Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Identification of genes involved in ion transport under high salinity stress in rice seedlings

Mojdeh Akbarzadeh Lelekami
Ph.D. Student, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: m.akbaezade67@yahoo.com

Mohammad Hadi Pahlevani
*Corresponding author. Associate Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: hpahlavani@yahoo.com

Khalil Zaynali Nezhad
Assistant Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: khalil1381@yahoo.com

Keyvan Mahdavi Mashaki
Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Amol, Iran. E-mail address: Keyvan_mahdavi64@yahoo.com

Andreas P.M. Weber
Professor, Plant Biochemistry Department, Heinrich Heine University (HHU), Düsseldorf, Germany. E-mail address: andreas.weber@uni-dusseldorf.de

Dominik Brilhaus
Assistant Professor, Plant Biochemistry Department, Heinrich Heine University (HHU), Düsseldorf, Germany. E-mail address: dominik.brilhaus@uni-dusseldorf.de

Abstract

Objective

Rice is highly sensitive to salinity stress among crops. The sensitivity at the seedling stage and reproductive phase causes damage to the essential processes of plants and ultimately reduces the yield. In saline environments, ion toxicity is increased by sodium uptake. Tolerant cultivars cope with the salinity stress by low maintenance of Na^+/K^+ in the photosynthetic organs. The entry and exclusion of ions in the plant cells are controlled by ion channels and transporters. Identifying and evaluating the expression pattern of genes encoding these transporters at different time points and organs was our objective.

Materials and methods

In the present study, two rice genotypes of tolerant CSR28 and sensitive IR28 were used. The grown seedlings in a hydroponic medium were exposed to 150 mM salinity treatment and the

roots and shoots were collected after 6 and 54 h of the treatment. After RNA extraction, library construction and RNA-Seq analysis were performed and differentially expressed genes were identified. MapMan pathway analysis was used to identify the genes encoding ion transporters.

Results

The comparison of the two genotypes under specific salinity stress identified 47 highly expressed genes encoding ion transporters some of which showed genotype or organ-specific expression patterns. *OsTPC1* and *OsSOS3* genes, which are involved in the entry of Ca^+ into cells and Ca^+ receptors, respectively, had higher expression in the roots of the tolerant genotype than the susceptible genotype at the 54 h time point. Considerably, high expression of the important genes such as *OsSOS1* and *OsNHX1* in the tolerant genotype indicated a low Na^+ accumulation compared to the sensitive genotype. Other genes involved in ion homeostasis, such as *OsHKT1*, displayed more expression in the roots of the tolerant genotype at 54 h.

Conclusions

Generally, our findings revealed that the molecular mechanisms that occurred in the roots under long-term salinity stress caused differences in salinity tolerance through various ion homeostasis. The results also indicated the role of the Ca^+-related signaling pathway in the higher tolerance of CSR28. Specific expression patterns of some of the genes can be used as biomarkers in the selection programs of salt-tolerant rice genotypes.

Keywords: MapMan analysis, Transcriptome, SOS pathway, Ion transporter.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Akbarzadeh Lelekami M, Pahlevani MH, Zaynali Nezhad Kh, Mahdavi Mashaki K, P.M. Weber A, Brilhaus D (2022) Identification of genes involved in ion transport under high salinity stress in rice seedlings. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (4), 69-84.

Agricultural Biotechnology Journal 14(4), 69-84. DOI: 10.22103/jab.2022.19689.1409

Received: August 19, 2022. Received in revised form: October 01, 2022.

Accepted: October 02, 2022. Published online: November 15, 2022

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

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۲۲۲۸-۶۷۰۵ شاپا الکترونیکی: ۲۲۲۸-۶۵۰۰

شناسایی ژن‌های درگیر در انتقال یون‌ها در پاسخ به تنش شوری بالا در گیاهچه‌های برنج

مژده اکبرزاده للکامی

دانشجوی سابق دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: m.akbarzade67@yahoo.com

محمدهادی پهلوانی

*نویسنده مسئول: دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hpahlavani@yahoo.com

خلیل زینلی‌نژاد

استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: khalil1381@yahoo.com

کیوان مهدوی ماشکی

استادیار پژوهش موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل، ایران. رایانامه: Keyvan_mahdavi64@yahoo.com

آندریاس پی.ام وبر

استاد گروه بیوشیمی گیاهی، دانشگاه HHU، دوسلدورف، آلمان. رایانامه: andreas.weber@uni-dusseldorf.de

دومینیک بریل‌هاوس

استادیار گروه بیوشیمی گیاهی، دانشگاه HHU، دوسلدورف، آلمان. رایانامه: dominik.brilhaus@uni-dusseldorf.de

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۷/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷//۱۰

چکیده

هدف: برنج در بین گیاهان زراعی از حساسیت بالایی به شوری برخوردار است. حساسیت برنج در مرحله گیاهچه‌ای و فاز زایشی موجب آسیب به فرایندهای حیاتی گیاه و در نهایت کاهش عملکرد می شود. در محیط‌های شور سمیت یونی به‌واسطه جذب یون سدیم افزایش می‌یابد. ارقام متحمل با کاهش نسبت سدیم به پتاسیم در اندام‌های فتوسنتزی با شوری مقابله می‌کنند. کنترل ورود و خروج یون‌ها در سلول‌های گیاهی توسط کانال‌ها و ناقل‌های یونی انجام می‌شود. شناسایی و ارزیابی الگوی بیان ژن‌های کنترل‌کننده این ناقل‌ها در زمان‌ها و اندام‌های مختلف از اهداف این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از دو ژنوتیپ برنج متحمل CSR28 و حساس IR28 استفاده شد. گیاهچه‌های کاشت شده در محیط کشت هیدروپونیک در معرض تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند و نمونه‌برداری از ریشه و اندام هوایی در زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت پس از تیمار انجام شد. پس از استخراج RNA، ساخت کتابخانه و تجزیه و تحلیل RNA-seq انجام شد و ژن‌های با بیان افتراقی شناسایی شدند. از تجزیه مسیر MapMan برای شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده ناقل‌های یونی استفاده شد.

