

Investigation of relative expression of candidate genes related to salinity tolerance at seedling stage of rice using real-time PCR

Leila Nayyeripasand

PhD Candidate, Plant-Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Email: lnayyeri@gmail.com

Ghasem Ali Garoosi 

*Associated Professor, Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. agaroosi90@yahoo.com

Asadollah Ahmadikhah 

Assistant Professor, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshi, Iran. Email: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

Abstract

Objective

Rice is a food source for more than half of the world's population and it is important as a model plant for monocots, and also its growth and yield is strongly affected by salinity stress, hence comprehensive research is essential for the development of salt tolerant varieties. In the present study, the expression pattern of several new genes involved in salt tolerance of rice was investigated by Real-Time PCR in sensitive (ARC6578 and Shoemed) and tolerant (Bombilla) rice cultivars.

Materials and methods

RNA samples were extracted from 20-day-old seedlings treated with NaCl (100 mM) at three times of 24, 48 and 72 h after salt stress. Gene expression analysis was performed on 7 candidate genes (including SOD, CatA, 14-3-3 like protein GF14, Peroxidase BP1 precursor, Zinc ion binding protein and Plasma Membrane H⁺-ATPase, OsSIPK) using real-time PCR. The Actin gene was used as the reference gene.

Results

The expression of OsSIPK in tolerant cultivar was increased 24 and 48 h after salt stress and was decreased 72 h after stress, while the expression of Zinc ion binding protein was decreased in all cultivars at all times after stress. The expression of PM H⁺-ATPase at early times after stress in both tolerant and sensitive cultivars was increased but it decreased after 72 h in sensitive cultivar and increased in tolerant cultivar. The expression of 14-3-3 like protein GF14-6 was highly increased at 48 h after stress but it was decreased after 72 h in sensitive cultivars and increased in tolerant cultivar. The expression of Peroxidase BP1 precursor was increased up to 40 times at 72 h after stress in tolerant cultivar. The expression of CatA was significantly increased at 72 h after stress only in tolerant cultivar. The expression of SOD didn't show a special time pattern, although its expression in tolerant cultivar was higher than that in sensitive cultivar at 72 h after stress.

Conclusions

Some genes in this research did function in general response of the rice plant to salt stress via scavenging the reactive oxygen species (ROS) (such as SOD and CatA). In another hand, a time-cultivar dependent relationship between salt tolerance and expression level of other studied genes (such as OsSIPK, PM H⁺-ATPase, 14-3-3 like protein GF14-6 and Peroxidase BP1) could be recognized.

Keywords: Candidate Gene, Gene Expression, Sensitive, Stress Response, Tolerant.

Citation: Nayeripasand L, Garoosi G, Ahmadikhah A (2020) Investigation of Relative Expression of Candidate Genes Related to Salinity Tolerance at Seedling Stage of Rice Using Real-time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (2), 129-156.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (2), 129-156.

DOI: 10.22103/jab.2020.15793.1230

Received: April 29, 2020; Accepted: May 29, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی الگوی بیان نسبی ژن‌های کاندیدای تحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای برنج با

استفاده از پی‌سی‌آر در زمان واقعی

لیلا نیری پسند

دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی-کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

ایمیل: lnayyeri@gmail.com

قاسمعلی گروسی

* نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم و زیست فناوری گیاهی-کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران. تلفن:

۰۹۱۲۸۸۲۷۸۶۷، ایمیل: agaroosi90@yahoo.com

اسداله احمدی خواه

استادیار گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. ایمیل:

a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۹

چکیده

هدف: با توجه به این که برنج منبع تغذیه بیش از نیمی از مردم جهان است. همچنین رشد و عملکرد این گیاه به شدت تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرد، تحقیق برای توسعه وارپته‌های متحمل به شوری امری ضروری است. لذا در این پژوهش، الگوی بیانی هفت ژن دخیل در تحمل به شوری با روش پی‌سی‌آر در زمان واقعی در ارقام برنج حساس ARC6578 (#6) و (#178) Shoemed و متحمل Bombilla (#48) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: نمونه RNA از گیاهچه‌های ۲۰ روزه برنج تحت تیمار NaCl (۱۰۰ میلی‌مولار) در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری استخراج شد. بررسی بیان ژن بر روی هفت ژن کاندیدا (شامل ژن‌های 3-14, Cat1, SOD, Plasma membrane H⁺- Zinc ion binding protein, Proxidase BP1 precursor, 3 like protein GF14, ATPase و OsSIPK) با روش پی‌سی‌آر در زمان واقعی انجام شد. از ژن اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد.

نتایج: بیان ژن OsSIPK در رقم متحمل، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تنش افزایش و ۷۲ ساعت بعد از تنش شوری کاهش یافت در حالی که بیان ژن Zinc ion binding protein در تمام ارقام و در همه ساعات پس از تنش کاهش بود. بیان ژن PM H⁺- ATPase در ساعات اولیه پس از تنش در هر دو رقم حساس و متحمل افزایش یافت ولی با گذشت ۷۲ ساعت از تنش بیان این

ژن در رقم حساس کاهش و در رقم متحمل افزایش یافت. بیان ژن *GF14-6 like protein* 3-3-14 ۴۸ ساعت پس از تنش در هر دو رقم حساس و متحمل به شدت افزایش یافت ولی با گذشت ۷۲ ساعت از تنش بیان این ژن در رقم حساس کاهش و در رقم متحمل افزایش یافت. بیان ژن *Similar to Peroxidase BP1 precursor* ۷۲ ساعت پس از تنش در رقم متحمل حدود ۴۰ برابر افزایش یافت. بیان ژن کاتالاز ۷۲ ساعت پس از تنش فقط در رقم متحمل افزایش معنی‌دار نشان داد. بیان ژن SOD از الگوی زمانی خاصی تبعیت نکرد هرچند بیان آن ۷۲ ساعت پس از تنش در رقم متحمل بیشتر از ارقام حساس بود.

نتیجه‌گیری: برخی ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق با حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در پاسخ عمومی گیاه به تنش شوری نقش دارند (مانند ژن‌های SOD و CatA). از طرفی بین تحمل به شوری و میزان بیان برخی دیگر از ژن‌های مورد مطالعه می‌توان نوعی ارتباط وابسته به رقم-زمان را تشخیص داد (مانند ژن‌های OsSIPK، PM H⁺-ATPase، 3-3-14 *like protein* GF14-6 و Peroxidase BP1).

کلمات کلیدی: بیان ژن، پاسخ به تنش، حساس، ژن کاندیدا، متحمل.

مقدمه

در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) مهم‌ترین مکانیسم‌های مولکولی در شرایط عادی و مواجهه با تنش‌های محیطی هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی^۱ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidinejad et al. 2015). بیان ژن توسط محیطی که گیاه در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی به صورت موقت و چندجانبه کنترل می‌شود. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده و سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی، مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016).

^۱. DNA

تنش شوری روی بیش از نصد میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی سراسر جهان تاثیر می‌گذارد و منجر به کاهش عملکرد آنها می‌شود (Akhlaur Rahman et al. 2016). امروزه مناطق شور و زمین‌های تحت تاثیر نمک به علت تغییرات آب و هوایی افزایش یافته است (Islam et al. 2019). طبق یک تخمین تا ۵۰ درصد از اراضی زراعی موجود ممکن است تا سال ۲۰۵۰ تحت تاثیر شوری قرار گیرد (Shefali et al. 2016). برنج (*Oryza sativa* L.) منبع تغذیه بیش از ۵۰ درصد مردم جهان محسوب می‌شود (Xu et al. 2016) و به دلیل کوچک بودن اندازه ژنوم (حدود 430 Mbp) به عنوان یک گیاه مدل برای تک‌لپه‌ای‌ها و همچنین یک گیاه مهم برای مطالعات ژنتیکی و ژنومیکی انتخاب شده است. ژنوم برنج در مقایسه با غلات دیگر (ذرت 2400 Mbp، جو 4900 Mbp و گندم 16000 Mbp) کوچک است (Bennetzen 2002; Sasaki & Sederoff 2003). برنج یک گیاه حساس به شوری است (Grover & Pental 2003)، میزان تحمل به شوری در برنج در مراحل مختلف رشدی متفاوت است. برنج در مرحله جوانه‌زنی نسبت به خشکی و شوری متحمل است ولی مراحل گیاهچه‌ای، گرده‌افشانی و شروع خوشه‌دهی حساس‌ترین مراحل به تنش شوری در این گیاه محسوب می‌شوند که منجر به کاهش عملکرد برنج می‌گردد (Zeng et al. 2001; Ganguly et al. 2012; Shankar et al. 2016). عملکرد گیاه برنج تحت تنش شوری $EC=6 \text{ dSm}^{-1}$ در اکثر واریته‌های با عملکرد بالا، تقریباً نصف می‌شود و در $EC=12 \text{ dSm}^{-1}$ گیاه هیچ‌گونه عملکردی ندارد (Mishra et al. 2016). تحمل به شوری یک صفت ژنتیکی است که توسط چندین جایگاه ژنی کنترل می‌شود (Fan et al. 2013). در پژوهشی Benitez et al. (2013) وقتی رونوشت‌های برنج را تحت تنش شوری مورد ارزیابی قرار دادند، ۹۵۳ ژن پاسخگو به تنش شوری را شناسایی کردند. تنش شوری در برنج باعث افزایش محتوای H_2O_2^1 در برگ‌ها می‌شود و ضمن کاهش فعالیت کاتالاز (CAT^2)، باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD^3) و اسکوربات پراکسیداز (APX^4) می‌شود (Lee et al. 2001). این سه، جزو آنزیم‌های اصلی هستند که در همه‌جای سلول موجود بوده و امکان کنترل شدید سطوح ROS^5 را از طریق حذف مستقیم ROS و تبدیل آن‌ها به موادی با واکنش‌پذیری کمتر و مولکول‌هایی با زبان کمتر فراهم می‌سازند. بنابراین مطالعه تغییرات در بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به منظور درک مکانیسم تحمل به تنش شوری در برنج حائز اهمیت است. پروتئین‌های ۳-۳-۱۴ از یک خانواده بزرگ با اندازه کوچک (تقریباً 30kD) می‌باشند (Paul et al. 2009). ۳-۳-۱۴ها پروتئین‌های تنظیمی حفاظت شده متصل شونده به فسفوپپتیدها هستند (Finnie et al. 1999).

