مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲)

ارزیابی تحمل به شوری در لاین های آنتی سنس ناقل ساکارز (OsSUT1) در مرحله گیاهچه ای در برنج (*Oryza sativa* var. TaiPai)

معصومه قمر[۱]، محمدرضا سیاهپوش*[۲]، پیمان حسیبی[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز،

[۲]عضو هیأت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/٤

چکیده

به‌منظور بررسی اثر تغییر در توزیع ساکارز بر تحمل به شوری لاین‌های برنج در مرحله گیاهچه‌ای، آزمایشی گلدانی به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. در این آزمایش شش لاین و رقم برنج شامل لاین تیپ‌طبیعی (تای‌پای)، سه لاین آنتی‌سنس ناقل ساکارز برای ژن SUT1 (۱-٦-٤٥-۳٤ و ۱-۷-۱۱۱-۳۷ ،۱-۸-۱۸٤-۳۷)، رقم متحمل به شوری (پکالی) و رقم حساس به شوری (نیپنبار) در سه سطح شوری (۲، ۵ و ۱٦ دسی زیمنس بر متر کلرید سدیم) مورد بررسی قرار گرفتند. ۲۱ روز پس از اعمال تنش، وزن خشک اندام هوایی، محتوای نسبی آب برگ، عدد SPAD، هدایت روزنه‌ای و میزان کل قندهای محلول در برگ مورد ارزیابی قرار گرفتند. افزایش تنش شوری منجر به افزایش میزان مشخصی از قندهای محلول و عدد SPAD و کاهش وزن خشک اندام هوایی، هدایت روزنه‌ای و محتوای نسبی آب برگ گردید. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق لاین‌های آنتی‌سنس ۱-۷-۱۱۱-۳۷ و ۱-۸-۱۸٤-۳۷ از نظر کلیه صفات مورد بررسی نسبت به تای‌پای برتری داشتند و در مواردی مشابه و یا برتر از رقم متحمل پکالی رفتار نمودند. بررسی بیان ژن‌های خانواده ناقلین ساکارز در برنج در لاین‌های آنتی‌سنس و لاین تیپ‌طبیعی نشان از کاهش بیان این ژن‌ها در تیمارهای شوری داشت. اگرچه این کاهش در لاین‌های آنتی‌سنس کمتر از لاین تیپ طبیعی بود. بنابراین به نظر می‌رسد که با دستکاری توزیع قندها در مرحله گیاهچه‌ای می‌توان به لاین‌هایی با تحمل بیشتر نسبت به تنش‌های غیرزنده دست یافت.

واژه های کلیدی: *بیان ژن، پکالی، تای‌پای، ناقلین ساکارز، نیپنبار.*

*نویسنده مسئول: محمدرضا سیاهپوش تلفن: ۰٦۱۱-۳۳٦٤۰۵٦ E-mail: Siahpoosh@scu.ac.ir

مقدمه

شوری فاکتور محیطی مهمی است که توزیع و قابلیت تولید بسیاری از گیاهان زراعی را دچار محدودیت می‌کند. خاک‌ها و آب‌های شور مناطق وسیعی از جهان را در بر گرفته‌اند. از ۱۵ میلیون هکتار زمین‌های تحت کشت گیاهان زراعی در ایران، شش میلیون هکتار آن به صورت فاریاب بوده که از این مقدار نیز ۳۰ درصد آن تحت تاثیر شوری قرار دارد (Ahmadi & Niazi Ardekani, 2006). تنش شوری به عنوان عاملی محدود کننده در قابلیت تولید محصولات کشاورزی کاملاً به اثبات رسیده است (Filho *et al*., 2003). شوری از طریق کاهش پتانسیل اسمزی محلول خاک، مسمومیت یونی و به هم خوردن تعادل عناصر غذایی ناشی از افزایش غلظت یون سدیم سبب آسیب به گیاه می‌شود. به‌همین دلیل در جهت یافتن جنبه‌های فیزیولوژیکی مقاومت به شوری در گیاهان تلاش‌های بسیاری به‌عمل آمده و بهنژادگران علاقمند به توسعه ژنوتیپ‌های متحمل به شوری هستند (Cuartero *et al*., 2006).

برنج غذای اصلی ۲/۵ میلیارد نفر از جمعیت جهان است و انرژی ۲۱ درصد و پروتئین ۱۵ درصد از جمعیت جهان را تأمین می‌کند (Bhuiyan *et al*., 2002). پاسخ برنج به شوری به مرحله رشدی آن بستگی دارد. در بیشتر کولتیوارهای برنج، گیاهچه‌های جوان به شوری حساس هستند. پس از کاشت برنج استمرار شوری موجب کاهش معنی‌دار رشد گیاهچه‌ها می‌شود (Momayezi *et al*., 2009).