نتایج: از مقایسه دو ژنوتیپ در شرایط اختصاصی تنش شوری، ۴۷ ژن با بیان بالا که کنترل‌کننده ناقل‌های یونی بودند شناسایی شدند که برخی دارای بیان اختصاصی در ژنوتیپ یا اندام خاص بودند. ژن‌های *OsTPC1* و *OsSOS3* که به‌ترتیب در ورود یون کلسیم به سلول و گیرنده کلسیم نقش دارند در ریشه ژنوتیپ متحمل در زمان ۵۴ ساعت بیان بیشتری نسبت به ژنوتیپ حساس نشان دادند. همچنین بیان بالای ژن‌های مهمی نظیر *OsSOS1* و *OsNHX1* در ژنوتیپ متحمل بیانگر کاهش تجمع یون سدیم نسبت به ژنوتیپ حساس بود. دیگر ژن‌های درگیر در هومئوستازی یونی نظیر *OsHKT1* در اندام ریشه و زمان ۵۴ ساعت در ژنوتیپ متحمل بیان بیشتری داشت.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که فعل و انفعلات مولکولی رخ داده در ریشه در شرایط طولانی مدت تنش شوری موجب تفاوت در تحمل به شوری از طریق تفاوت در هومئوستازی یونی شده است. همچنین نتایج این تحقیق بیانگر نقش مسیر پیام‌رسانی مربوط به یون کلسیم در القای تحمل به شوری ژنوتیپ متحمل CSR28 بود. از بیان اختصاصی برخی از این ژن‌ها در ژنوتیپ یا اندام خاص می‌توان به‌عنوان نشانگر زیستی در برنامه‌های گزینش ژنوتیپ‌های برنج متحمل به شوری استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: تجزیه MapMan، ترانسکریپتوم، مسیر SOS، ناقل یونی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: اکبرزاده للکامی مژده، پهلوانی محمدهادی، زینلی‌نژاد خلیل، مهدوی ماشکی کیوان، پی.ام وبر آندریاس، بریل‌هاوس دومینیک (۱۴۰۱) شناسایی ژن‌های درگیر در انتقال یون‌ها در پاسخ به تنش شوری بالا در گیاهچه‌های برنج. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۴)، ۶۹-۸۴.

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

© the authors

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از غذاهای اصلی و مهم مردم جهان می‌باشد. در ۱۱۴ کشور برنج کشت می‌شود که در بیش از ۵۰ کشور میزان تولید سالانه آن ۱۰۰ هزار تن یا بیشتر می‌باشد. سطح زیر کشت این گیاه در ایران در حدود ۸۵۴ هزار هکتار با تولید شلتوک ۴/۵ میلیون تن می‌باشد (Ahmadi et al. 2021). گیاهان در محیط‌های دینامیک رشد می‌کنند و اغلب تنش‌های غیرزیستی مختلفی نظیر خشکی، شوری بالا، سرما و گرما را تجربه می‌کنند (Zhu 2016). تنش شوری یکی از شدیدترین تنش‌های محیطی است. شوری خاک اکثراً به‌واسطه زهکشی و سیستم‌های آبیاری نامناسب، تغییرات آب و هوایی (گرمایش جهانی و افزایش تبخیر و تعرق) و خشکی ایجاد می شود (Rengasamy 2006). شوری خاک یک مشکل جهانی است که بیش از ۲۰ در صد زمین‌های کشت و کار شده را شامل می شود که نیمی از آن مربوط به زمین‌های تحت آبیاری است و این در صد در حال افزایش است (Shrivasata and Kumar 2015).

برنج به‌عنوان گیاه زراعی حساس به شوری محسوب می شود و تحمل به شوری آن وابسته به مرحله رشدی، نوع اندام و ژنوتیپ می‌باشد. به‌طور کلی، مراحل گیاهچه‌ای و زایشی برنج به تنش شوری حساسیت بیشتری نشان می‌دهند (Chinnusamy et al. 2005; Kurotani et al. 2015). واکنش و سازگاری برنج به تنش شوری فرایندهای پیچیده‌ای را نظیر ممانعت از رشد، لوله‌ای شدن برگ‌ها، کاهش ارتفاع گیاه، کاهش تعداد پنجه و عقیمی سنبله شامل می‌شود که در نهایت موجب کاهش عملکرد می‌گردد (Chang et al. 2019; Razzaq et al. 2020). علاوه بر تغییرات مورفولوژیکی، تنش شوری باعث تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نظیر ممانعت از فتوسنتز، کاهش محتوای آب، تغییرات متابولیکی، افزایش انتقال سدیم به اندام‌های هوایی و کاهش جذب پتاسیم، روی و فسفر می‌گردد (Lekklar et al. 2019; Akbarzadeh et al. 2020).

