مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۶
صفحه ۱۱۶-۱۰۵

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 Ghaffarian[1] 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

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد و عملکرد گیاهان را تحت تاثیر قرار می-دهد. 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 متحمل 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 قرار 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 کاهش یافت. بیان ژن در Sahara3771 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. احتمالا تحمل این ژنوتیپ-ها به شوری در ارتباط با توانایی بالای آن‌ها در تجمع دادن یون‌های Na^+ در واکوئل‌ها است.

واژه‌های کلیدی

**جو،
شوری،
الگوی بیان ژن،
طول مدت تنش،
ژن *Na^+ transporter***

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

مقدمه

جو از خانواده‌ی 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 بویژه شوری اهمیت اقتصادی زیادی در نواحی خشک و نیمه خشک متاثر از شوری دارد (Al-Karaki 2001). همچنین جو به دلیل چرخه زندگی نسبتا کوتاه و خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و ژنتیکی مناسب به عنوان گیاه مدل در آزمایش‌های مختلف استفاده می‌شود (Harlan and Zohary 1966).

شوری خاک از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی بویژه 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 وارده 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 به‌ویژه یون‌های سدیم (Na^+) و کلر (Cl^-) است. این یون‌ها اغلب در واکوئل‌ها ذخیره می‌شوند و این امر با آزاد شدن یون‌های پتاسیم (K^+) همراه است. غیر از تنش آبی سریع، افزایش غلظت نمک‌هایی نظیر Cl^- و بویژه 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 نظیر پتاسیم (K^+) و کلسیم (Ca^{+2}) دارد. اثر متقابل بین Ca^{+2} و اجزای سلولی به حضور بیش از حد کاتیون‌هایی نظیر Na^+ حساس است و نسبت مولی بالای Na^+ به Ca^+ موجب تفکیک Ca^{+2} از جایگاه‌های اتصال آن شده، یکپارچگی دیواره و غشاهای سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. حضور K^+ در سیتوسول برای فعال سازی بسیاری آنزیم‌ها مورد نیاز است. به دلیل تشابهات فراوان فیزیوشیمیایی 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).

یک ویژگی ساختاری متمایز کننده سلول‌های گیاهی داشتن واکوئل است. بر اساس مطالعات بیوشیمیایی 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 *Na^+ transporter* به عنوان آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ شناخته شده‌اند. از این خانواده ژن‌های *Na^+ 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 *Na^+ transporter* در تونوپلاست و انتقال پروتون وابسته به Na^+ را با فوق بیان این ژن در گیاهان آرابیدوپسس به لحاظ بیوشیمیایی 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 نقش سوبستراها و یا محصولات این ژن‌ها در طول تنش شوری در ارتباط باشد. آنتی پورترهای کاتیون–پروتون از جمله ناقلین کاتیون القا شده‌ی دارای نقش در انتقال کاتیون‌های غیرآلی هستند. این رونوشت‌ها با اعمال شوری تغییرات بیش از سه برابری 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 آرابیدوپسس منجر به شناسایی ژن آنتی پورتر Na^+/H^+ گیاهی و ۵ همولوگ دیگر آن در آرابیدوپسس شد (Apse *et al.*,1999). این ژن همولوژی بالایی با آنتی پورترهای Na^+/H^+ از مخمر، نماتدها و انسان نشان داد (Gaxiola *et al.* 1999).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

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 آرابیدوپسس با فوق بیان *Na^+ transporter* نسبت به تیپ وحشی فنوتیپ متحمل‌تری به شوری نشان دادند و در گیاهان تراریخته 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 *Atnhx1*، 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 زیرزمینی 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 Devenoper 2003). با وجود تنوع بالا در تحمل شوری در گیاهان فاکتورهای ژنتیکی و مولکولی اساسی درگیر در این مکانیسم کاملا 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 Sahara3771، Clipper و لاین امید بخش، تعیین الگوی بیان ژن 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، Sahara3771 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 Sahara3771 و Clipper 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 بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و در سه سطح شاهد، شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار 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 هوگلند نصف غلظت و سپس با محلول هوگلند کامل مورد آبیاری قرار