قندها تولیدات اصلی فتوسنتزی در گیاهان بوده و این ترکیبات در مراحل بعد علاوه بر نقش حیاتی تولید انرژی، اسکلت اولیه کلیه ترکیبات شیمیایی گیاهی را تشکیل می‌دهند. تقسیم این قندها در بین اندام‌های مختلف گیاه و در مراحل مختلف رشدی، وابسته به جنس و گونه گیاهی و شرایط محیطی است (Siahpoosh *et al*., 2012). شناخت بیشتر توزیع قندها در گیاه راهکار مناسبی جهت کنترل، دستکاری و هدایت کربوهیدرات‌ها به سوی تولید بیشتر در گیاه می‌باشد. ساکارز تنها قند قابل انتقال در بیشتر غلات ازجمله برنج است. تغییر در توزیع ساکارز به سوی مبدأ و یا به سوی مقصد یک استراتژی بسیار مؤثر در افزایش عملکرد، مطالعه و پیشبرد اثر متقابل گیاه-تنش و در کشف سازوکارهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی مؤثر در توزیع قندها در گیاه می‌باشد (Siahpoosh *et al*., 2012). تغییر در توزیع ساکارز در گیاه به دو روش قابل انجام است: (الف) تیمارهای خارجی در کاهش عملکرد اندام‌های اتوتروف و یا اندام‌های هتروتروف مانند بریدن برگ‌ها (Gifford *et al*., 1984). با توجه به این که در این روش تیمارهای اعمال شده غیر از اثر اصلی اثرات ثانوی چون تنش و تغییرات شدید هورمونی

در گیاه ایجاد می کنند، لذا این روش چندان توصیه نمی شود. (ب) دستکاری درونی گیاه[1] با استفاده از تکنیک‌های مولکولی روشی است که اخیراً در مطالعات مبدأ و مقصد مورد توجه واقع شده است (Lemoine, 2000). جهت تغییر در توزیع ساکارز با استفاده از تکنیک‌های مولکولی دو روش ارائه گردیده است: یکی دستکاری ناقلین ساکارز[2] در بارگیری و تخلیه ساکارز در فلوئم و دیگری استفاده از آنزیم آپوپلاستی اینورتاز[3] در شکستن ساکارز به گلوکز و فروکتوز. در خلال دهه گذشته ژن‌های کنترل کننده ناقلین ساکارز (به طور اختصار SUT) در تک لپه‌ای و دو لپه‌ای‌ها کشف شده‌اند. در برنج پنج ژن OsSUT1، OsSUT2، OsSUT3، OsSUT4 و OsSUT5 شناسایی شده و ویژگی‌های آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (Aoki *et al*., 2003).

در مطالعات پیشین به نقش مهم ژن‌های ناقل ساکارز در ایجاد سازگاری نسبت به تنش شوری در برنج تأکید شده است (Shinozaki *et al*., 2005). Siahpoosh *et al.* (2012) بر اساس مشاهدات خود متوجه شدند که تخصیص ساکارز به ریشه ممکن است پاسخ برنج به سطوح بالای شوری را تغییر دهد. این محققین به منظور آزمایش این فرضیه از لاین‌های آنتی‌سنس ناقل ساکارز استفاده کردند و در طی آزمایشات هیدروپونیک در فیتوترون مشاهده کردند که بر خلاف انتظار، با وجود اختلال در یکی از اجزای انتقال ساکارز، سطوح ساکارز در ریشه افزایش یافته و متعاقب آن هدایت روزنه‌ای، کارایی فتوسنتز و تحمل به شوری لاین‌های تراریخت در شرایط تنش شدید شوری بهبود یافت. همانطور که اشاره گردید تغییر در تخصیص ساکارز به اندام‌های مختلف گیاه نقش بسیار مؤثری در بهبود پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی دارد. یکی از فرضیات مطرح در این زمینه تخصیص بیشتر ساکارز به ریشه در برنج و نقش آن در افزایش تحمل به شوری گیاه می باشد. این فرضیه جهت اثبات و اتخاذ راهکارهای عملی بکارگیری در برنامه‌های بهنژادی نیاز به انجام مطالعات مولکولی و فیزیولوژیک تکمیلی در شرایط طبیعی رشد گیاه دارد. به این منظور در پژوهش اخیر اثر تغییر در توزیع ساکارز در تحمل به شوری لاین‌های تراریخت برنج در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط مزرعه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

الف) مواد و روش های بخش زراعی

این آزمایش به صورت کشت گلدانی در شرایط مزرعه‌ای، در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید

1. In vivo manipulation
2. Sucrose transporters
3. Appoplastic invertase

چمران اهواز اجرا گردید. آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور اصلی شامل سه سطح شوری (۲، ۵ و ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر کلرید سدیم) و فاکتور فرعی شامل شش لاین و رقم برنج به نام‌های تای‌پای[1] (تیپ طبیعی)، پکالی[2] (رقم استاندارد متحمل به شوری)، نیپنبار[3] (رقم استاندارد حساس به شوری)، ۱-۸-۱۸۴-۳۷ (لاین آنتی‌سنس، ۸۳ درصد بیان ژن OsSUT1 در تای‌پای)، ۱-۷-۱۱۱-۳۷ (لاین آنتی‌سنس، ۶۹ درصد بیان ژن OsSUT1 در تای‌پای)، ۱-۶-۴۵-۳۴ (لاین آنتی‌سنس، ۱۶ درصد بیان ژن OsSUT1 در تای‌پای) بود. بذرهای برنج پس از شستشو و ضدعفونی، به‌منظور تهیه نشاء به جعبه‌های پلاستیکی حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل گردیدند. این جعبه‌ها به مدت هفت روز در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ده روز در روشنایی و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Siahpoosh *et al.*, 2012). برای کشت برنج در مزرعه گلدان هایی ۱۶ کیلویی تهیه و با خاک زراعی آب شویی شده پر شدند. بعد از این مرحله بر روی گلدان‌ها سیستم آبیاری قطره‌ای نصب گردید و به این ترتیب شرایط غرقابی مورد نیاز برای کشت برنج فراهم شد. در نهایت در تاریخ ۲۹ خرداد ماه اقدام به نشاکاری کرده و به هر گلدان سه نشا منتقل گردید (Sharmasarker, 2001). اعمال شوری از چهار هفته پس از انتقال نشاها به گلدان به صورت پلکانی و با تیمار ۵۰ میلی مولار آغاز شد و با اعمال چهار لیتر آب شور در هر مرحله در نهایت بعد از ۱۴ روز به سطح ۲۰۰ میلی مولار رسانده شد. به منظور آبیاری سطوح شاهد از سیستم لوله‌کشی آب شهری و جهت اعمال دو سطح شوری ملایم و شدید از روش دستی استفاده گردید. به این منظور در تانکرهای ۵۰۰ لیتری به میزان لازم NaCl اضافه کرده و هدایت الکتریکی آن تنظیم گردید. از آن‌جا که گیاه برنج جهت رشد-ونمو نیاز دائمی به شرایط غرقابی دارد، لذا در طول روز سیستم آبیاری قطره‌ای باز بوده و اضافه کردن آب شور به گلدان‌ها در عصر صورت می‌گرفت. به این منظور ابتدا آب خروجی گلدان‌ها جمع آوری و هدایت الکتریکی آن اندازه‌گیری می‌شد و با بررسی برابر بودن هدایت الکتریکی آب خروجی و میزان تیمارهای اعمال شده از درستی و دقت اعمال تنش اطمینان حاصل می‌گردید، و پس از اعمال تنش، سیستم آبیاری در طول شب به طور کامل بسته می-شد.

پس از گذشت ۲۱ روز از اعمال تنش شوری، ابتدا صفات هدایت روزنه‌ای با استفاده از دستگاه پرومتر (مدل ELE ساخت کشور انگلستان) و میزان سبزینگی برگ بوسیله دستگاه SPAD

1. Tai pai
2. Pokkali
3. Niponbare

(مارک مینولتا ۵۰۲) اندازه‌گیری شد. سپس گیاهان به منظور اندازه‌گیری صفات وزن خشک اندام هوایی، درصد محتوای نسبی آب برگ به روش Ritchie *et al.*, (1990) و مقدار کل قندهای محلول در برگ به روش تغییر داده شده Shlegl *et al.*, (1986) برداشت شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گردید.

ب) مواد و روش های بخش مولکولی

برای انجام این قسمت از پروژه از همکاری مؤسسه ماکس پلانک در فیزیولوژی مولکولی گیاهی در کشور آلمان استفاده شد. لاین تیپ‌طبیعی، به‌همراه هر سه لاین آنتی‌سنس به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی، در سه تکرار و در دو سطح شوری (۰ و ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم) به روش Greegorio *et al.* (1997) در یک کشت هیدروپونیک مورد بررسی قرار گرفتند. لاین‌ها در محلول غذایی Yoshida (1981) کاشته شدند و تیمارهای شوری ۲٤ روز پس از کشت اعمال گردیدند. ۱٤روز پس از اعمال شوری، برگهای نمونه‌های گیاهی برداشت شد. RNA کل با استفاده از کیت شرکت کیاژن استخراج و اولین رشته cDNA ساخته شد و از آن در qRT-PCR با استفاده از ترکیب سایبرگرین در چهار تکرار بر اساس روش ارائه شده توسط Czechowski *et al.* (2005) استفاده گردید. آغازگرهای اختصاصی برای ژن های اختصاصی OsSUT1، OsSUT2، OsSUT3، OsSUT4 و OsSUT5 و ژن‌های خانه‌دار[1] actin، actin1، Tubulin- β و 1α elongation factor (EF) بر اساس توالی آن‌ها در بانک اطلاعاتی NCBI و به ترتیب با شماره دسترسی os03g50890، os05g36290، os01g59150 و os03g08020 طراحی شدند. جهت بررسی الگوی بیان ژن‌ها از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001) استفاده شد.