یون سدیم یک عنصر سمی مهم است که می‌تواند در خاک‌های تحت تاثیر شوری به میزان زیاد تجمع یابد. به‌طور کلی در طی تنش شوری گیاهان متحمل میزان سدیم در اندام‌های هوایی را پایین نگه می‌دارند و در نتیجه سازوکارهای مستثنی کردن سدیم برای بقای این گیاهان در محیط‌های شور حیاتی است (Deinlein et al. 2014). به‌طور کلی سه سیستم اصلی انتقال یون سدیم در گیاهان وجود دارد: انتشار یون سدیم از ریشه به خارج، مصادره یون سدیم در واکوئل‌ها و جلوگیری از نشر یون سدیم به درون آوندهای چوبی و درنتیجه کاهش انتقال آن به اندام‌های هوایی (Ismail and Horie 2017). در سیستم نخست، مستثنی کردن سدیم از سیتوزول نیازمند انتقال فعال ترمودینامیکی می‌باشد که در گیاهان این فرایند به کمک فعالیت آنزیم H^+-ATPase رخ می‌دهد که طی آن با ورود یون هیدروژن، سدیم از سیتوزول ریشه خارج می شود (Blumwald et al. 2000). پیام‌رسانی این فرایند با تشکیل کمپلکس پروتئینی SOS2-SOS3 انجام می‌شود و در نهایت یک ناقل پروتئینی مهم بنام SOS1[۱] در غشای پلاسمایی موجب انتقال Na^+/H^+ می‌گردد (Hasegawa et al. 2000). مصادره یون سدیم درون واکوئل‌ها

[۱] Salt overly sensitive

از طریق یک ناقل پروتئینی مهم در غشـــای واکوئل (تونوپلاســـت) بنام NHX1[1] انجام می‌شـــود. بیان بالای ژن کنترل‌کننده NHX1 در چندین گونه شـــامل گندم، برنج و ذرت تحمل آن‌ها را به تنش شـــوری افزایش داده اســـت (Yamaguchi and Blumwald 2005). سازوکار سوم شامل ناقل‌هایی نظیر HKT[2] و HAK[3] می‌با شد که در کاهش انتقال سدیم به اندام‌های هوایی و افزایش غلظت یون پتاسیم موثر هستند (Horie et al. 2009).

بنابراین، مطالعه ناقل‌ها و کانال‌های پروتئینی که در محیط‌های شور در انتقال یون‌ها درگیر هستند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار اســت. در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررســی‌های به عمل آمده روشــن نمود که مکانیســم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به‌طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شـده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سـلول را تولید می‌نمایند (Arabpour et al. 2021). تنها یک مجموعه نســـبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شـــود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بســـتگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). امروزه با توســـعه فناوری‌های NGS، امکان مطالعه بیان گســـترده ژن‌ها (تراسکریپتوم) از طریق تکنیک RNA-Seq فراهم شده ا ست. از این رو در تحقیق حا ضر بیان ژن‌های کنترل کننده ناقل‌های یونی در شرایط تنش شوری به کمک ارقام متفاوت از نظر تحمل و در زمان‌ها و اندام‌های متفاوت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، شـــرایط رشـــد و اعمال تیمار شـــوری: در این تحقیق از بذور دو ژنوتیپ برنج متحمل (CSR28) و حساس (IR28) به شوری که از موسسه بین المللی تحقیقات برنج (IRRI[4]) در فیلیپین تهیه شده بودند، استفاده شد. بذور پس از ضدعفونی توسط هیپوکلریت سدیم، در پتریدیش در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه سلسیوس جوانه دار شدند. سپس جوانه‌ها به تشت‌های حاوی محیط کشت یوشیدا (Yoshida et al. 1971) منتقل شدند و در گلخانه دانشگاه HHU[5] واقع در دوسلدورف آلمان تحت شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۸ درجه سلسیوس رشد کردند. محیط کشت هر سه روز تعویض شـد و مقدار pH آن روی ۵/۵ تنظیم شـد. گیاهچه‌های دو هفته‌ای در معرض تیمار شـوری ۱۵۰ میلی‌مولار با اضـافه

[1] Na^+/H^+ exchanger
[2] High-affinity transporter
[3] High-affinity K^+ transporter
[4] International Rice Research Institute
[5] Heinrich-Heine-University

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

کردن کلرید سـدیم قرار گرفتند. مقدار EC[1] تیمار شـوری ۱۵ ds/m بود در حالیکه گیاهان شـاهد در EC به‌میزان ۱ ds/m قرار گرفتند. نمونه‌برداری از ریشـه و اندام‌های هوایی پس از ۶ و ۵۴ سـاعت از آغاز تیمار شـوری انجام شـد و پس از قرارگیری در ازت مایع، در فریزر منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج RNA، ساخت کتابخانه و توالی‌یابی: با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Germany) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج RNA صورت گرفت. پس از حذف آلودگی DNA توسط تیمار با آنزیم DNase1، کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده توسط Bioanalyzer 2100 سنجیده شد. تهیه کتابخانه RNA-Seq به کمک کیت TruSeq RNA Sample Preparation (Illumina, San Diego, USA) انجام شد و در مجموع از ۴۸ کتابخانه (دو ژنوتیپ × دو تیمار × دو اندام × دو زمان نمونه‌برداری × سه تکرار بیولوژیک) از طریق پلتفرم Illumina HiSeq 3000 و بصورت یکطرفه با قطعات ۱۵۰ جفت بازی، توالی‌یابی صورت پذیرفت.