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

گرفتند. آبیاری توسط سیستم اتوماتیک انجام گردید. پس از استقرار گیاهچه‌ها با توجه به اینکه 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 ۲۴ ساعت تحت شوری ۵۰ میلی مولار، سپس تحت تیمار ۱۰۰ میلی مولار و ۲۰۰ میلی مولار NaCl قرار گرفتند. به منظور نگهداری نسبت غلظت Na^+/Cl^- به میزان ۱:۱۰ در سطح مولی از CaCl2 استفاده شد. آزمایش در شرایط کاملا کنترل شده گلخانه تحت شرایط دمایی ۲۸°C در روز و ۱۸°C در شب، با فتوپریود ۱۸ساعت 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 میکرولیتر و با استفاده از کیت Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit انجام گرفت.

به منظور بررسی بیان نسبی 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، ۴۰-۳۵ 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 در۷۲°C درجه به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتا 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 (Pfaffl 2001) ΔΔCt محاسبه شد. داده‌های حاصل با استفاده از 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.

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'AGTGTCCTGTCCACCCACTC R: 5'AGCATGAAGTGGATCCTTGG	۶۵

نتایج و بحث

تاثیر 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، Clipper و لاین امید بخش مورد مطالعه تحت شرایط نرمال و 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی اندازه گیری شده در ارقام جو Clipper، Sahara3771 و لاین امید بخش 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

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

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

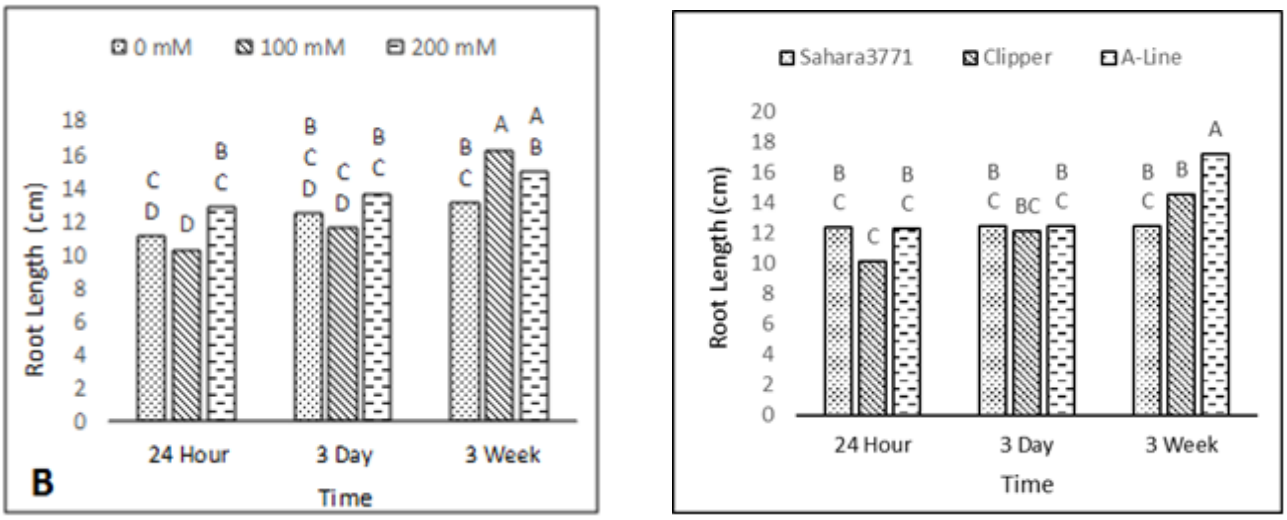
ریشه بود. همچنین تفاوت بین مراحل نمونه برداری از نظر صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود. اثر متقابل شوری در مرحله نمونه برداری و ژنوتیپ در مرحله نمونه برداری برای طول، وزن تر و وزن خشک ریشه معنی‌دار بود. همچنین اثر سه جانبه شوری×ژنوتیپ×زمان نمونه برداری برای وزن تر و خشک ریشه معنی‌دار و برای طول ریشه غیر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