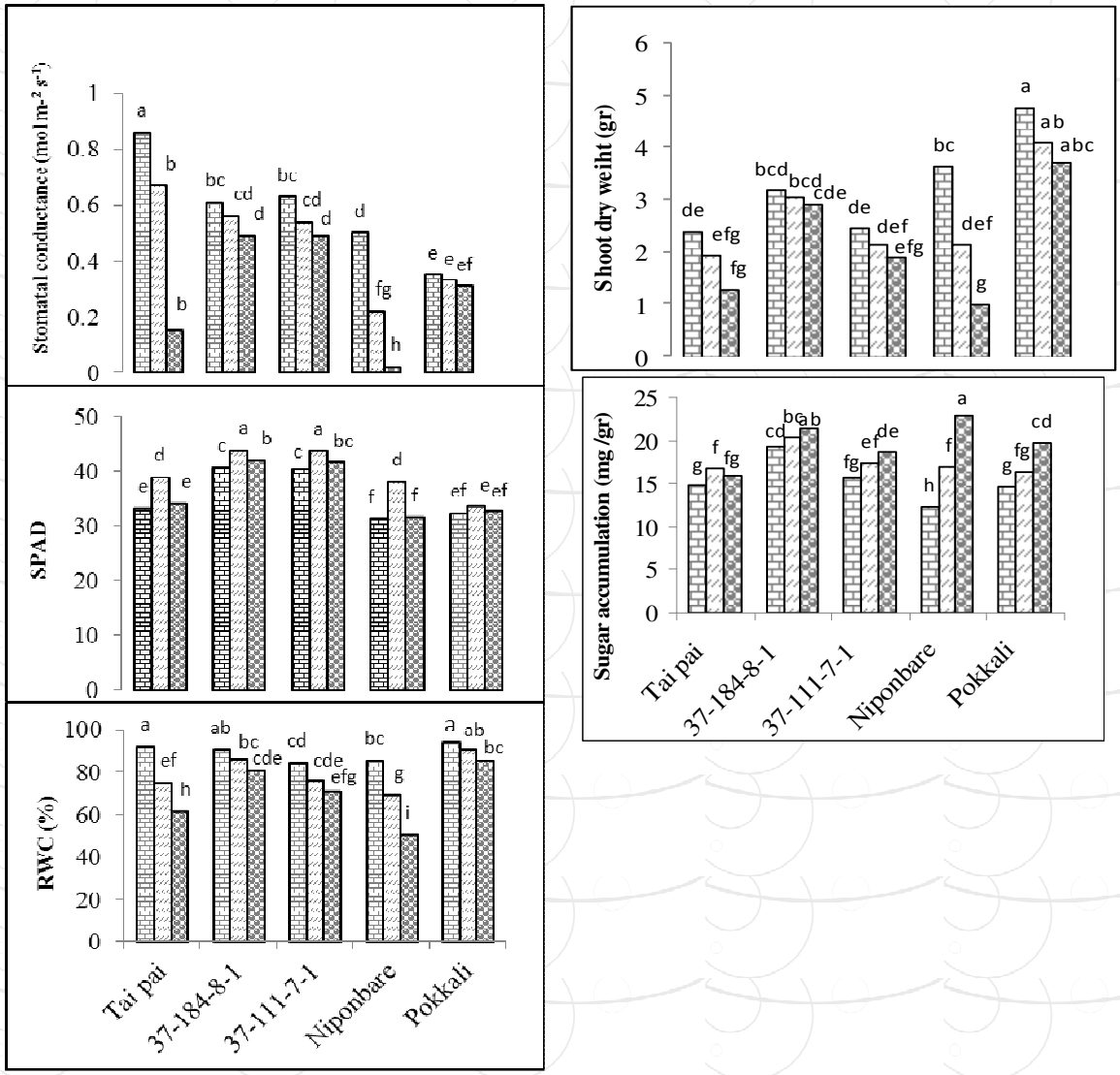
نتایج و بحث

همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود نتایج حاصل از اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک در لاینهای آنتی‌سنس نشان داد که با وجود کاهش میزان بیان ژنOsSUT1 ، صفات هدایت روزنه‌ای، عدد SPAD و محتوای نسبی آب برگ، در شرایط تنش شوری شدید بهبود یافت.

مقایسه رفتار لاین‌های آنتی‌سنس ۱-۸-۱۸٤-۳۷ و ۱-۷-۱۱۱-۳۷، از نظر این صفات با لاین مادری آن‌ها (تای‌پای) و رقم حساس نشان از برتری لاین‌های آنتی‌سنس داشت. بر اساس

1. Housekeeping genes

مطالعات قبلی، این صفات به عنوان صفاتی که می‌توان از آن‌ها در ارزیابی تحمل گیاهان به شوری استفاده کرد گزارش شده‌اند (El-Hendawy *et al*., 2007).