شـناسـایی ژن‌های با بیان افتراقی و تجزیه مسـیر MapMan: برای تجزیه و تحلیل بیان ژن از دسـتورالعمل Tuxedo (Trapnell et al. 2012) استفاده شد. ابتدا خوانش‌های فیلتر شده و با کیفیت روی ژنوم مرجع برنج IRGSP v1.0 از طریق نرم افزار TopHat v2.1.1 نقشـه‌یابی شـدند و به کمک نرم‌افزارهای Cufflinks و Cuffmerge ترانسـکریپتوم یکپارچه حاصل شد. بیان ژن‌ها با شاخص RPKM نرمال سازی شدند و ژن‌های افتراقی به کمک نرم‌افزار Cuffdiff شناسایی شدند. ژن‌هایی که دارای $\log2\ FC \geq 1.5$ یا $\log2\ FC \leq -1.5$ و سطح احتمال $FDR \leq 0.05$ (P-value تصحیح شده) بودند به‌عنوان ژن‌های افتراقی معنی‌دار لحاظ گردیدند. به‌منظور شـناسـایی ژن‌های درگیر در انتقال یون‌ها، تجزیه مسـیر MapMan v3.6.0 (Thimm et al. 2004) برای ژن‌های اختصـاصـی تنش شـوری که بین دو ژنوتیپ متحمل و حسـاس افتراقی بودند، انجام شـد. برای نقشـه‌یابی از ژن‌های مسـیر *O. sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare به‌عنوان مرجع استفاده شد. نمایش پروفایل‌های بیانی نمونه‌ها از طریق ترسیم نقشه دمایی برای ژن‌های افتراقی با بیان بالا ($\log10\ FC \geq 3$ یا $\log10\ FC \leq -3$) به کمک نرم‌افزار MeV v4.9.0 انجام شد.

نتایج و بحث

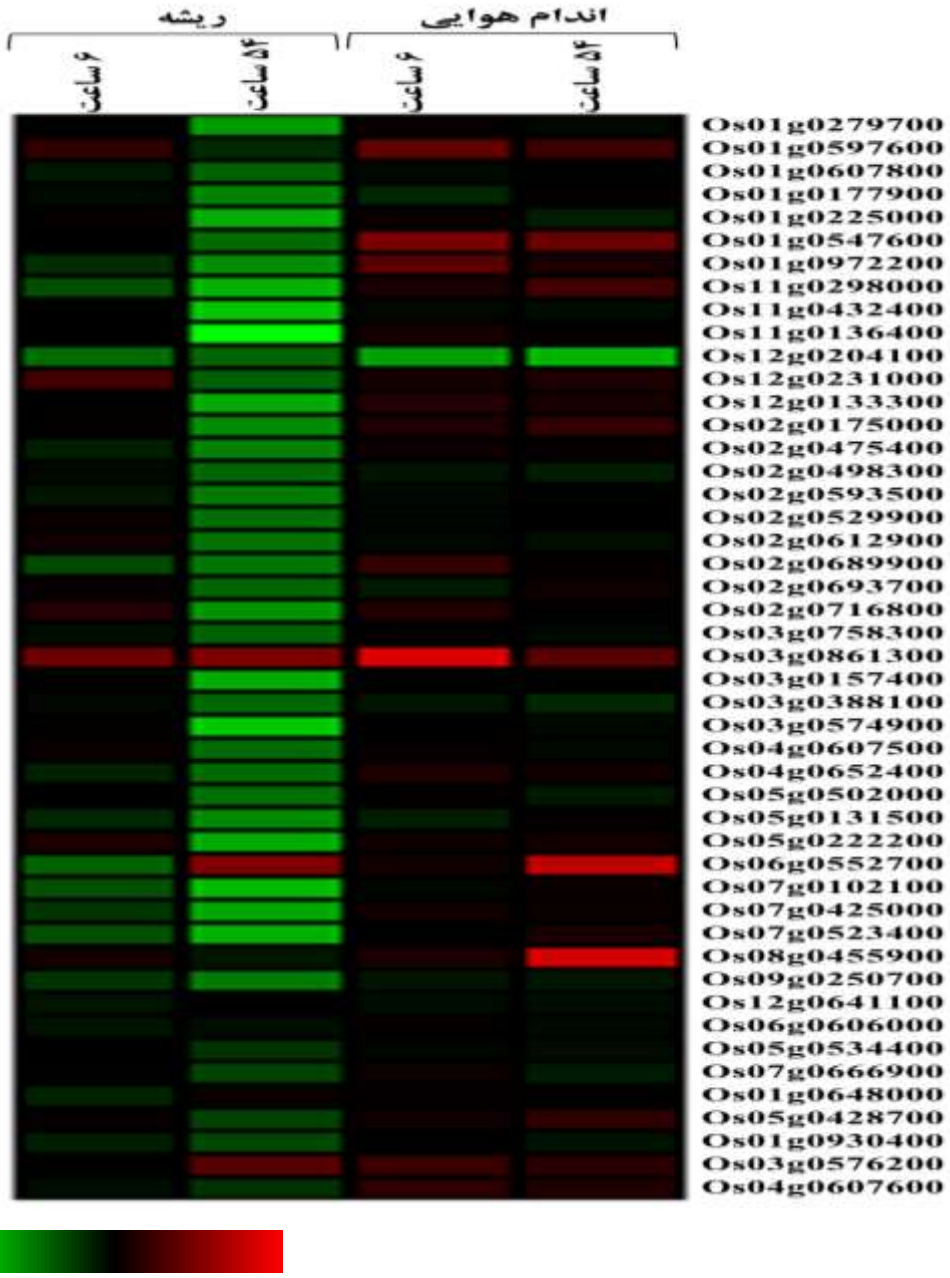
نتایج بیان ژن از طریق RNA-Seq: نتایج تجزیه و تحلیل ترانسـکریپتوم از طریق RNA-Seq در ۴۸ نمونه شـامل دو ژنوتیپ برنج CSR28 و IR28، دو تیمار شاهد و شوری ۱۵۰ میلی‌مولار، دو زمان نمونه‌برداری ۶ و ۵۴ ساعت پس از تیمار و دو اندام ریشه و هوایی در سه تکرار بیولوژیک، منجر به شناسایی ۱۵۴۸۳ ژن با بیان افتراقی شد. به‌منظور درک بهتر تحمل به تنش شوری، ژن‌هایی که به‌طور اختصاصی در شرایط تنش شوری بین دو ژنوتیپ افتراقی بودند شناسایی شدند. به‌طوریکه، تعداد