1. Hydrogen peroxide

2. Catalase

3. Superoxide dismutase

4. Ascorbate peroxidase

5. Reactive oxygen species

نقش خانواده H^+ -ATPase غشای پلاسمایی (Plasma membrane H^+ -ATPase) در هنگام تنش، ایجاد و نگهداری هموستازی یون‌های سلولی می‌باشد. فعالیت این آنزیم توسط پروتئین‌های ۳-۳-۱۴ تنظیم می‌شود (Svennelid et al. 1999). خانواده H^+ -ATPase غشای پلاسمایی، فرآیند انتقال فعال اولیه را در سلول کنترل می‌کند و با خارج کردن هیدروژن سیتوپلاسم از غشا پلاسمایی شرایط لازم را در جذب مواد غذایی، رشد سلول‌ها، باز شدن روزنه‌ها و تحمل در برابر تنش فراهم می‌سازد. تحقیقاتی در زمینه این ژن در غلات از جمله گندم و برنج و در آرآبیدوپسیس صورت گرفته است (Roy et al. 2005; Ayala et al. 1997; Vitart et al. 2001; Gévaudant et al. 2007; Morgan et al. 2014; Chen et al. 2016; Falhof et al. 2015). مقایسه بیان ژن H^+ -ATPase غشای پلاسمایی در گیاه گلکوفیت (*Nicotiana tabacum* L. var Wisconsin) و هالوفیت (*Atriplex nummularia* L.) در شرایط تنش شوری با القای NaCl نشان داد که تجمع mRNA مربوط به ژن H^+ -ATPase در ریشه گیاه هالوفیت از گلکوفیت بیشتر بود (Niu et al. 1993, 1995). شاید افزایش ظرفیت گیاه هالوفیت برای القای بیان ژن H^+ -ATPase غشای پلاسمایی در پاسخ به NaCl یک عامل تعیین کننده تحمل به شوری باشد. در این تحقیق نشان داده شده است که بافت‌های متفاوتی در تنظیم و جذب سدیم و کلر نقش دارند و تجمع سدیم در برگ‌های قدیمی رخ می‌دهد و این تجمع در غلاف برگ بیشتر از پهنک صورت می‌گیرد. اعضای خانواده PM H^+ -ATPase نقش کاملاً شناخته شده‌ای در تحمل به تنش‌های غیرزیستی از قبیل سرما (Martz et al. 2006; Iswari & Palta 1989)، خشکی (Gong et al. 2010, Du et al. 2015) و باران اسیدی (Liang et al. 2015) دارند. مطالعات زیادی بر روی اهمیت PM H^+ -ATPase در پاسخ به تنش شوری در آرآبیدوپسیس و غلات از جمله گندم و برنج صورت گرفته است (Roy et al. 2005; Ayala et al. 1997; Vitart et al. 2001; Gévaudant et al. 2007; Morgan et al. 2016; Falhof et al. 2015; Chen et al. 2014). خانواده Zinc ion binding protein در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک نقش دارند. عنصر روی (Zn) برای رونویسی ژن و هماهنگی سایر فرآیندهای بیولوژیکی - که به وسیله پروتئین‌های حاوی موتیف انگشت روی متصل شونده به OsSIPK، CatA، DNA Cu/ZnSOD (Rhodes & Klug 1993)، انگشت RING¹ و دامین LIM² (Vallee & Falchuk 1993) تنظیم می‌شوند - از اهمیت حیاتی برخوردار است. اگر چه نتایج به دست آمده تحت تنش شوری از رونوشت‌های ژن توسط تکنیک ریزآرایه بسیار وسیع است، در تحقیقات، بعضی از ژن‌ها به عنوان "کاندیدا" انتخاب می‌شوند تا در آزمایش‌های خاص‌تر برای تعیین سطح بیان ژن در پاسخ به تنش اعتبارسنجی شوند. در مطالعه‌ای (Dai Yin et al. 2005) با استفاده از تکنیک ریزآرایه از بین ۹۰۰۰ ژن حدود ۴۵۰ ژن در ساقه برنج رقم نونابکرا (متحمل به شوری) بیان افتراقی معنی‌داری نشان دادند که بیشتر آنها جدید بودند. همچنین بررسی ترانسکریپتوم

1. RING fingers

2. LIM domains

ریشه برنج تحت تنش شوری منتج به شناسایی ژن‌های جدید در مسیر فیتوهورمونی و پاسخ آنتی‌اکسیدانتی شد (Kim et al. 2014). آنالیز توالی‌یابی RNA در برموداگراس به شناسایی ژن‌های کاندیدا از دسته‌های مختلف عملکردی (شامل فاکتورهای رونویسی دخیل در بیوستنز لیگنین و یک سری از پراکسیدازهای دخیل در حذف گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)) منتج شد (Hu et al. 2015). در این مطالعه بیان نسبی برخی ژن‌های کاندیدا در پاسخ به تنش شوری شامل CatA، Cu/ZnSOD، OsSIPK، Peroxidase BP1، Zinc binding protein، Plasma membrane H⁺-ATPase، 14-3-3 like، protein GF14-6 با روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. درک دقیق پاسخ برنج به تنش شوری با استفاده از بررسی بیان ژن‌ها، پیش‌نیازی برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی-فیزیولوژی تحمل به تنش شوری در برنج است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: سه رقم برنج (دو رقم حساس و یک رقم متحمل به شوری؛ تهیه شده از موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج در فیلیپین) بر اساس مطالعات قبلی (Nayyeripasand et al. 2019) جهت آزمایش انتخاب شدند. ارقام ARC6578 (#6) و Shoemed (#178) حساس و Bombilla (#48) متحمل به شوری می‌باشد. ابتدا بذور برنج با الکل اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه و متعاقباً به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ضدعفونی گردیده و ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور مرطوب، در کاغذ صافی استریل واتمن و داخل دستگاه ژرمیناتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز جوانه‌دار شدند. سپس بذور جوانه‌زده به محیط کشت هیدروپونیک حاوی محلول یوشیدا در ظروف پلاستیکی به ابعاد ۵۰×۳۰×۴۰ (Yoshida et al. 1976) منتقل گردیدند تا در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۶۰ درصد رطوبت نسبی و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شوند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمار شاهد (محیط نرمال بدون تنش) با سه تکرار شامل محلول یوشیدا (EC 2dS/m) معادل ۲۰ میلی‌مولار NaCl بود، درحالی‌که تیمار تنش با اضافه کردن NaCl (EC 10dS/m) معادل ۱۰۰ میلی‌مولار نمک) به محلول یوشیدا (Yoshida et al. 1976) اعمال شد. در طی مدت رشد گیاهچه‌ها، pH محلول هر روز بر روی ۵/۵ و شوری محیط بر روی ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر تنظیم گردید. همچنین هر سه روز در میان، محلول تازه تهیه شده و جایگزین محلول قدیمی می‌شد. گیاهچه‌های هر دو آزمایش تا روز ۱۲۰ام در شرایط بدون تنش رشد داده شدند. در تیمار شاهد محیط بدون اضافه کردن NaCl تا زمان نمونه‌برداری ادامه یافت ولی تیمار تنش با اضافه کردن NaCl (EC 10dS/m) از روز ۲۰ام به بعد اعمال گردید. نمونه‌گیری از برگ‌ها در زمان‌های مختلف بعد از تنش (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تنش) انجام شد. برای نمونه‌گیری برگ‌های جوان همراه با ساقه‌چه با قیچی استریل برداشت شده و روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA و PCR: RNA کل با استفاده از کیت RNX-plus شرکت سیناکلون از نمونه‌های برگ‌ی تحت شرایط نرمال و تنش در سه زمان مختلف پس از تنش شوری استخراج شد. جهت حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، از آنزیم DNase I شرکت فرمنتاز استفاده گردید. پس از تیمار RNAها با آنزیم DNase I جهت کنترل کیفیت و کمیت RNA، به ترتیب نمونه‌های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و نانودراپ، بررسی شدند. سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل کیت شرکت آریاتوس انجام گرفت. سپس cDNA کل ساخته شد و PCR با پرایمرهای ژن خانه‌دار OsActin جهت اطمینان از ساخته شدن cDNAها، انجام شد. چرخه دمایی PCR ژن اکتین در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. چرخه دمایی ژن خانه‌دار اکتین