شکل ۱- رفتار لاین‌های آنتی‌سنس OsSUT1 در پاسخ به سطوح مختلف شوری. A: هدایت روزنه‌ای، عدد SPAD و محتوای نسبی آب (RWC). B: وزن خشک اندام هوایی و قندهای محلول در برگ. ستون‌های با حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد ندارند (بر اساس آزمون دانکن).

Figure 1- Performance of OsSUT1 anti-sense lines in response to different levels of salt concentrations. A: Stomatal conductance, SPAD and Relative water content (RWC). B: Shoot dry weight and Sugar accumulation. The values with the same letter in a column are not significantly (P <0.05) different (Based on Duncan test).

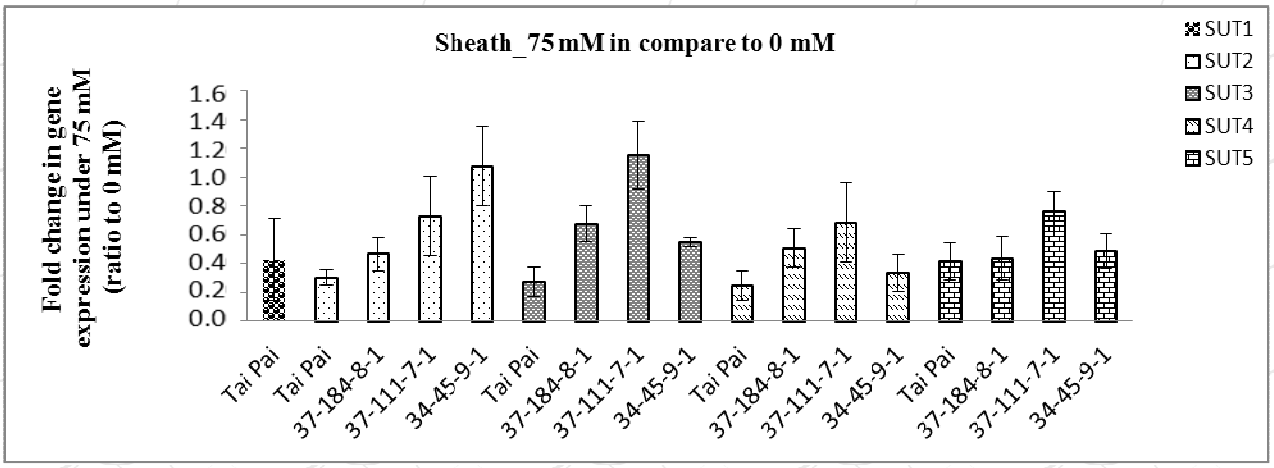
میزان هدایت روزنه‌ای در رقم نیپنبار با افزایش شوری به سرعت کاهش یافت. در مقابل، لاین‌های آنتی‌سنس OsSUT1 قادر به حفظ هدایت روزنه‌ای خود (۰/٤۹ مول بر مترمربع بر ثانیه) حتی در غلظت بالای نمک (۲۰۰ میلی‌مولار) بودند. اندازه‌گیری عدد SPAD نشان داد که در تمامی لاین‌ها و ارقام، عدد SPAD تا سطح ۵۰ میلی‌مولار افزایش و در سطح ۲۰۰ میلی‌مولار کاهش یافت. بر اساس نتایج بدست آمده میزان کاهش صفات هدایت روزنه‌ای و عدد SPAD در تنش شوری شدید در لاین‌های آنتی‌سنس کمتر از تای‌پای بود و لاین‌های آنتی‌سنس در شرایط تنش شوری شدید کمترین کاهش را نشان دادند (شکل۱). میزان محتوای نسبی آب برگ نیز بطور معنی‌داری در لاین‌های آنتی‌سنس برتر از تای‌پای بود به گونه‌ای که این لاین‌ها قادر به حفظ بیشتر محتوای آب برگ خود در شرایط تنش شوری شدید بودند (شکل۱). وزن خشک با افزایش شوری به طور معنی‌داری کاهش یافت. در کلیه لاین‌های مورد آزمایش، افزایش شوری موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.01$) وزن خشک بوته شد. با این وجود، لاین‌ها و ارقام مختلف مورد آزمایش از نظر این صفت دارای تفاوت‌های معنی‌داری ($P\leq0.01$) با یکدیگر بودند. لاین‌های آنتی‌سنس ۱-۸-۱۸٤-۳۷ و ۱-۷-۱۱۱-۳۷ (به‌ترتیب با ۳/۱۸ و ۲/٤٦ گرم در بوته) تغییرات کمتری نسبت به این صفت از خود نشان دادند و در شرایط تنش شوری شدید (۲۰۰ میلی مولار) میزان کاهش این صفت در لاین‌های آنتی‌سنس OsSUT1 کمتر از سایر ارقام بود (شکل۱).