[1] Electrical conductivity

۵۲۵ و ۱۴۷۲ ژن به‌ترتیب در زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت در اندام ریشه و تعداد ۶۳۵ و ۶۰۶ ژن به‌ترتیب در زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت در اندام هوایی، بین دو ژنوتیپ در شرایط اختصاصی تنش شوری افتراقی بودند. تعداد بالای ژن‌های افتراقی در اندام ریشه و زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت نشان می‌دهد که دو ژنوتیپ متحمل و حساس بیشترین تفاوت را در این نمونه‌ها نشان می‌دهند. ریشه به‌عنوان اولین سد در برابر تنش شوری از اهمیت زیادی برخوردار است، به‌طوریکه فعل و انفعلات مولکولی و فیزیولوژیکی رخ داده در آن در القای تحمل به شوری نقش پررنگی دارد (Walia et al. 2007). از طرف دیگر پاسخ گیاه به شوری در ابتدا عمدتاً شامل فاز اسمزی می‌باشد و با گذشت زمان سمیت حاصل از تجمع یون سدیم منجر به آسیب و حساسیت گیاه می شود (Acosta-Motos et al. 2017; Hernández 2019). با توجه به موارد ذکر شده و نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که دو ژنوتیپ متحمل و حساس دارای تفاوت در بکارگیری سازوکارهای کاهش‌دهنده سمیت یون‌ها و هومئوستازی یونی در اندام ریشه تحت شوری طولانی مدت هستند که منجر به تفاوت در تحمل به شوری می شود. از این رو در ادامه بیان ژن‌های درگیر در سنتز کانال‌ها و ناقل‌های یونی مورد بررسی قرار گرفت.

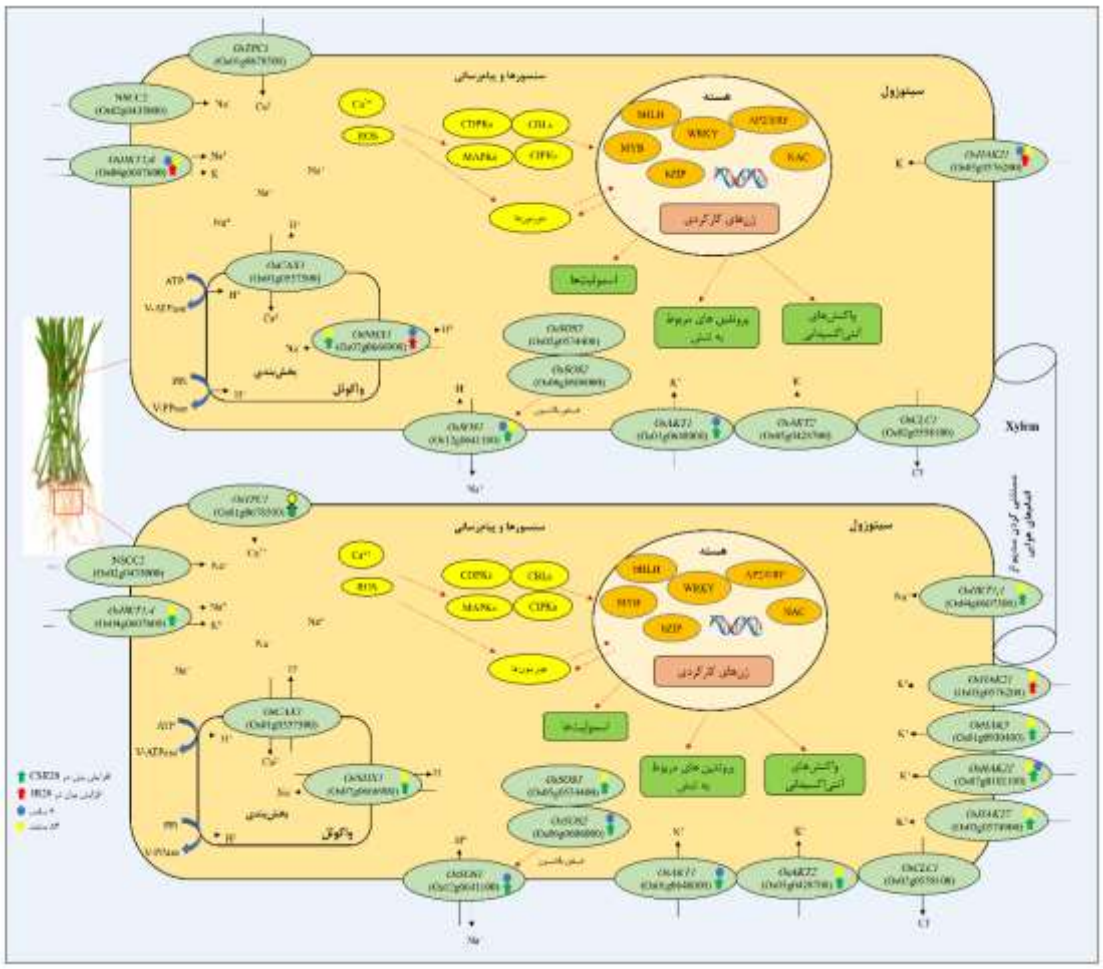
شناسایی ژن‌های درگیر در انتقال یون‌ها: با توجه به اهمیت کانال‌های پروتئینی و ناقل‌های یونی در تحمل به شوری، این گروه کارکردی را با تکیه بر این ژن‌ها با استفاده از تجزیه MapMan مورد بررسی قرار می‌دهیم. از مجموع ۱۱۴ ژن درگیر در" انتقال"، ۴۷ ژن دارای بیان بالا در یکی از دو ژنوتیپ بودند (شکل ۱). در اندام ریشه و زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت، ژنوتیپ متحمل CSR28 بیشترین تعداد ژن‌های افزایش بیان یافته را نسبت به ژنوتیپ حساس IR28 دارا بود. ژن‌های *OsNIP3;5* (Os12g0204100) و *OsPIP2;8* (Os03g0861300) در تمامی شرایط به‌ترتیب در ارقام متحمل و حساس افزایش بیان داشتند. هر دو ژن مربوط به سنتز آکواپورین‌ها می‌باشند. آکواپورین‌ها یک خانواده بزرگ از کانال‌های غشایی را تشکیل می‌دهند که عبور آب و محلول‌های خنثی را از غشای پلاسمایی تسهیل می‌کنند (Agre 1998). ژن‌هایی که دارای بیان اختصاصی در بافت یا رقم خاصی هستند به‌عنوان نشانگر زیستی در برنامه‌های گزینش در اصلاح نباتات موثر هستند. به‌منظور درک نقش کانال‌های پروتئینی و ناقل‌های یونی، سازوکار مولکولی تحمل به شوری در ریشه و اندام هوایی در شکل ۲ به نمایش در آمده است. در ادامه نقش هر یک از این ناقل‌ها به اختصار شرح داده شده است. ژن *OsTPC1* (Os01g0678500) سنتزکننده یک کانال پروتئینی است که در غشای پلاسمایی قرار دارد و عبور یون کلسیم را تسهیل می‌کند. وجود یون کلسیم در درک تنش و آغاز مسیرهای پیام‌رسانی آن در سلول کلیدی است (Reddy et al. 2011). این ژن تنها در ریشه ژنوتیپ متحمل پس از ۵۴ ساعت از اعمال تیمار شوری القا شد. در چندین گزارش از *OsTPC1* به‌عنوان ژن موثر در القای تحمل به شوری در ارقام متحمل برنج یاد شده است (Senadheera et al. 2009; Kurusu et al. 2012). ژن *OsSOS1* (Os12g0641100) که یکی از مهمترین آنتی‌پورترهای (انتقال‌دهنده‌های دو طرفه) درگیر در تنظیم یونی می‌باشد در زمان ۶ ساعت در ریشه و هر دو زمان ۶ و ۵۴ ساعت در اندام هوایی بیان بیشتری در ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ حساس داشت.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ۱. نقشه دمایی برای ژن‌های درگیر در انتقال یون‌ها با استفاده از ژن‌های اختصاصی تنش شوری که بین دو ژنوتیپ متحمل و حساس در اندام‌ها و زمان‌های نمونه‌برداری مختلف افتراقی بودند. افزایش بیان در ارقام متحمل CSR28 و حساس IR28 (ژن‌های با بیان بالا بصورت log2 fold change ≥ 3 یا log2 fold change ≤ -3) به‌ترتیب با رنگ‌های سبز و قرمز نشان داده شده است