Table 1. The temperature profile of the actin housekeeping gene

مرحله سوم (یک چرخه)	مرحله دوم (۳۲ چرخه)	مرحله اول (یک چرخه)			
3rd step (1 cycle)	2nd step (32 cycles)	1st step (1 cycle)			
طویل شدن نهایی Final extention	طویل شدن Extension	اتصال Annealing	واسرشتگی Denaturation	واسرشتگی اولیه Pre-denaturation	مرحله Step
72	72	55	94	94	دما (°C) Temperature (°C)
420	35-90	35	40	240	زمان (ثانیه) Time (s)

طراحی آغازگرها برای بررسی بیان ژن‌ها: در این تحقیق، از ژن خانه‌دار OsActin به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. همچنین، ژن‌های MPV17/PMP22, Similar to ZINC ion binding, Similar to Peroxidase BP و SOD, 1 precursor, 14-3-3 like protein GF14-6, Similar to plasma membrane H⁺-ATPase در آزمایش‌های بیان ژن لحاظ شدند. برای طراحی آغازگرها، ابتدا توالی کامل نوکلئوتیدی ژن‌های موردبررسی (از هر ژن چندین همولوگ) از NCBI بارگذاری شد و با استفاده از نرم‌افزار Bioedit 2007، هم‌ردیف‌سازی‌ها انجام شد. سپس، برای طراحی آغازگرها از نرم‌افزار Primer 3.0 (<http://primer3.ut.ee/>) استفاده شد. مشخصات آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مورد مطالعه و موقعیت آن‌ها در شماره دسترسی مربوطه در جدول (۲) آورده شده است.

جدول ۲. آغازگرهای طراحی شده، شماره دسترسی و اندازه محصول PCR برای بررسی بیان ژن

Table 2. Designed primers, accession numbers and PCR product sizes used to gene expression investigation

ژن	جایگاه	توالی پرایمرها (5'-3')	دمای ذوب	اندازه محصول
Gene	Locus	Primer sequences (5'-3')	TM	Product size (bp)
183	Os01g096600	GGACTGAAGGGAGGAAGAA	63	63
		CAAGGAGAGCCAAAACCAC		
201	Os06g019120	CACAGCAGCACAGAATGGA	61	59.5
		GCC		
		TTCGTGGTTTTAGGTTTAG		
175	OS04g046250	ATA ACC TGA CCC TGT GGA	62	62
		CTT		
		GAG CTT CCC TGA TCT CTT		
178	Os01g096300	CC	62	61
		GTA CGT CTA CTC CGT CGT		
		CAA G		
125	JX393051.1	CCT ACA GCA CCA AGC TCT	61	61
		CG		
		CCATCTTTTGTATGCATCCTA		
147	DQ058108.1	TTGT	61	60/5
		TAATTAAGTTACACATATGC		
		AGGCTC		
126	EU650177.1	GGGATCATCGGACTTCAAGG	61	60/3
		GAGATCAGGTGCTTATTGTA		
		GAATC		
		ATTACCTCATGAAGATCCTG		
		ACG		
		TCTCCATTTCTGGTCATAGT		
		C		

واکنش‌های Real-Time PCR: در بررسی بیان ژن یک رقم متحمل به شوری و دو رقم حساس انتخاب شدند و

جهت بررسی تغییرات احتمالی بیان ژن در شرایط تنش شوری، واکنش‌های Real-Time PCR برای هفت ژن در ۳ تکرار

طراحی شد. آزمایش‌های Real-Time PCR با استفاده از معرف سایبرگرین شرکت آریا طوس در دستگاه ترموسایکلر شرکت

ABI و در استریپ های ۸ تایی با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. اجزای مورد استفاده در واکنش طبق جدول (۳) با هم

ترکیب شده و در دستگاه با چرخه‌ی دمایی مندرج در جدول (۴) قرار داده شدند.

جدول ۳. اجزای مورد استفاده در واکنش‌های Real-Time PCR

Table 3. Reagents used in Real-Time PCR reactions

ماده	غلظت	مقدار
Reagents	Concentration	Volume (μL)
Master mix PCR	2X	5
Rox dye	100 μM	0.2
F Primer	10 μM	0.1
R Primer	10 mM	0.1
cDNA	10 nM	1
H ₂ O	-	3.6

جدول ۴. چرخه‌ها و دماهای مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR

Table 4. Cycles and temperatures used in Real-Time PCR reaction

تعداد چرخه	دما (°C)	زمان (ثانیه)
Cycles	Temperature (°C)	Time (s)
1	94	600
45	94	15
	58	35
	72	45

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بیان ژن: برای محاسبه بیان نسبی ژن از روش $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen 2001) استفاده شد.

در این روش، میزان بیان ژن‌های هدف با توجه به بیان ژن مرجع نرمال شد، سپس میزان تغییرات بیان ژن در تیمارها نسبت به نمونه‌های شاهد سنجیده شد. محاسبه چرخه آستانه (C_T) و بازده تکثیر در هر نمونه cDNA با استفاده از نرم‌افزار LinregPCR انجام شد. آزمون معنی‌داری داده‌های بیان ژن با روش تغییر یافته فافل (Pfaffl 2001) و با استفاده از نرم‌افزار REST انجام شد. اختلاف آماری معنی‌دار بین بیان نسبی ژن‌های مورد نظر و ژن مرجع در سطح احتمال P<0.05 (بر اساس آزمون تصادفی کردن با ۶ هزار تکرار) در نظر گرفته شد. میزان بیان نسبی هر ژن با فرمول زیر محاسبه شد:

$$Ratio = \frac{(E_{ref})^{CT_{sample}}}{(E_{target})^{CT_{sample}}} / \frac{(E_{ref})^{CT_{control}}}{(E_{target})^{CT_{control}}} \quad \text{رابطه (۱)}$$

در رابطه (۱) E_{ref} و E_{target} به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یا کنترل داخلی می‌باشند. ΔCt حاصل تفریق Ct (چرخه آستانه^۱) ژن‌های مورد نظر از Ct ژن اکتین می‌باشد.

¹. Threshold cycle

نتایج و بحث

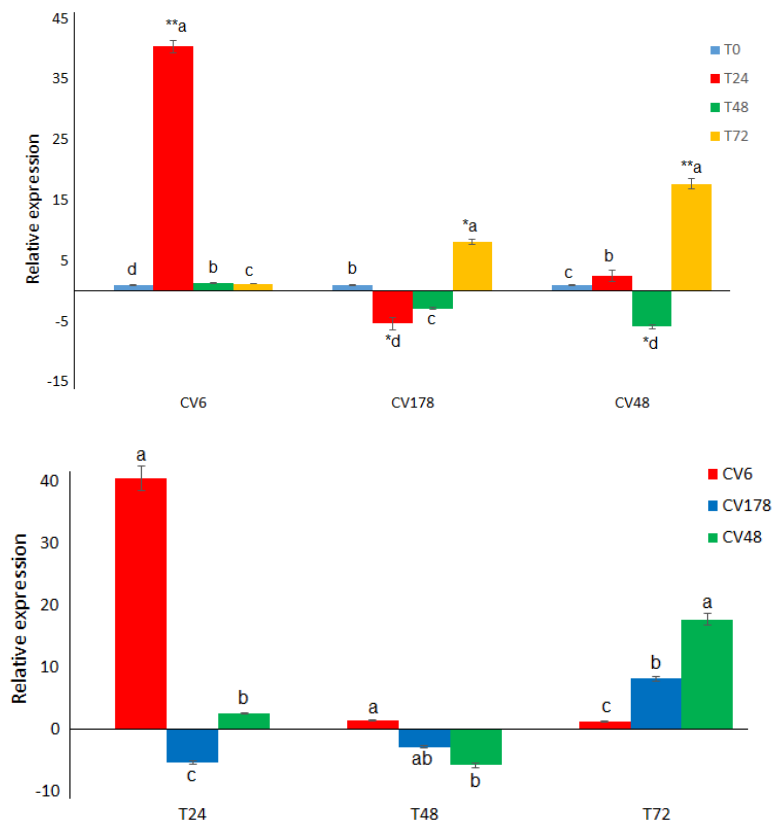
در یک آزمایش مقدماتی که به منظور انتخاب ارقام برنج حساس و متحمل به شوری اجرا شده بود (Nayyeripasand et al. 2019) بر اساس ارزیابی تحمل ارقام مختلف به شوری، سه رقم برنج شامل دو رقم حساس به شوری با کد شناسایی #6 (ARC6578) و کد شناسایی #178 (Shoemed) و یک رقم متحمل به شوری با کد شناسایی #48 (Bombilla) برای آزمایش بیان ژن انتخاب شدند.

