلاف معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بود. بطوریکه در زمان‌های سه روز و سه هفته پس از اعمال شوری ۲۰۰ میلی مولار NaCl به ترتیب افزایش معنی دار دو و نیم و سه برابری در بیان ژن نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. به نظر می‌رسد با افزایش شدت شوری فعال سازی این ژن یکی از راهکارهای گیاه در مقابله با اثرات مخرب تنش باشد.

کاهشندی یون‌های Na^+ درون واکوئل‌ها نه تنها از اثرهای مخرب آن‌ها در سیتوپلاسم جلوگیری می‌کند بلکه همچنین امکان استفاده گیاهان از یون‌های Na^+ به عنوان یک ماده تنظیم کننده پتانسیل اسمزی را فراهم می‌کند. با این وسیله گیاهان امکان حفظ پتانسیل اسمزی و ادامه جذب آب به درون سلول‌ها را به دست می‌آورند. بنابراین، آنتیپورترهای Na^+ transporter نقش‌های مهمی در پاسخ گیاهان به تنش شوری دارند. توالی DNA رمز کننده پروتئین‌های آنتی پورتر Na^+ در بیش از ۶۰ گونه گیاهی شامل بازدانگان و گیاهان دولپه و تک لپه نهان دانگان شناسایی شده‌اند. بیان اغلب این ژن‌ها توسط تنش شوری القا شد (Pardo et al. 2006).

تبادل Na^+/H^+ واکوئلی در آراییدوپسین توسط مسیر SOS کنترل می‌شود (Qiu et al. 2004). این مطالعه نشان داد بیان بالای Na^+ واکوئلی آراییدوپسین در گندم سبب بهبود تحمل آن به شوری می‌شود. خروج Na^+ از خلال غشای پلاسمایی توسط یک آنتی پورتر Na^+/H^+ گندم (*TaSOS1*) اثبات شده است (Xu et al. 2008). همچنین یک آنتی پورتر گندم Na^+/H^+ ، باعث ایجاد تحمل به تنش شوری در گیاهان آراییدوپسین تاریخته با این ژن گردید (Brini et al. 2007). گیاهان آراییدوپسین دارای فوق بیان *AtNHX1* از آنتی پورترهای واکوئلی در مقایسه با تیپ وحشی نسبت به شوری متتحمل تر بودند. همچنین گیاهان تاریخته با این ژن تحت تنش شوری توانایی Na^+ بیشتری در واکوئل‌ها داشتند. در تایید این یافته‌ها گیاهان جهش یافته برای این ژن حساسیت بیشتری به شوری نشان دادند (Apse et al. 1999).

این جایگاه ژنی در پاسخ به سطوح بالاتر شوری نقش دارد و ترانسپورترهای Na^+ transporter تحت غلظت‌های بالای نمک‌ها فعال می‌شوند.