تجمع کل قندهای محلول شامل ساکارز، گلوکز و فروکتوز به عنوان اسمولایت‌های سازگار کننده در تنظیم اسمزی، از طریق کمک به سلول‌های گیاهی برای حفظ حالت هیدراته آن‌ها و در نتیجه ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های شوری و خشکی شدید گزارش شده است (Rontein *et al*., 2002). بنابراین نقش مشارکتی مکانیسم‌های ناقلین ساکارز در گیاهان به منظور درک روابط فیزیولوژیکی عمومی گیاه و مهمتر از آن در طی تنش‌های محیطی ضروری است (Ibraheem *et al*., 2011).

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، در لاین‌های مورد بررسی، میزان قندهای محلول یک روند صعودی را طی نمود. تغییرات لاین‌های آنتی‌سنس ۱-۸-۱۸٤-۳۷ و ۱-۷-۱۱۱-۳۷ از نظر میزان قندهای محلول بیشتر از تای‌پای و کمتر از رقم متحمل بود (شکل۱) و احتمالاً این موضوع نشان دهنده آن است که لاین‌های آنتی‌سنس OsSUT1 دارای آمادگی اولیه به جهت مقابله با شرایط دشوار تحت تنش بوده‌اند.

همانگونه که مشاهده شد تمامی لاین‌ها و ارقام برنج در مرحله رشد رویشی با قرار گرفتن در معرض تنش شوری کلرید سدیم دچار کاهش رشد

شدند اما رفتار آن‌ها با یکدیگر متفاوت بود. به گونه‌ای که با مقایسه لاین‌های تراریخت آنتی‌سنس ناقل ساکارز مشخص گردید که گرچه لاین ۱-۷-۱۱۱-۳۷ از نظر مورفولوژیکی تقریبا مشابه با لاین تیپ‌طبیعی رفتار نمود، اما لاین‌های آنتی‌سنس در کلیه صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تحت شرایط تنش، نسبت به پس زمینه ژنتیکی خود یعنی تای‌پای، برتری داشتند. پس از بررسی میزان بیان ژن‌های خانواده ناقلین ساکارز در برنج (OsSUT) در غلاف برگ لاین تای‌پای و لاین‌های آنتی‌سنس، در شرایط تنش نسبت به شاهد، مشخص گردید که در تمامی لاین‌ها بیان ژن‌های ناقلین ساکارز در شرایط تنش کاهش یافت. همچنین نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان ژن‌های OsSUT2، OsSUT3، OsSUT4 و OsSUT5 به ویژه OsSUT2 و OsSUT3 در لاین‌های آنتی‌سنس نسبت به تای‌پای در شرایط تنش ۷۵ میلی‌مولار نسبت به صفر میلی‌مولار افزایش یافته است (شکل۲).



شکل۲- آنالیز بیان خانواده ژنی ناقلین ساکارز در غلاف برگ برنج تای‌پای و لاین‌های آنتی‌سنس در تیمارهای شوری.

Figure 2- Gene expression analysis of OsSUT-gene family in the samples of leaf sheath from individuals of *Oryza sativa* cv. Tai pai and antisense lines during salt treatment.

چنین به نظر می‌رسد که کاهش بیان OsSUT1 بوسیله افزایش بیان دیگر اعضای خانواده این ژن جبران می‌گردد. Siahpoosh *et al.* (2012) در آزمایش خود نشان دادند که علی‌رغم کاهش بیان ژن OsSUT1 در لاین‌های آنتی‌سنس میزان ساکارز در ریشه این گیاهان نسبت به لاین

تیپ طبیعی افزایش داشته است. افزایش بیان سایر ژن‌های خانواده ناقلین ساکارز بویژه OsSUT2 و OsSUT3 در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال در مقایسه با لاین تیپ طبیعی می‌تواند توجیه کننده این پدیده باشد. علاوه بر این کاهش متوسط بیان ژن OsSUT1 در لاین تای‌پای احتمالاً به دلیل اثرات پلیوتروپی این ژن منجر به رفتارهای فیزیولوژیکی متفاوتی در لاین‌های آنتی‌سنس می‌شود که نتیجه نهایی آن عملکرد بهتر این لاین‌ها در شرایط تنش می‌باشد.