بررسی بیان ژن‌های منتخب

ژن Cu/ZnSOD: بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (Cu/ZnSOD) در برگ‌ها ۲۴ ساعت پس از تنش در رقم‌های شماره ۶ و ۴۸ نسبت به شرایط بدون تنش به ترتیب ۴۰/۴ برابر (بسیار معنی‌دار) و ۲/۵ برابر (غیر معنی‌دار) افزایش یافت درحالی‌که در رقم ۱۷۸ به میزان ۵/۴ برابر، کاهش معنی‌دار پیدا کرد. همچنین میزان بیان این ژن در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش نسبت به شرایط بدون تنش فقط در رقم شماره ۴۸ کاهش معنی‌دار نشان داد (۵/۹ برابر کاهش) و در دو رقم دیگر تغییر معنی‌داری پیدا نکرد. درحالی‌که در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش بیان این ژن در دو رقم ۱۷۸ و ۴۸ افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۱ بالا). مقایسه ارقام نیز نشان داد که در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش رقم متحمل (شماره ۴۸) نسبت به دو رقم حساس (شماره‌های ۶ و ۱۷۸) از سطح بیان معنی‌دار بیشتری برخوردار بود (شکل ۱ پایین).

ژن CatA: مقدار بیان ژن کاتالاز (CatA) در ۲۴ ساعت پس از تنش در هر سه رقم نسبت به شرایط بدون تنش افزایش معنی‌داری نشان داد (به ترتیب ۹/۸، ۴۲/۹ و ۱۱/۹ برابر در ارقام شماره ۶، ۱۷۸ و ۴۸). همچنین میزان بیان این ژن در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش نسبت به شرایط بدون تنش در هر سه رقم کاهش معنی‌دار نشان داد (به ترتیب ۵۸/۹، ۱۳/۵، ۱۲۵ برابر کاهش در ارقام شماره ۶، ۱۷۸ و ۴۸). بیان این ژن در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش فقط در رقم شماره ۴۸ افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۲ بالا). مقایسه ارقام نشان داد که رقم متحمل کاهش بیان معنی‌دار بیشتری در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش نسبت به ارقام حساس داشته ولی در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش افزایش بیان معنی‌دار بیشتری نشان داده است (شکل ۲ پایین).

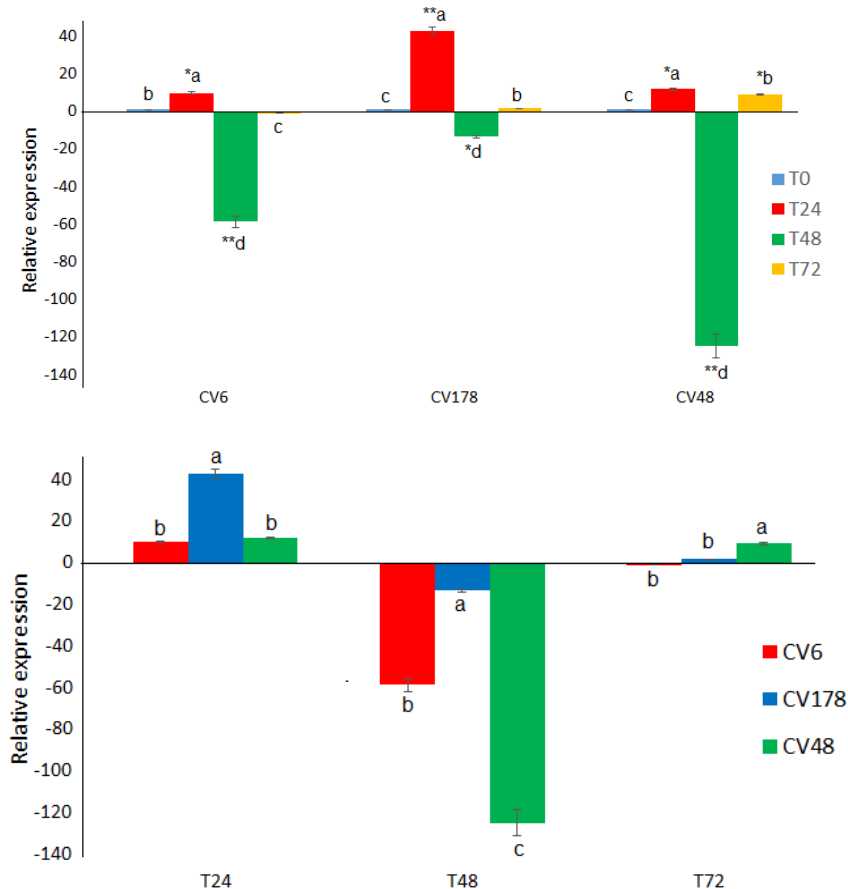
ژن OsSIPK: مقدار بیان ژن OsSIPK در ۲۴ ساعت پس از تنش در رقم شماره ۱۷۸ (حساس) به میزان ۳۸/۵ برابر (بسیار معنی‌دار) کاهش یافت و در رقم شماره ۴۸ (متحمل) به میزان ۳۷/۶ برابر افزایش یافت درحالی‌که در رقم شماره ۶ (حساس) تغییر بیان نشان نداد. همچنین میزان بیان این ژن در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش نسبت به شرایط بدون تنش در رقم شماره ۶ کاهش معنی‌دار (۲۶/۳ برابر کاهش) و در رقم شماره ۴۸ افزایش معنی‌دار نشان داد (۱۷۳/۷ برابر).



شکل ۱. تغییرات بیان ژن Cu/ZnSOD در زمان‌های مختلف بعد از تنش شوری (بالا) و در ارقام مختلف (پایین).

Figure 1. Changes in Cu/ZnSOD gene expression at different times after salinity stress (top) and in the different cultivars (bottom).

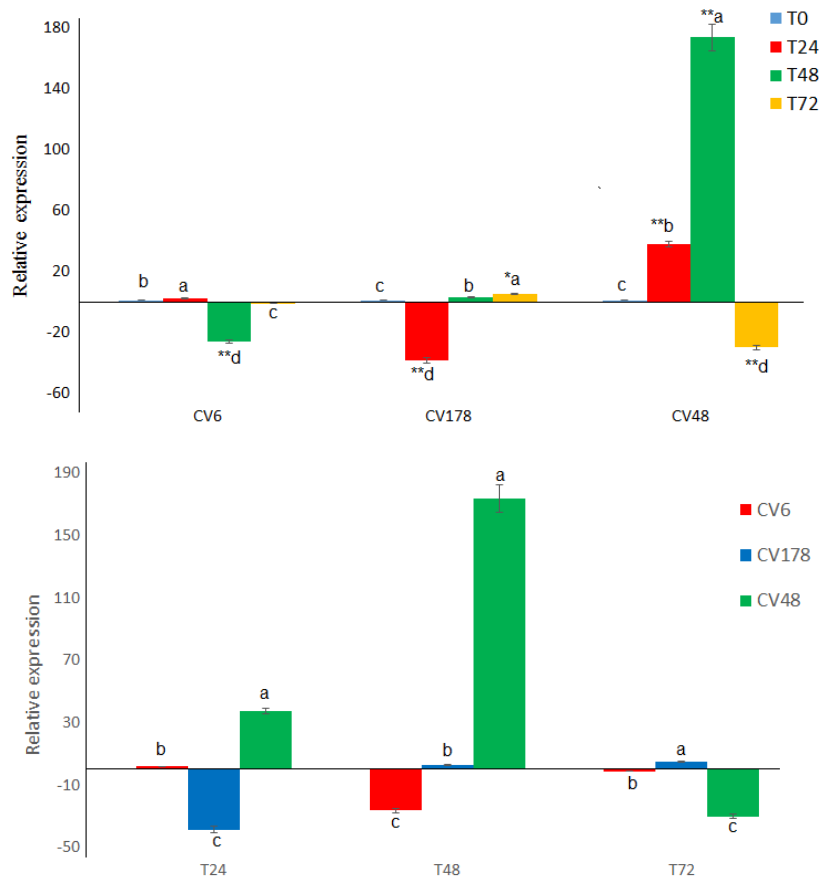
درحالی‌که بیان این ژن، ۷۲ ساعت پس از تنش در دو رقم ۶ و ۱۷۸ افزایش و در شماره رقم شماره ۴۸ کاهش معنی‌دار نشان داد (به ترتیب ۵/۱ و ۳۰/۱ برابر کاهش) (شکل ۳ بالا). مقایسه ارقام نشان داد که رقم متحمل (شماره ۴۸) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش افزایش بیان معنی‌داری نسبت به ارقام حساس (شماره‌های ۶ و ۱۷۸) نشان داده است اما ۷۲ ساعت پس از تنش بیان رقم متحمل به طور معنی‌داری کمتر از ارقام حساس بوده است (شکل ۳ پایین).



شکل ۲. تغییرات بیان ژن CatA در زمان‌های مختلف بعد از تنش شوری (بالا) و در ارقام مختلف (پایین).

Figure 2. Changes in CatA gene expression at different times after salinity stress (top) and in the different cultivars (bottom).