Figure 1. Heatmap for genes involved in ion transporter using salt-specifics genes which had differential expression between two tolerant and sensitive genotypes in different organs and sampling times. Increased expression in tolerant genotype CSR28 and sensitive genotype IR28 (highly expressed genes as log2 fold change ≥ 3 or log2 fold change ≤ -3) are shown in green and red, respectively



شکل ۲. سازوکار مولکولی تحمل به شوری در ریشه و اندام هوایی برنج با استفاده از ژن‌های افتراقی واکنش‌دهنده به شوری در ارقام متحمل CSR28 و حساس IR28 در مرحله گیاهچه‌ای. بیان ژن‌های کنترل‌کننده ناقل‌های یونی به‌صورت فلش‌های سبز (افزایش بیان در CSR28) و قرمز (افزایش بیان در IR28) و دایره‌های آبی (زمان نمونه‌برداری ٦ ساعت) و زرد (زمان نمونه‌برداری ٥٤ ساعت) نشان داده شده است

Figure 2. Molecular mechanism of salinity tolerance in rice roots and shoots using salt-specific genes expressed differentially in tolerant genotype CSR28 and sensitive genotype IR28 at seedling stage. The expression of genes encoding ion transporters is shown as green (increased expression in CSR28) and red (increased expression in IR28) arrows and blue (6 h time point) and yellow (54 h time point) circles

ژن *OsSOS1* با خارج کردن یون‌های سدیم از سیتوزول در کاهش نسبت سدیم به پتاسیم نقش دارد. کاهش تجمع سدیم در برگ‌ها منجر به کاهش آسیب در فرایندهای فتوسنتزی می شود (Nounjan et al. 2018). همانطور که پیشتر توضیح داده شد کمپلکس تنظیمی SOS2-SOS3 موجب القای SOS1 می‌شود. هر دو ژن *OsSOS3* (در زمان ۶ ساعت) و *OsSOS2* (در زمان ۵۴ ساعت) در ژنوتیپ متحمل بیان بیشتری نسبت به ژنوتیپ حساس داشتند. ژن *OsSOS3* دارای گیرنده متصل شونده به یون کلسیم است و به‌نظر می‌رسد در همکاری با ژن *OsTPC1*، نقش مهمی در فرایندهای پیام‌رسانی تنش شوری و کاهش سمیت یون سدیم در سلول‌های ژنوتیپ متحمل CSR28 ایفا کند.