نقش پنج عضو خانواده ژن‌های ناقلین ساکارز برنج (OsSUT) تا حد زیادی ناشناخته است (Braun *et al*., 2009). در این میان، ژن OsSUT1 بیش از سایر ژن‌های این خانواده مورد بررسی قرار گرفته است و شواهد حاکی از نقش مهم این ژن در توزیع و انتقال مجدد کربوهیدرات ها بویژه در زمان پر شدن دانه و جوانه‌زنی بذور است (Aoki *et al*., 2003; Scofield *et al*., 2002). با بررسی پروفایل بیان ژن OsSUT1 مشخص شد که این ژن در سلول‌های همراه عناصر آوندی در دستجات آوندی بیان می‌شود و این خود مبین نقش فعال این ژن در بارگیری ساکارز در آوندهای آبکش به منظور انتقال به بافت‌های هتروتروف در شاخساره و ریشه می‌باشد (Scofield *et al*., 2007). با استفاده از لاین‌های آنتی‌سنس ناقل همراه ساکارز–پروتون نشان داده شده است که ناقلین ساکارز نقش مهمی در انتقال فلوئمی دارند. بر اساس نتایج، انتقال فعال آپوپلاستی عامل اصلی انتقال ساکارز به فلوئم می‌باشد. بر اساس این مدل ناقلین ساکارز در دیواره پلاسمایی استقرار داشته و مسیر اولیه حرکت ساکارز در مسیر طولانی انتقال را فراهم می‌کنند و بهترین حالت رایج آن در برنج و سایر گرامینه‌ها به اثبات رسیده است (Riesmeie *et al*., 1993). بر این اساس چنانچه فرض بر این باشد که کاهش بیان OsSUT1 در شرایط شوری، منجر به کاهش بارگیری فلوئم آپوپلاستی و در نتیجه از دست‌روی ساکارز در طی مسیر طولانی انتقال به ساقه می‌گردد، ممکن است چنین تصور گردد که در این شرایط، ساکارز کمتری به ریشه اختصاص می‌یابد و مطابق این استدلال، لاین‌های آنتی‌سنس OsSUT1 به دلیل کارآمدی کمتر آن‌ها در تحویل ساکارز به ریشه، به‌شدت نسبت به تنش شوری حساس می‌گردند، اما مشاهدات این آزمایش، کاملاً در تضاد با این انتظار بود. چرا که لاین‌های آنتی‌سنس OsSUT1 مشابه لاین والدینی خود (تای‌پای) رفتار نموده و حتی کاهش بیان ژن OsSUT1 در لاین‌های آنتی‌سنس سبب بهبود رفتارهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گردید. این نتایج با یافته‌های (Siahpoosh *et al*., 2012) همخوانی داشت.

به طور خلاصه، نتایج این تحقیق نشان داد که تخصیص بیشتر مواد فتوسنتزی به ریشه، به

منظور افزایش تحمل به شوری در برنج می‌تواند یکی از اهدف اصلی برنامه‌های اصلاحی واقع شود. قابل ذکر است که اگر دستیابی به این هدف با دستکاری ناقلین ساکارز مورد نظر باشد، محققین با دو محدودیت روبرو خواهند بود: اول، انتخاب یا مهندسی این صفت باید در جهت کاهش متوسط و بهینه ژن OsSUT1 صورت پذیرد. به عبارت دیگر بایستی از کاهش بیان بیش از حد این ژن خودداری کرد. چرا که به علت ضعف شدید لاین آنتی‌سنس ۱-٦-٤٥-٣٤ با ١٦ درصد بیان ژن OsSUT1 امکان کشت آن در شرایط مزرعه وجود نداشت و به ناچار اقدام به حذف این لاین گردید. دوم این که از آن‌جا که فعالیت ژن OsSUT1 برای پر شدن دانه و جوانه‌زنی مطلوب در شرایط شوری مورد نیاز است، لذا تلاش در جهت تغییر بیان ژن OsSUT1 فقط در مراحل رشدی مشخص می‌تواند منجر به نتایج مطلوب شود. به عبارتی پیشرفت در مهندسی بیان ژن در تنظیم بیان ژن‌ها در مراحل مختلف رشدی گیاه می‌تواند نوید بخش پیشرفت‌های شگرف در علم اصلاح نباتات در آینده باشد.

سپاسگزاری

به این وسیله از جناب آقای دکتر یوست فان دونگن (Joost T. van Dongen) عضو هیئت علمی موسسه ماکس پلانک در فیزیولوژی مولکولی کشور آلمان که در تهیه بذور و قسمتی از مراحل اجرایی این تحقیق، ما را یاریگر بودند سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Ahmad SH, Niazi Ardekani J (2006). The effect of water salinity on growth and physiological stages of eight canola (*Brassica napus*) cultivars. Irrigation Science 25: 11-20.

Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfeld PR, Furbank RT (2003). The sucrose transporter gene family in rice. Plant Cell Physiolgy 44: 223-232.

Bhuiyan NI, Paul DNR, Jabber MA (2002). Feeding the extra millions by 2025: challenges for rice research and extension in Bangladesh. In: Proceedings of the National Workshop on RiceResearch and Extension, Bangladesh Rice Research Institute, Gazipur, January 29-31.

Braun DM, Slewinski TL (2009). Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. Plant Physiology 149: 71- 81.

Cuartero J, Bolarin MC, Asians MJ, Moreno V (2006). Increasing salt tolerance in the tomato. Experimental Botany 57: 1045- 1058.