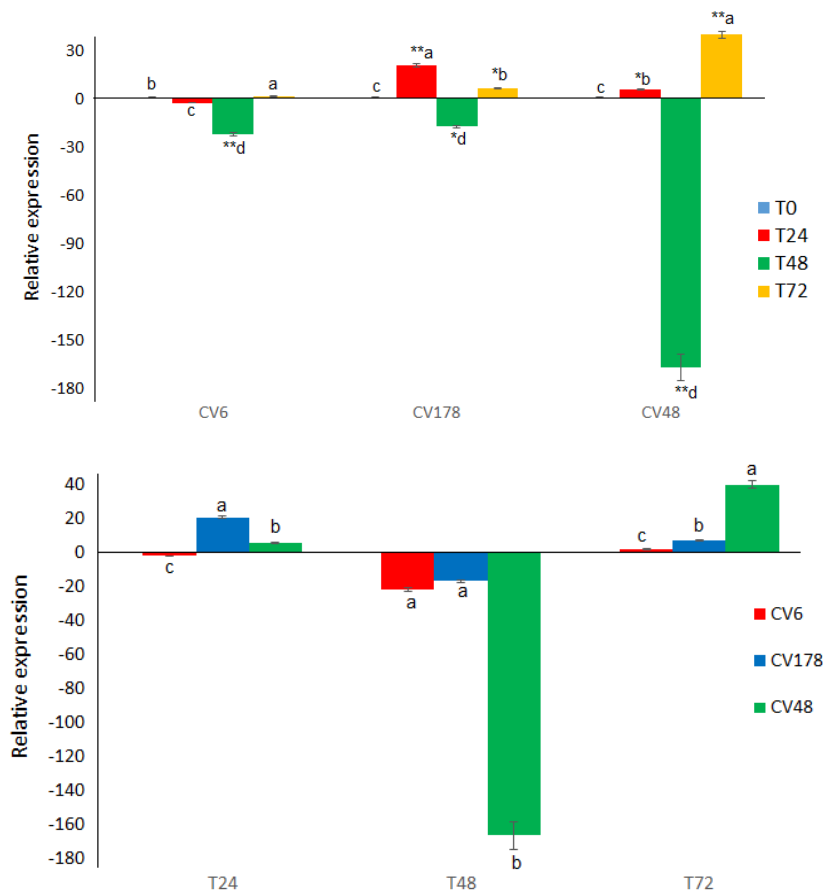
ژن **Peroxidase BP1**: مقدار بیان ژن Peroxidase BP1 در ۲۴ ساعت پس از تنش در رقم‌های شماره ۱۷۸ و ۴۸ نسبت به شرایط بدون تنش به ترتیب ۲۰/۷ و ۵/۷ برابر افزایش معنی‌داری نشان داد درحالی‌که در رقم شماره ۶ به میزان ۲/۲ برابر کاهش پیدا کرد. همچنین میزان بیان این ژن در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش در همه ارقام مورد مطالعه کاهش یافت اما این کاهش در رقم شماره ۴۸ بیشتر بود (۱۶۶/۶ برابر کاهش) و بالاخره میزان بیان این ژن بعد از ۷۲ ساعت در هر دو رقم شماره ۴۸ و ۱۷۸ به میزان ۳۹/۹ و ۶/۷ برابر افزایش یافت درحالی‌که در رقم شماره ۶ تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴ بالا).



شکل ۳. تغییرات بیان ژن OsSIPK در زمان‌های مختلف بعد از تنش شوری (بالا) و در ارقام مختلف (پایین).

Figure 3. Changes in OsSIPK gene expression at different times after salinity stress (top) and in the different cultivars (bottom).

مقایسه ارقام نشان داد که رقم متحمل در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش به طور معنی‌داری کمتر از ارقام حساس بوده ولی در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش بیان ژن در رقم متحمل به طور معنی‌داری بالاتر از ارقام حساس بوده است (شکل ۴ پایین).

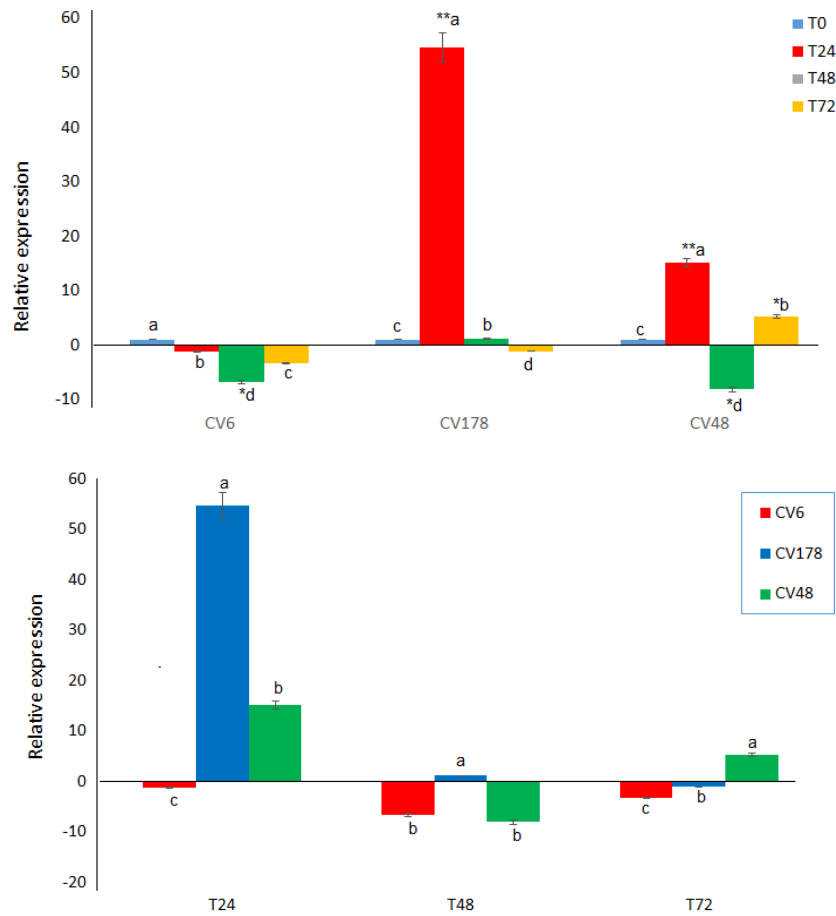


شکل ۴. تغییرات بیان ژن Peroxidase BP1 در زمان‌های مختلف بعد از تنش شوری (بالا) و در ارقام مختلف (پایین).

Figure 4. Changes in gene expression of the Peroxidase BP1 at different times after salinity stress (top) and in the different cultivars (bottom).

ژن **GF14-6 like protein 14-3-3**: مقدار بیان ژن GF14-6 like protein 14-3-3 در ۲۴ ساعت پس از

تنش در رقم‌های ۱۷۸ و ۴۸ نسبت به شرایط بدون تنش به ترتیب ۵۴/۶ و ۱۵/۱ برابر افزایش یافت در حالی که در رقم ۶ تغییر معنی‌داری پیدا نکرد. همچنین میزان بیان این ژن در ۴۸ ساعت پس از تنش در دو رقم ۴۸ و ۶ کاهش یافت (به ترتیب ۸/۱ و ۶/۷ برابر کاهش) و بالاخره میزان بیان این ژن ۷۲ ساعت پس از تنش در رقم ۶ کاهش یافت (۳/۳ برابر کاهش) در حالی که در رقم ۴۸ به میزان ۵/۳ برابر افزایش یافت (شکل ۵ بالا). مقایسه ارقام نشان داد که بیان ژن در رقم متحمل (شماره ۴۸) در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش به طور معنی‌داری بالاتر از ارقام حساس بوده است (شکل ۵ پایین).



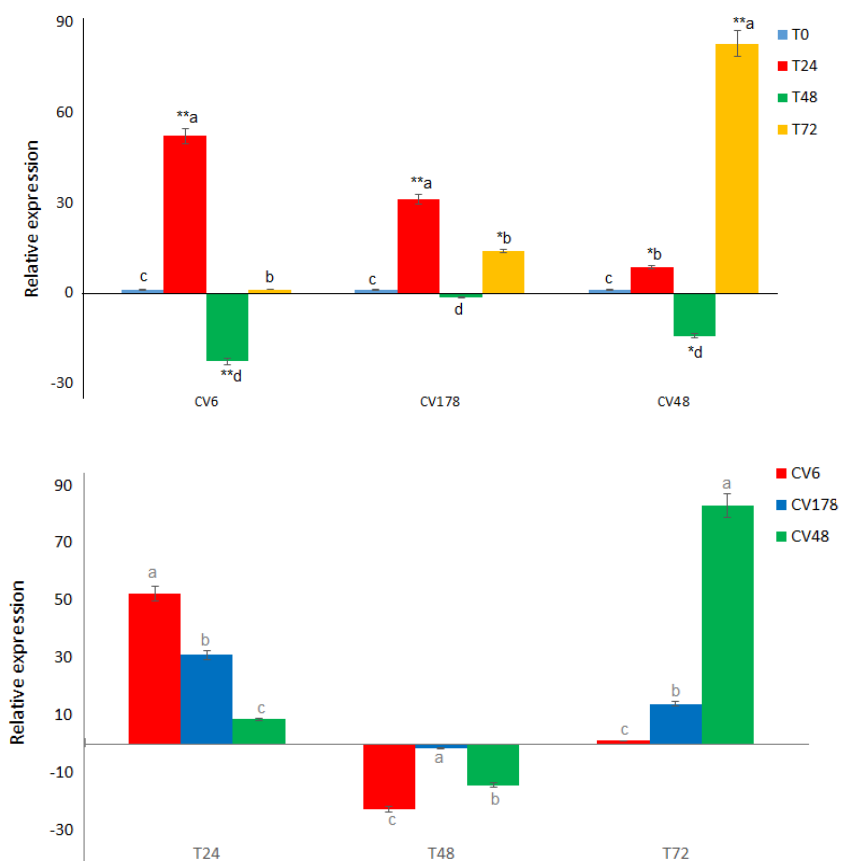
شکل ۵. تغییرات بیان ژن 14-3-3 like protein GF14-6 در زمان‌های مختلف بعد از تنش شوری (بالا) و در ارقام مختلف (پایین).