تحت تیمار شاهد و ۱۰۰ میلی مولار NaCl با پیشرفت مراحل نمونه برداری شاهد افزایش طول ریشه بودیم و حداکثر 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 ۱-A). به نظر می‌رسد تنش شدید باعث کندی رشد شده است. در ژنوتیپ 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 هفته در ژنوتیپ‌های Clipper و بویژه لاین امیدبخش معنی دار و بیشترین طول ریشه متعلق به لاین امیدبخش بود (شکل ۱-B).

اثر متقابل سه جانبه ژنوتیپ×شوری×مرحله نمونه برداری برای وزن تر ریشه معنی‌دار 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

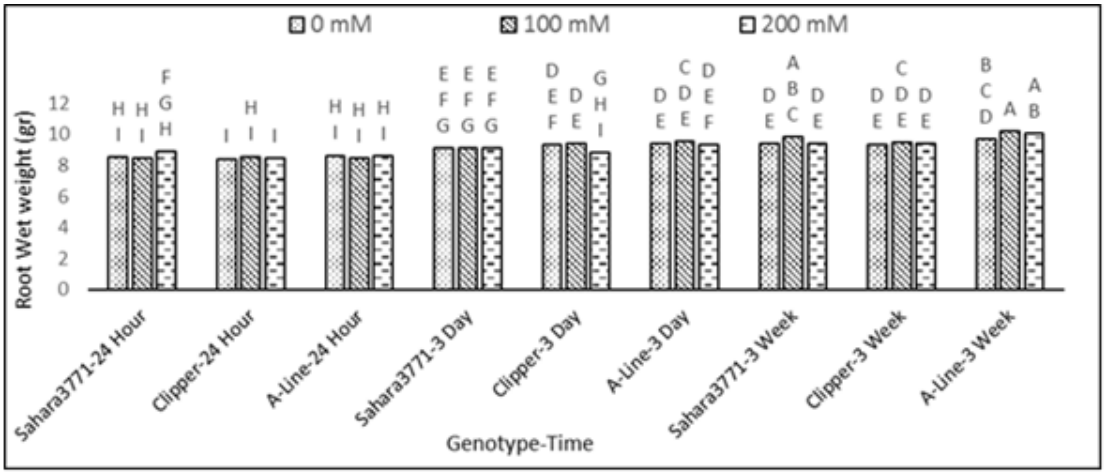


شکل ۱- مقایسه میانگین طول ریشه برای ترکیبات تیماری ژنوتیپ×زمان نمونه برداری (A) و شوری×زمان نمونه برداری (B)

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

اختلاف بین تیمارهای شوری از نظر وزن تر ریشه در مرحله سه هفته بیشتر بود. همچنین اختلاف Sahara3771 و لاین امیدبخش بین تیمارها در مقایسه با شاهد بیشتر بود.

اثر متقابل سه جانبه ژنوتیپ×شوری×مرحله نمونه برداری برای وزن خشک ریشه نیز معنی‌دار 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. 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.