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiology 139: 5-17.

El-Hendawy SE, Hu Y, Schmidhalter U (2007). Assessing the suitability of various physiological traits to screen wheat genotypes for salt tolerance. Integr. Plant Biology 49: 1352-1360.

Filho G A S, Ferreira BS, Dias JM, Queiroz KS, Branco AT, Bressan-Smith RE, Oliveira JG, Garcia AB (2003). Accumulation of SALT protein in rice. Plant Science 164: 623-628.

Gifford RM, Thorne JH, Hitz WD, Giaquinta RT (1984). Crop Productivity and Photoassimilat Partitioning. Science 225: 801-808.

Greegorio GB, Senenadhira D, Mendoza D (1997). Screening rice for salinity tolerance. IRRI Discussion Paper Series Number 22. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Ibraheem O, Dealtry G, Roux S (2011). The effect of drought and salinity on the expressional levels of sucrose transporters in rice (*Oryza sativa* Nipponbare) cultivar plants. Plant Omics Journal 4: 68-74.

Lemoine R (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure. Biochimica et Biophysica Acta 1465: 246-262.

Livak K J, Schmittgen, T D (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25: 402-408.

Momayezi MR, Zaharah AR, Hanafi MM, Mihd Razi I (2009). Seed germination and proline accumulation in rice (*oryza sativa L.*) as affected by salt concention. Agricultural Science 32: 247 -259.

Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB (1993). Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. Plant Cell 5: 1591-1598.

Ritchie SW, Nguyen HT, Haloday AS (1990). Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop science 30: 105-111.

Rontein D, Basset G, Hanson AD (2002). Metabolic engineering of osmoprotectants accumulation in plants. Metabolic Engenering 4:49-56.

Scofield GN, Hirose T, Gaudron JA, Upadhyaya NM, Ohsugi R, Furbank RT (2002). Antisense suppression of the rice sucrose transporter gene, osSUT1, leads to impaired grain filling and germination but does not affect photosynthesis. Functional plant Biology 29: 815-825.

Scofield GN, Aoki N, Hirose T, Takano M, Jenkins CLD, Furbank RT (2007). The role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and development of rice plants. Experimental Botany 58: 483-495.

Sharmasarker FC (2001). Assessment of drip and flood irrigation on water and fertilizer use efficiency for sugar beets. Agriculture. Water Management 30: 241-251.

Shlegl HG (1986). Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. Plant Sciences 41: 47-51.

Shinozaki N, Yamada EM, Yoshiba EY (2005). Analysis of salt stress-inducible ESTs isolated by PCR-subtraction in salt tolerant rice, Theoretical and Applied Genetics 110: 1177–1186.

Siahpoosh MR, Sanchez D, Van Dongen J, Kopka J (2012). Modification of OsSUT1 expression modifies the salt response of rice (*Oryza sativa* cv. Tai Pai). Plant Science 182:101-111.

Yoshida S (1981). Fundamentals of rice crop science. IRRI. Los Banos, Philippines.

Salinity tolerance assessment of rice sucrose transporter antisense lines (OsSUT1) at seedling stage (*Oryza sativa* var. TaiPai)

Ghamar M.[1], Siahpoosh M.R.*[2], Hassibi P.[2]

[1]M.Sc. student of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
[2]Academic member of Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.

Abstract

In order to evaluate the effects of changing in sucrose partitioning on salt tolerance of rice plants in the seedling stage, a pot experiment was conducted in a split plot based on a randomized complete block design with three replications in the fields of Shahid Chamran University of Ahvaz. The experiment consisted of six lines and cultivars including, wild type (Tai pai), three antisense lines for sucrose transporter SUT1 gene (37-184-8-1, 37-111-7-1 and 34-45-6-1), salinity tolerant (Pokali) and salinity sensitive (Nipponbare) which were exposed to three salinity levels (2, 5 and 16 ds/m sodium chloride). 21 days after salt commencement, shoot dry weight, leaf relative water content, SPAD score, stomatal conductance and total soluble sugars in leaves were evaluated. Increasing in salinity led to increase in levels of soluble sugars and SPAD score and decrease in shoot dry weight, stomatal conductance and leaf relative water content. The results of this study showed that 37-184-8-1 and 37-111-7-1 antisense lines behaved similarly to pokali under salinity stress treatments and were superior in compare to Tai pai as wild type. The expression profiling experiment of sucrose transporter gene family of rice in antisense lines showed relatively reduction in expression of these genes after exposing to salinity. However, this reduction in antisense lines was less than the wild type. According to the results of this study it seems that manipulating the sucrose partitioning in rice plants may improve the salinity tolerance of transgenic lines at seedling stage and this could be suggested as a strategy in breeding programs.

Keywords: Gene expression, Nipponbare, Pokali, Sucrose transporter, Tai pai.

* Corresponding author: Siahpoosh M.R. Tel: 0611-3364056 Email: Siahpoosh@scu.ac.ir