Figure 5. Changes in gene expression of 14-3-3 like protein GF14-6 at different times after salinity stress (top) and in the different cultivars (bottom).

ژن Plasma membrane H⁺-ATPase: مقدار بیان ژن Plasma membrane H⁺-ATPase در زمان ۲۴

ساعت پس از تنش در هر سه رقم نسبت به شرایط بدون تنش افزایش معنی‌داری یافت ولی میزان این افزایش در رقم‌های غیر متحمل (شماره ۶ و ۱۷۸) بیشتر بود (میزان بیان ژن به ترتیب ۵۲/۲ و ۳۱ و ۸/۶ برابر در رقم‌های ۶ و ۱۷۸ و ۴۸ افزایش نشان داد). همچنین میزان بیان ژن در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش در همه ارقام مورد مطالعه کاهش یافت اما این کاهش در دو رقم شماره ۶ و ۴۸ بیشتر بود (به ترتیب ۲۲/۷ و ۱۴/۳ برابر کاهش). سرانجام میزان بیان این ژن در رقم شماره ۶ تقریباً تغییری نکرد درحالی‌که در دو رقم شماره ۴۸ و ۱۷۸ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (به ترتیب ۸۲/۹ و ۱۳/۹ برابر). (شکل ۶ بالا). مقایسه ارقام

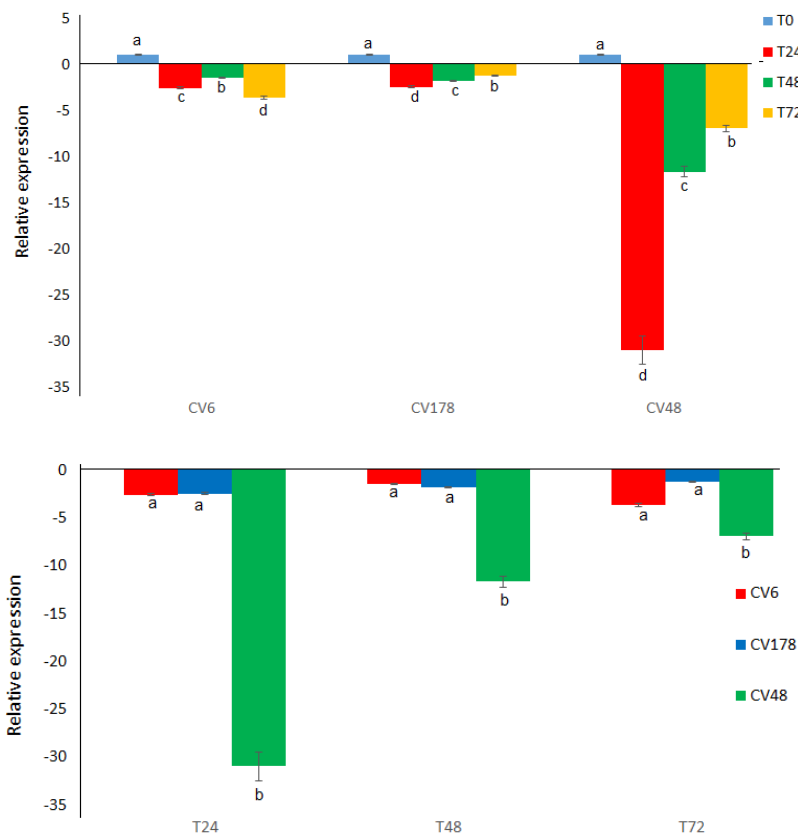
نشان داد که رقم متحمل در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش بیان کمتری نسبت به ارقام حساس داشته ولی در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش بیان معنی دار بالاتری نسبت به ارقام حساس داشته است (شکل ۶ پایین).



شکل ۶. تغییرات بیان ژن Plasma membrane H⁺-ATPase در زمان‌های مختلف بعد از تنش شوری (بالا) و در ارقام مختلف (پایین).

Figure 6. Changes in the gene expression of Plasma membrane H⁺-ATPase at different times after salinity stress (top) and in the different cultivars (bottom).

ژن رمزکننده **Zinc ion binding protein**: مقدار بیان این ژن در ارقام حساس (شماره‌های ۶ و ۱۷۸) در هیچ یک از زمان‌های پس از تنش شوری تغییر معنی‌داری نشان نداد اما در رقم متحمل (شماره ۴۸) در تمام زمان‌های پس از تنش کاهش معنی‌داری یافت (خصوصاً در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش که به ترتیب به میزان ۳۰/۹ و ۱۱/۶ برابر کاهش پیدا کرد) (شکل ۷ بالا). مقایسه ارقام نشان داد که رقم متحمل (رقم شماره ۴۸) در تمام زمان‌های پس از تنش کاهش بیان معنی‌دار بیشتری نسبت به ارقام حساس داشته است (شکل ۷ پایین).



شکل ۷. تغییرات بیان ژن Zinc ion binding protein در زمان‌های مختلف بعد از تنش شوری (بالا) و در ارقام مختلف (پایین).

Figure 7. Changes in the gene expression of Zinc ion binding protein at different times after salinity stress (top) and in the different cultivars (bottom).

به طور کلی بیان ژن‌های مورد مطالعه (به جز OsSIPK و Zinc ion binding protein) در رقم متحمل Bombilla (رقم شماره ۴۸) در ۲۴ ساعت بعد از تیمار تنش شوری افزایش یافته و ۴۸ ساعت بعد از تیمار کاهش و ۷۲ ساعت بعد

از تیمار دوباره افزایش یافت در حالی که بیان ژن OsSIPK در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار افزایش و ۷۲ ساعت بعد از تیمار کاهش یافت. Zhang & Klessig (۱۹۷۷) گزارش کردند که OsSIPK یک ژن پاسخگو به تنش است. OsSIPK یک پروتئین کیناز فعال شونده با اسیدسالیسیک است که در هسته واقع شده و بیشترین میزان بیان آن در برگ می‌باشد (Mi-Ok Lee et al. 2008). گزارش شده که اورتولوگ AtMPK6 در برنج یعنی OsSIPK در پاسخ به تنش نقش دارد (Cho et al. 2009). Tajti و همکاران (۲۰۱۹) اظهار داشتند که سطح بیان ژن OsSIPK در گیاه گندم تیمار شده با کادمیوم در ۳۰ دقیقه بعد از تیمار به حداکثر مقدار خود می‌رسد و بنابراین OsSIPK یک ژن شروع کننده پاسخ به تنش کادمیوم است (Tajti et al. 2019). در تحقیق حاضر در رقم متحمل Bombilla حداکثر میزان بیان ژن OsSIPK، ۴۸ ساعت بعد از تیمار شوری مشاهده شد. حداکثر کاهش بیان این ژن در رقم حساس شماره ۱۷۸#، ۲۴ ساعت بعد از تنش شوری و در رقم حساس ARC6578(##6)، ۴۸ ساعت بعد از تیمار شوری می‌باشد. این نشان می‌دهد که افزایش بیان OsSIPK باعث افزایش تحمل به شوری می‌شود. تحت تنش‌های مختلف مانند خشکی، شوری، تنش اسمزی، ایجاد زخم و بیماری‌ها، مقدار بیان OsSIPK افزایش می‌یابد و یک واسطه برای افزایش مقدار اتیلن محسوب می‌شود (Kim et al. 2003). در تحقیق حاضر مقدار بیان ژن کاتالاز در ۲۴ ساعت پس از تنش در هر سه رقم نسبت به شرایط بدون تنش افزایش معنی‌داری نشان داد. میزان بیان این ژن در ۴۸ ساعت پس از تنش نسبت به شرایط بدون تنش در هر سه رقم کاهش معنی‌دار نشان داد. همچنین بیان این ژن در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش فقط در رقم متحمل شماره ۴۸ (Bombilla) افزایش معنی‌دار نشان داد و این نشان می‌دهد که آنزیم کاتالاز تحت شرایط شوری جهت حذف ROS در ارقام متحمل فعال‌تر و بیان آن بیشتر می‌باشد یعنی بین سطح آنزیم و تحمل به تنش همبستگی وجود دارد. کاتالاز همراه SOD و APX سه عنصر اصلی سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد و امکان کنترل شدید سطوح ROS را فراهم می‌سازند. آن‌ها را می‌توان به‌عنوان حس‌گرهای داخل سلولی گونه‌های فعال اکسیژن مطرح کرد. بررسی بیان ژن تحت شرایط خشکی در گندم نشان داد که مقدار بیان ژن کاتالاز، یک ساعت بعد از تیمار تنش خشکی افزایش یافته و سه ساعت بعد از تیمار به حداکثر مقدار خود می‌رسد و ۶ ساعت بعد از تنش کاهش می‌یابد (Dudziak et al. 2019).