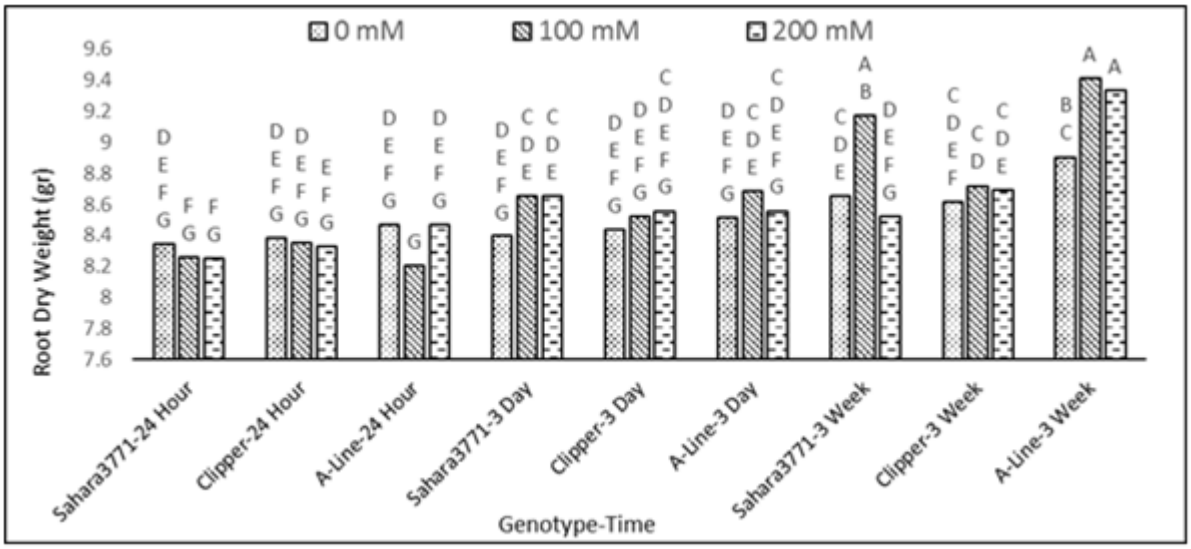


شکل ۲- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ژنوتیپ در شوری در مرحله نمونه برداری برای وزن تر ریشه

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

اثر متقابل سه جانبه ژنوتیپ×شوری×مرحله نمونه برداری برای وزن خشک ریشه نیز معنی‌دار 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. 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.



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

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 تاثیر شوری بر گیاهان بازدارندگی رشد است (Tester and Devenoper 2003). نتایج نشان دادند رشد ریشه بویژه تحت تنش طولانی مدت در لاین امید بخش و Sahara3771 کمتر از Clipper تحت تاثیر شوری قرار گرفت هرچند این دو ژنوتیپ تفاوت‌هایی در پاسخ به شوری نشان دادند. Widodo (1999) با مقایسه دو ژنوتیپ Sahara3771 و Clipper در شرایط هیدروپونیک گزارش کردند که Sahara3771 کمتر تحت تاثیر 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.

تاثیر 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

شوری و بر مبنای اختلاف بیان ژن‌ها بین ترکیبات سطوح شوری ۰-۲۰۰، ۰-۱۰۰ و ۱۰۰-۲۰۰ 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 ژنوتیپ‌ها و زمان-های نمونه برداری نیز در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. اثرات متقابل شوری×ژنوتیپ، شوری×زمان نمونه برداری، ژنوتیپ×زمان نمونه برداری و شوری×ژنوتیپ×زمان نمونه برداری معنی دار بودند. اثر متقابل سه جانبه ژنوتیپ×شوری×زمان نمونه برداری برای ژن *Na^+ transporter* مورد بررسی قرار گرفت (شکل۴). میزان ضریب تغییرات برای بیان این ژن برابر با ۲۶/۲۶ درصد بود.

جدول ۳- تجزیه واریانس 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 شوری و بر مبنای اختلاف بیان ژن‌ها بین ترکیبات سطوح شوری ۰-۲۰۰، ۰-۱۰۰ و ۱۰۰-۲۰۰ میلی مولار NaCl