یکی دیگر از ژن‌های مهم در کاهش اثرات سمی نمک ژن *OsNHX1* (Os07g0666900) می‌باشد که به‌عنوان یک آنتی‌پورتر در غشای واکوئل (تونوپلاست) قرار دارد و در مصادره یون‌های سدیم در واکوئل نقش دارد. بیان این ژن در ریشه ژنوتیپ متحمل در زمان ۵۴ ساعت بیشتر از ژنوتیپ حساس بود، در حالیکه در اندام هوایی در ارقام حساس و متحمل بترتیب در زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت افزایش بیان نشان داد. بیان بالای ژن *OsNHX1* به‌عنوان یکی از عوامل کلیدی در تعیین تحمل به شوری برنج یاد شده است (Fukuda et al. 2004). دیگر ژن درگیر در سنتز آنتی‌پورتر *OsCAX1* که در غشای واکوئل موجب ورود یون کلسیم به درون واکوئل می‌شود در این تحقیق القا نشد.

ناقل‌های HKT1 سیمپورترهایی (انتقال‌دهنده‌های یکطرفه) هستند که تمایلی زیادی به انتقال یون پتاسیم دارند که البته کاتیون های دیگر نیز نظیر یون سمی سدیم را نیز می‌توانند منتقل کنند. دو ژن *OsHKT1;1* (Os04g0607500) و*OsHKT1;4* (Os04g0607600) در ریشه شناسایی شدند، در حالیکه در اندام هوایی تنها *OsHKT1;4* القا شد. از آنجایی که سیمپورترهای HKT1 می‌توانند بخشی از یون‌های سدیم را از آوندهای چوبی به داخل سیتوزول ریشه برگشت داده و مانع ارسال آن‌ها به اندام هوایی شوند و با توجه به بیان اختصاصی *OsHKT1;1* در ریشه، ما گمان می‌کنیم این ژن در ریشه نقش بیشتری در این زمینه داشته باشد. بیان هر دو ژن *OsHKT1;1* و *OsHKT1;4* در ریشه ژنوتیپ متحمل CSR28 و زمان ۵۴ ساعت بالاتر از ژنوتیپ حساس IR28 بود. در پژوهشی، Wang et al. (2015) نشان دادند که ژن *OsHKT1;1* نقش پررنگی در کاهش تجمع یون‌های سمی سدیم در اندام هوایی و مقابله با تنش شوری در گیاهچه‌های برنج دارد. ژن‌های NSCC سنتزکننده کانال‌های پروتئینی غیرانتخابی در سطح غشا هستند که می‌توانند محلی برای ورود یون‌های سدیم به داخل سلول‌های ریشه باشند که در این مطالعه القا نشدند.

سیمپورترهای HAK و AKT در تجمع و افزایش غلظت یون پتاسیم در سیتوزول نقش دارند. ژن *OsHAK21* (Os03g0576200) در هر دو اندام بیان بیشتری در ژنوتیپ حساس نسبت به متحمل (در ریشه در زمان ۵۴ ساعت و در اندام هوایی در هر دو زمان) داشت. سه ژن *OsHAK5* (Os01g0930400)، *OsHAK22* (Os07g0102100) و *OsHAK27* (Os03g0574900) به‌طور اختصاصی در ریشه ژنوتیپ متحمل بیان بیشتر نسبت به ژنوتیپ حساس نشان دادند که بیانگر

اهمیت ریشه ژنوتیپ CSR28 در هومئوستازی یونی است. هر سه ژن در زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت بیان شدند. ژن *OsHAK22* علاوه بر زمان ۵۴ ساعت، در زمان ۶ ساعت نیز القا شد. در گزارش Zhang et al. (۲۰۲۲) یکی از اعضای خانواده HAK تحت عنوان *OsHAK19* در تمامی ارقام متحمل به شوری برنج افزایش بیان نشان داد. ژن *OsAKT1* (Os01g0648000) در هر دو اندام در زمان نمونه‌برداری ۶ ساعت افزایش بیان در ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ حساس نشان داد، در حالیکه ژن (Os05g0428700) *OsAKT2* تنها در ریشه ژنوتیپ متحمل در زمان ۵۴ ساعت افزایش بیان نسبت به ژنوتیپ حساس داشت. در مطالعه Musavizadeh et al. (2021) ژن *OsAKT1* در اندام‌های هوایی رقم متحمل سنگ طارم در پاسخ به شوری افزایش بیان نشان داد. ژن (Os02g0558100) *OsCLC1* که در خروج یون سمی کلر از سلول‌ها درگیر است در این تحقیق القا نشد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق تجزیه و تحلیل بیان ژن از طریق RNA-Seq برای ۴۸ نمونه RNA نشان داد که بیشترین فعل‌وانفعالات مولکولی در پاسخ به تنش شوری مربوط به اندام ریشه و زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت از تیمار بود. همچنین ۴۷ ژن دارای بیان بالای افتراقی بین دو ژنوتیپ متحمل CSR28 و حساس IR28 بودند که در انتقال یون‌ها درگیر بودند. بررسی الگوی بیان ژن‌ها نشان داد که ژنوتیپ متحمل از طریق بیان ژن‌های مهمی نظیر *OsTPC1* و *OsSOS3* توانست مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به یون کلسیم را فعال کند. نتایج این تحقیق نشان داد که بیان بالای ژن‌های کدکننده ناقل‌های مهم یونی همچون *OsSOS1*، *OsNHX1* و *OsHKT1* موجب کاهش تجمع یون سمی سدیم در اندام هوایی و افزایش غلظت یون پتاسیم شده است. از بیان اختصاصی ژن‌ها در ژنوتیپ‌ها و بافت‌های خاص می‌توان به‌عنوان نشانگر زیستی در برنامه گزینش به کمک نشانگر در اصلاح نباتات استفاده کرد.