بررسی بیان ژن تحت شرایط تنش شوری در این تحقیق نشان داد که بیان ژن Similar to Peroxidase BP1

precursor در ۷۲ ساعت پس از تنش در رقم متحمل (رقم شماره ۴۸) حدود ۴۰ برابر افزایش یافت و یکی از عوامل احتمالی تحمل این رقم به تنش شوری را می‌توان به افزایش بیان این ژن نسبت داد. محققان با بررسی پروتئوم گیاهچه‌های ژنوتیپ متحمل برنج تحت تنش شوری، به بیان افتراقی پراکسیدازها را یکی از عوامل دخیل در اکتساب تحمل به تنش شوری دانسته‌اند (Lakra et al. 2015). فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو از قبیل کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید

دیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (POD)^۱ و گلوکاتینون ردوکتاز (GR) تحت تنش شوری در گیاهان افزایش می‌یابد (Gossett et al. 1994; Sehmer et al. 1995; Kennedy & De Filippis 1999; Mittova et al. 2002; Mittova et al. 2003; Hernandez et al. 1995; Sreenivasulu et al. 2000; Benavides et al. 2000; Lee et al. 2001). تنش شوری منجر به تولید سوپراکسید در سیتوسل می‌شود و حذف اکسیژن سیتوسولی منجر به ایجاد تحمل به شوری در گیاه *B. gymnorrhiza* می‌شود (Takemura et al. 2002). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) می‌تواند O₂^{-۲} را به H₂O₂ تبدیل کند و غیرفعال شدن H₂O₂ توسط کاتالاز و انواع پراکسیدازها صورت می‌گیرد (Chang et al. 1984). در این تحقیق بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (Cu/ZnSOD) در ۲۴ ساعت پس از تنش در رقم‌های شماره ۶ و ۴۸ نسبت به شرایط بدون تنش افزایش یافت درحالی‌که در رقم ۱۷۸، کاهش معنی‌دار پیدا کرد. همچنین میزان بیان این ژن در ۴۸ ساعت پس از تنش نسبت به شرایط بدون تنش فقط در رقم متحمل شماره ۴۸ کاهش معنی‌دار نشان داد و در دو رقم حساس تغییر معنی‌داری پیدا نکرد. درحالی‌که در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش بیان این ژن در دو رقم ۱۷۸ و ۴۸ افزایش معنی‌دار نشان داد که این نشان می‌دهد از هیچ الگوی مشخصی تبعیت نکرده است. با این وجود در تحقیقات مختلف نقش‌آفرینی ژن سوپراکسید دیسموتاز در کسب تحمل به شوری در برنج گزارش شده است (Kim et al. 2007; Mishra et al. 2013). الگوی بیان ژن کاتالاز تا ۴۸ ساعت پس از تنش شوری در هر سه رقم مشابه بوده است (افزایش در زمان ۲۴ ساعت و کاهش در زمان ۴۸ ساعت). اما وجه افتراق ارقام حساس و متحمل در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش نمایان شد به طوری که در این زمان بیان این ژن فقط در رقم متحمل افزایش معنی‌داری پیدا کرد. در تحقیقات قبلی تاثیر معنی‌دار ژن کاتالاز بر کسب تحمل به تنش شوری گزارش شده است (Yamane et al. 2010; Khare et al. 2015; Swain et al. 2017). برای مثال Khare و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که در گیاهچه‌های رقم متحمل پانول-۳ بیان ژن CatA به تدریج افزایش یافته و باعث تحمل به سطوح تنش‌زای NaCl می‌شود.

Os01g0966000 یک H⁺-ATPase غشای پلاسمایی (PM) است که طبق تحقیقات قبلی (Nayyeripasand et al. 2019) با صفت وزن تر و خشک ریشه در ارتباط است. این ژن مشابه ژن رمز کننده (PM) (plasma membrane H⁺-ATPase) است و این نشان می‌دهد که اعضای خانواده PM H⁺-ATPase نقش کاملاً شناخته شده‌ای در تحمل به تنش‌های غیرزیستی از قبیل سرما (Martz et al. 2006; Iswari & Palta 1989)، خشکی (Gong et al. 2010, Du et al. 2015) و باران اسیدی (Liang et al. 2015) دارند. مطالعات زیادی بر روی اهمیت PM H⁺-ATPase در پاسخ به تنش شوری در آریدوپسیس و غلات از جمله گندم و برنج صورت گرفته است (Roy et al. 2005; Ayala et al. 1997; Vitart et al. 2015).

¹. Peroxidase

². Superoxide radical anions

(et al. 2001; Gévaudant et al. 2007; Morgan et al. 2014; Chen et al. 2015; Falhof et al. 2016). بررسی بیان ژن تحت شرایط تنش شوری در این تحقیق نشان داد که بیان ژن H^+ -ATPase در ساعات اولیه (۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش) پس از تنش در هر دو رقم حساس و متحمل افزایش یافت ولی با گذشت ۷۲ ساعت از تنش بیان این ژن در رقم حساس کاهش و در رقم متحمل افزایش یافت. این نتیجه بیانگر نقش احتمالی این ژن در تداوم تحمل به تنش شوری در رقم متحمل می‌باشد.

ژن Os04g0462500 که کد کننده 14.3.3 like protein GF14-6 می‌باشد با صفت محتوای آب برگ در ارتباط است (Nayyeripasand et al. 2019). ژن Os04g0462500 شبیه به GF14-6 (جزو پروتئین‌های دسته ۳-۳-۱۴) می‌باشد که به پروتئین‌ها متصل می‌شود و گیرنده فلوریزین است. جالب آنکه GF14-6 به H^+ -ATPase متصل شده و محرک آن است (Visconti et al. 2003). بررسی بیان ژن تحت شرایط تنش شوری در این تحقیق نشان داد که بیان ژن 14-3-3 like protein GF14-6 در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش در هر دو رقم حساس و متحمل به شدت افزایش یافت ولی با گذشت ۷۲ ساعت از تنش بیان این ژن در رقم حساس کاهش ولی در رقم متحمل افزایش یافت. این نتیجه بیانگر نقش احتمالی ژن 14-3-3 like protein GF14-6 در تحمل به شوری در رقم متحمل می‌باشد. مقدار بیان ژن Zinc ion binding protein در هر سه زمان تیمار تنش در تمام رقم‌های مورد مطالعه کاهش پیدا کرد ولی فقط در رقم متحمل شماره ۴۸ این کاهش معنی‌دار بوده است. بیشترین کاهش معنی‌دار رقم متحمل شماره ۴۸ در زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد این ژن یک تنظیم کننده منفی در ساعات اولیه مواجهه با تنش شوری بوده که کاهش بیان آن می‌تواند باعث تحمل به تنش شوری در برنج شود. مطالعات مکان‌یابی ارتباطی نشان داد که Zinc ion binding protein (رمز شده توسط ژن Os06g0191200) با صفت وزن تر ریشه در ارتباط است (Nayyeripasand et al. 2019). در مورد نقش این ژن در پاسخ به تنش شوری در برنج در سطح بیان ژن شواهدی وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: نتیجه‌گیری کلی که از انجام این تحقیق می‌توان ارائه داد این است که برخی ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق با حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در پاسخ عمومی گیاه به تنش شوری نقش دارند (مانند ژن‌های SOD و CatA) که در تغییرات بیان این ژن‌ها در ارقام مختلف منعکس شده است و به نظر می‌رسد افزایش بیان این ژن‌ها در رقم متحمل در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش یکی از دلایل احتمالی تحمل این رقم به تنش شوری می‌باشد. از طرفی بین تحمل به شوری و میزان بیان برخی دیگر از ژن‌های مورد مطالعه می‌توان نوعی ارتباط وابسته به رقم-زمان را تشخیص داد (مانند ژن‌های OsSIPK, PM, H^+ -ATPase و 14-3-3 like protein GF14-6, Peroxidase BP1).

منابع

- توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۴)۶، ۳۵-۵۰.
- جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان (۴)۴، ۱۳۲-۱۱۹.
- محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۳)۱۰، ۱۱۱-۱۲۲.