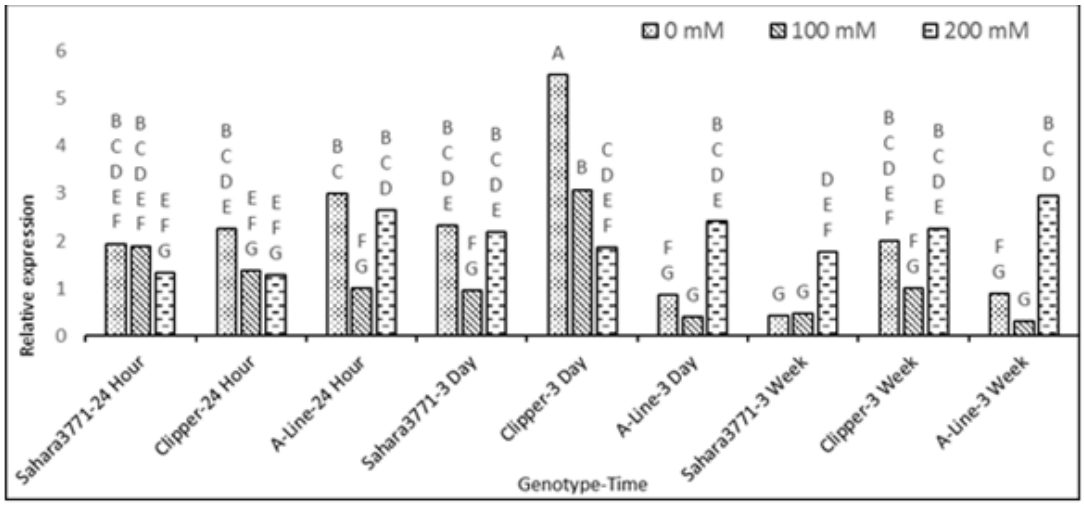
Table 3. Variance analysis of *Na^+ Transporter* gene expression in Sahara3771, Clipper and A-Line at 24 hours, 3 Days and 3 weeks after 0, 100 and 200 mM salt treatment

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

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]



شکل ۴- تغییرات 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 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

در دو زمان ۲۴ ساعت و سه روز پس از اعمال تنش شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl بیان ژن *Na$^+$ transporter* در Clipper 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 تنش ۱۰۰ میلی مولار NaCl بیان ژن در Clipper کاهش یافت. اما تحت تنش 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 NaCl در مقایسه با Clipper کمتر بود. در این ژنوتیپ سه هفته پس از اعمال شوری میزان بیان ژن تحت تنش 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). در دو مرحله اول نمونه برداری Sahara3771 متحمل به شوری در مواجهه با تنش 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 ژنوتیپ 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 تنش شوری تعداد رونوشت ژن‌های *HvNHX1*، *HvNHX3* و *HvNHX4* از دیگر اعضای خانواده *Na$^+$ transorter* در ریشه ژنوتیپ متحمل به شوری بسیار بیشتر از تعداد رونوشت آنها در ریشه ژنوتیپ‌های حساس به شوری بود. آن‌ها عملکرد بهتر ارقام متحمل به شوری را در مقابله با تنش در ارتباط با توانایی بیشتر آن در جداسازی یون های Na^+ به درون اندامک های سلولی دانستند.

تحت تنش 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 تنش ۱۰۰ میلی مولار

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

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.

کده‌بندی 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 آرابیدوپسس توسط مسیر SOS کنترل می‌شود (Qiu *et al*. 2004). این مطالعه نشان داد بیان بالای *Na^+ transporter* واکوئلی آرابیدوپسس 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). هچنین یک آنتی پورتر گندم Na^+/H^+، باعث ایجاد تحمل به تنش شوری در گیاهان آرابیدوپسس تراریخته با این ژن گردید (Brini *et al*. 2007). گیاهان آرابیدوپسس دارای فوق بیان *AtNHX1* از آنتی پورترهای واکوئلی در مقایسه با تیپ وحشی نسبت به شوری متحمل‌تر بودند. همچنین گیاهان تراریخته با این ژن تحت تنش شوری توانایی جداسازی 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).

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 دیواره‌های 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 متحمل به شوری، حفظ بیان آن در مقادیر برابر با آن بیان تحت تیمار شاهد ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش ۲۰۰ میلی مولار NaCl، افزایش بیان 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 متحمل 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 تجمیع 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 متحمل 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

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 grown 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, Newbigin 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]

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.

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

Sara Ghaffarian[1] 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.9.1]