منابع

- Al-Karaki GN.** 2001. Germination, sodium, and potassium concentrations of barley seeds as influenced by salinity. *Journal of Plant Nutrition* 24: 511-522.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E.** 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ -antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Blumwald E, Poole R.** 1987. Salt-tolerance in suspension cultures of sugar beet. Induction of Na^+/H^+ -antiport activity at the tonoplast by growth in salt. *Plant Physiology* 83: 884-887.
- Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz G, Masmoudi K.** 2007. Overexpression of wheat Na^+/H^+ antiporter TNHX1 and H^+ pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* 58: 301-308.
- Bustin SA.** 2002. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 23-39.
- FAO.** 2014. Faostat FAO Rome. www.faostat.fao.org.
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y.** 2004. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice. *Plant and Cell Physiology* 45: 149-159.
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR.** 1999. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 1480-1485.
- Ghaffarian S, Mohammadi SA, Toorchi M, Omidi Y.** 2015. Quantitative gene expression analysis of NHX1 and HvPIP2;1 in barley (*Hordeum vulgare* L.) under salinity stress. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 7: 207-219
- Glenn EP, Brown JJ, Blumwald E.** 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 227-256
- Greenway H.** 1965. Plant response to saline substrates, Growth and ion uptake throughout plant development in two varieties of *Hordeum vulgare*. *Australian Journal of Biological Sciences* 18: 763-779.
- Harlan JR, Zohary D.** 1966. Distribution of wild wheats and barley. *Science* 153: 1074-1080.
- Heenan DP, Lewin LG, McCaffery DW.** 1988. Salinity tolerance in rice varieties at different growth stages. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 28: 343-349.
- Ligaba A, Katsuhara M.** 2010. Insights into the salt tolerance mechanism in barley (*Hordeum vulgare*) from comparisons of cultivars that differ in salt sensitivity. *Journal of Plant Research* 123: 105-118.
- Maas EV, Poss JA.** 1989. Salt sensitivity of cowpea at various growth stages. *Irrigation Science* 10: 313-320.
- Maathuis FJM.** 2006. The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *Journal of Experimental Botany* 57: 1137-1147.
- Munns R, Tester M.** 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Plant Biology* 59: 651-681.
- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ.** 2006. Alcalication exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 57: 1181-1199.
- Parvaiz A, Satyawati S.** 2008. Salt stress and phyto biochemical responses of plants. *Plant and Soil Journal* 54: 89-99.
- Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 1-45.
- Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK.** 2004. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 207-215.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 217-223.
- Tester M, Davenport R.** 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.
- Widodo PJH, Patterson JH, Newbiggin E, Tester M, Bacic A, Roessner U.** 2009. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany* 60: 4089-4103.
- Xu HX, Jiang XY, Zhan KH, Cheng XY, Chen XJ, Pardo JM, Cui D.** 2008. Functional characterization of a wheat

- plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473: 8-15.
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM.** 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal* 30: 529-539.
- Zhang HX, Blumwald E.** 2001. Transgenic salt tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 19: 765-768
- Zhang HX, Hodson J, Williams JP, Blumwald E.** 2001. Engineering salt tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 12832-12836.
- Zhang HX, Blumwald E.** 2001. Transgenic salt tolerant

Quantitative gene expression pattern analysis of Na⁺ Transporter in barley under salinity stress

Sara Ghaffarian¹ and Seyyed Abolghesem Mohammadi^{*2}

1. Assistant Professor of Biology Department, Faculty of Natural Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Maragheh Road, Iran

2. Professor of Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author: sa_mohammadi@yahoo.com

Abstract

Salinity is one of the important abiotic stresses which affecting growth and performance of plants. A Plant's response to salinity depends on the genotype, salt intensity and duration of the stress. Plant sodium transporter activity is the most important salt tolerance mechanism in plants. In the present study, the expression pattern of the Na⁺ transporter gene was investigated in roots of three barley genotypes (Sahara3771, an Iranian advanced line (A line) as a salt-tolerant cultivar and Clipper as salt-susceptible) by quantitative real-time-PCR. The plants were exposed to 0, 100 and 200 mM NaCl at the seedling stage and root samples were harvested 24 hours, 3 days and 3 weeks after salt treatment. Also, root length, wet and dry weight were measured. The results indicated that root fresh and dry weight decreased with increasing salt concentration and duration of treatment. Analysis of variance revealed significant differences of Na⁺ transporter gene expression among the genotypes with respect to salinity levels and sampling stages. Salinity x genotype, salinity x sampling stage, genotypes x sampling stage and salinity x genotype x sampling stage were all significant. Increased expression of the gene was associated with salt tolerance in the genotypes. In response to 100 and 200 mM NaCl, the mRNA level of Na⁺ transporter gene decreased in Clipper. In Sahara3771 and the A-Linen gene expression decreased and increased respectively in response to 100 and 200 mM NaCl. Under 200 mM NaCl treatment, gene expression in A-Line increased more strongly than in Sahara3771. The results suggest that in these genotypes, salinity tolerance is related to greater ability to sequester Na⁺ into sub-cellular compartments.

Key words: Barley, Salinity, Gene expression, Stress duration, Na⁺ transporter gene