References

- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Effect of roasted soybean and canola seeds on peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPARG) gene expression and cattle milk characteristics. *Iran J Appl Anim Sci* 9, 635-642 (In Persian).
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 11, 135-150 (In Persian).
- Ayala F, Ashraf M, O'Leary JW (1997) Plasma membrane H⁺-ATPase activity in salt-tolerant and salt-sensitive lines of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Botanica Neerlandica* 46, 315-324.
- Benitez LC, da Maia LC, Ribeiro MV et al. (2013) Salt induced change of gene expression in salt sensitive and tolerant rice species. *J Agric Sci* 5, 251.
- Bennetzen J (2002) Opening the door to comparative plant biology. *Science* 296, 60-63.
- Chen G, Hu Q, Luo LE et al. (2015) Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant Cell Environ* 38, 2747-2765.
- Cho K, Agrawal GK, Jwa NS et al. (2009) Rice OsSIPK and its orthologs: a "central master switch" for stress responses. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 649-653.
- Dai Yin CH, Luo YH, Min SH et al. (2005) Salt-responsive genes in rice revealed by cDNA microarray analysis. *Cell Res* 15, 796-810.

- Dudziak K, Zapalska M, Börner A et al. (2019) Analysis of wheat gene expression related to the oxidative stress response and signal transduction under short-term osmotic stress. *Sci Rep* 9, 2743.
- Du H, Zhou X, Yang Q et al. (2015) Changes in H⁺-ATPase activity and conjugated polyamine contents in plasma membrane purified from developing wheat embryos under short-time drought stress. *Plant Growth Regul* 75, 1-10.
- Falhof J, Pedersen JT, Fuglsang AT, Palmgren M (2016) Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Mol Plant* 9, 323-337.
- Fan HF, Du CX, Guo SR (2013) Nitric oxide enhances salt tolerance in cucumber seedlings by regulating free polyamine content. *Environ Exp Bot* 86, 52-59.
- Finnie C, Borch J, Collinge DB (1999) 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Mol Biol* 40, 545-554.
- Ganguly M, Datta K, Roychoudhury A et al. (2012) Overexpression of Rab16A gene in indica rice variety for generating enhanced salt tolerance. *Plant Signal Behav* 7, 502-509.
- Gévaudant F, Duby G, Von Stedingk E et al. (2007) Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. *Plant Physiol* 144, 1763-1776.
- Gong DS, Xiong YC, Ma BL et al. (2010) Early activation of plasma membrane H⁺-ATPase and its relation to drought adaptation in two contrasting oat (*Avena sativa* L.) genotypes. *Environ Exp Bot* 69, 1-8.
- Gossett DR, Millhollon EP, Lucas M (1994) Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci* 34, 706-714.
- Grover A, Pental D (2003) Breeding objectives and requirements for producing transgenics for major field crops of India. *Current Sci* 84, 310-320.
- Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ et al. (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci* 105, 151-167.
- Hu L, Li H, Chen L et al. (2015) RNA-seq for gene identification and transcript profiling in relation to root growth of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) under salinity stress. *BMC Genomics* 16, 575.
- Islam F, Wang J, Farooq MA et al. (2019) Rice responses and tolerance to salt stress: deciphering the physiological and molecular mechanisms of salinity adaptation. In: *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance*. Woodhead Publ, UK, pp. 791-819.

- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani sheep using real time qPCR. *J Rumin Res* 4, 119-132 (In Persian).
- Kennedy B, De Filippis LF (1999) Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *J Plant Physiol* 155, 746-754.
- Khare T, Kumar V, Kishor PK (2015) Na⁺ and Cl⁻ ions show additive effects under NaCl stress on induction of oxidative stress and the responsive antioxidative defense in rice. *Protoplasma* 252, 1149-65.
- Kim CY, Liu Y, Thorne ET et al. (2003) Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* 15, 2707-2718.
- Kim YH, Khan AL, Waqas M et al. (2014) Silicon application to rice root zone influenced the phytohormonal and antioxidant responses under salinity stress. *J Plant Growth Regul* 33, 137-49.
- Kim D, Shibato J, Agrawal GK (2007) Gene transcription in the leaves of rice undergoing salt-induced morphological changes (*Oryza sativa* L.). *Mol Cells* 24(1), 45.
- Lakra N, Nutan KK, Das P et al. (2015) A nuclear-localized histone-gene binding protein from rice (OsHBP1b) functions in salinity and drought stress tolerance by maintaining chlorophyll content and improving the antioxidant machinery. *J Plant Physiol* 176, 36-46.
- Lee MO, Cho K, Kim SH et al. (2008) Novel rice OsSIPK is a multiple stress responsive MAPK family member showing rhythmic expression at mRNA level. *Planta* 227, 981-990.
- Lee DH, Kim YS, Lee CB (2001) The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol* 158, 737-745.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25, 402-408.
- Martz F, Sutinen ML, Kiviniemi S, Palta JP (2006) Changes in freezing tolerance, plasma membrane H⁺-ATPase activity and fatty acid composition in *Pinus resinosa* needles during cold acclimation and de-acclimation. *Tree Physiol* 26, 783-790.
- Mishra P, Bhoomika K, Dubey RS (2013) Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive *Indica* rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Protoplasma* 250, 3-19.

- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol Plant* 115, 393-400.
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M (2003) Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species. *Acta Bot Neerl* 26, 845-856.
- Mishra S, Singh B, Panda K et al. (2016) Association of SNP haplotypes of HKT family genes with salt tolerance in Indian wild rice germplasm. *Rice* 9, 15.
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2019) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).
- Morgan SH, Maity PJ, Geilfus CM et al. (2014) Leaf ion homeostasis and plasma membrane H⁺-ATPase activity in *Vicia faba* change after extra calcium and potassium supply under salinity. *Plant Physiol Biochem* 82, 244-253.
- Nayeripasand L, Garoosi GA, Ahmadikhah A (2019) Selection for salinity tolerance in an international rice collection at vegetative stage. *Aust J Crop Sci* 13, 837-846.
- Niu X, Narasimhan ML, Salzman RA et al. (1993) NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol* 103, 713-718.
- Niu X, Damsz B, Kononowicz AK et al. (1996) NaCl-induced alterations in both cell structure and tissue-specific plasma membrane H⁺-ATPase gene expression. *Plant Physiol* 11, 679-686.
- Paul AL, Liu L, McClung S et al. (2009) Comparative interactomics: analysis of arabidopsis 14-3-3 complexes reveals highly conserved 14-3-3 interactions between humans and plants. *J Proteome Res* 8, 1913-1924.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45-e45.
- Rahman A, Nahar K, Hasanuzzaman M, Fujita M (2016) Calcium supplementation improves Na⁺/K⁺ ratio, antioxidant defense and glyoxalase systems in salt-stressed rice seedlings. *Front Plant Sci* 7, 609.
- Rhodes D, Hanson AD (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 44, 357-384.

- Roy P, Niyogi K, Sengupta DN, Ghosh B (2005) Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H⁺-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Sci* 168, 583-591.
- Sasaki T, Sederoff RR (2003) Genome studies and molecular genetics: the rice genome and comparative genomics of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 6, 97-100.
- Sehmer L, Alaoui-Sosse B, Dizengremel P (1995) Effect of salt stress on growth and on the detoxifying pathway of pedunculate oak seedlings (*Quercus robur* L.). *J Plant Physiol* 147, 144-151.
- Shankar R, Bhattacharjee A, Jain M (2016) Transcriptome analysis in different rice cultivars provides novel insights into desiccation and salinity stress responses. *Sci Rep* 6, 23719.
- Mishra S, Singh B, Panda K et al. (2016) Association of SNP haplotypes of HKT family genes with salt tolerance in Indian wild rice germplasm. *Rice* 9,15.
- Svennelid F, Olsson A, Piotrowski M et al. (1999) Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* 11, 2379-2391.
- Swain DM, Sahoo RK, Srivastava VK et al. (2017) Function of heterotrimeric G-protein γ subunit RGG1 in providing salinity stress tolerance in rice by elevating detoxification of ROS. *Planta* 245, 367-83.
- Tajti J, Németh E, Glatz G et al. (2019) Pattern of changes in salicylic acid-induced protein kinase (SIPK) gene expression and salicylic acid accumulation in wheat under cadmium exposure. *Plant Biol* 21, 1176-1180.
- Tohidi Nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK et al. (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Kashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50 (In Persian).
- Vallee BL, Falchuk KH (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73, 79-118.
- Vitart V, Baxter I, Doerner P, Harper JF (2001) Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H⁺-ATPase in the root endodermis. *Plant J* 27, 191-201.
- Visconti S, Camoni L, Fullone MR et al. (2003) Mutational analysis of the interaction between 14-3-3 proteins and plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 278, 8172-8178.
- Yamane K, Mitsuya S, Taniguchi M, Miyake H (2010) Transcription profiles of genes encoding catalase and ascorbate peroxidase in the rice leaf tissues under salinity. *Plant Prod Sci* 13, 164-8.

- Yoshida S, Forno D, Cock JH, Gomez K (1976) Routine procedure for growing rice plants in culture solution. Laboratory manual for physiological studies of rice (3rd edn), IRRI, Los Baños, Phlippines, pp. 61-66.
- Zeng L, Shannon MC, Lesch SM (2001) Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. *Agric Water Manag* 48, 191-206.
- Zhao K, Tung CW, Eizenga GC et al. (2011) Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nat Commun* 2, 467.
- Zhang S, Klessig DF (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9, 809-824.