سپاسگزاری: از مؤسسه بین المللی تحقیقات برنج (IRRI)، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه HHU آلمان جهت تأمین بذور و امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

احمدی کریم، عبادزاده حمیدرضا، حاتمی فرشاد، عبدشاه هلدا و کاظمیان آرزو (۱۴۰۰) آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹۹-۹۸، جلد اول :محصولات زراعی، مرکز فنآوری اطلاعات، وزارت جهاد کشاورزی، ایران ۹۷ ص.

اکبرزاده للکامی مژده، پهلوانی محمدهادی، زینلی‌نژاد خلیل و همکاران (۱۳۹۹) پاسخ برخی از متابولیت های اولیه ریشه برنج (*Oryza sativa* L.) به تنش شوری. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، سال دوازدهم، شماره ۳۴، صفحات ۲۱۷-۲۱۰.

عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

References

Acosta-Motos JR, Ortuño MF, Bernal-Vicente, A et al (2017) Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. Agronomy 7, e18

Agre P (1998) Aquaporin null phenotypes: The importance of classical physiology. Proc Nat Aca Sci 95**,** 9061-9063.

Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. Agric Biotechnol J 13 (4), 183-200 (In Persian).

Ahmadi K, Ebadzadeh H, Hatami F et al. (2021) Agricultural Statistics of 2020-2021 Volume I: Crop Production. Tehran, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Deputy Director of Planning and Economics. Center for Information and Communication Technology (In Persian).

Akbarzadeh Lelekami M, Pahlevani MH, Zaynali Nezhad K et al. (2020) Response of some of Primary Metabolites in Rice (*Oryza sativa* L.) Root to Salinity Stress. J Crop Breed 12(34), 210-217 (In Persian).

Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1465(1-2), 140-151.

Chang J, Cheong BE, Natera S, Roessner U (2019) Morphological and metabolic responses to salt stress of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars which differ in salinity tolerance. Plant Physiol Biochem 144, 427-435.

Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Sci 45(2), 437-448.

Deinlein U, Stephan AB, Horie T et al. (2014) Plant salt-tolerance mechanisms. Trends plant Sci 19(6), 371-379.

Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A et al. (2004) Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice. Plant Cell Physiol 45(2), 146-159.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu Rev Plant Biol 51(1), 463-499.

Hernández JA (2019) Salinity Tolerance in Plants: Trends and Perspectives. Int J Mol Sci 20:2408

Horie T, Hauser F, Schroede JI (2009) HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. Trends plant Sci 14(12), 660-668.

Ismail AM, Horie T (2017) Genomics, physiology, and molecular breeding approaches for improving salt tolerance. Annu Rev Plant Biol 68, 405-434.

Kurotani KI, Yamanaka K, Toda Y et al. (2015) Stress tolerance profiling of a collection of extant salt-tolerant rice varieties and transgenic plants overexpressing abiotic stress tolerance genes. Plant cell Physiol 56(10), 1867-1876.

Kurusu T, Hamada H, Koyan T, Kuchitsu K (2012) Intracellular localization and physiological function of a rice Ca^{2+}-permeable channel *OsTPC1*. Plant Signal Behav 7(11), 1428-1430.

Lekklar C, Suriya-Arunroj D, Pongpanich M et al. (2019) Comparative genomic analysis of rice with contrasting photosynthesis and grain production under salt stress. Genes 10(8), 562.

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (In Persian).

Musavizadeh Z, Najafi-Zarrini, Kazemitabar, SK et al. (2021) Genome-wide analysis of potassium channel genes in rice: expression of the *OsAKT* and *OsKAT* genes under salt stress. Genes 12(5), 784.

Nounjan N, Charoensawan V, Chansongkrow P et al. (2018) High performance of photosynthesis and osmotic adjustment are associated with salt tolerance ability in rice carrying drought tolerance QTL: physiological and co-expression network analysis. Front Plant Sci 9:1135

Razzaq A, Ali A, Safdar LB et al. (2020) Salt stress induces physiochemical alterations in rice grain composition and quality. J Food Sci 85(1), 14-20.

Reddy AS, Ali GS, Celesnik H, Day IS (2011) Coping with stresses: roles of calcium-and calcium/calmodulin-regulated gene expression. Plant Cell 23(6), 2010-2032.

Rengasamy P (2006) World salinization with emphasis on Australia. J Exp Bot 57(5), 1017-1023.

Senadheera P, Singh R, Maathuis FJ (2009) Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. J Exp Bot 60(9), 2553-2563.

Shrivasata P, Kumar R (2015) Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. Saudi J Biologi Sci 22, 123–131.

Thimm O, Bläsing O, Gibon Y et al. (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. Plant J 37, 914-939.

Trapnell C, Roberts A, Goff L et al. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nat Protoc 7**,** 562-578.

Walia H, Wilson C, Zeng L et al. (2007) Genome-wide transcriptional analysis of salinity stressed japonica and indica rice genotypes during panicle initiation stage. Plant Mol Biol 63:609-623

Wang R, Jing W, Xiao L et al. (2015) The rice high-affinity potassium transporter1;1 is involved in salt tolerance and regulated by an MYB-type transcription factor. Plant Physiol 168(3), 1076-1090.

Yamaguchi T, Blumwald E (2005) Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends Plant Sci 10(12), 615-620.

Yoshida S, Forno DA, Cock JH (1971) Laboratory manual for physiological studies of rice Laboratory manual for physiological studies of rice

Zhang J, Xu T, Liu Y et al. (2022) Molecular insights into salinity responsiveness in contrasting genotypes of rice at the seedling stage. Int J Mol Sci 23(3), 1624.

Zhu, JK (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell 167(2), 313-324.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500