

بررسی کمی بیان ژن سوکروز سینتاز ۱ در گیاه گندم تحت تنش شوری

علی اصغر چوبداری M.Sc.، اکبر صفی پور افشار Ph.D.*، فاطمه سعید نعمت پور Ph.D.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، گروه زیست شناسی، نیشابور، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: asafshar4@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۷

چکیده

هدف: در این تحقیق اثر تنش شوری بر میزان بیان کمی ژن سوکروز سینتاز ۱ (Sus1)، محتوای نسبی آب و نسبت جذب سدیم به پتاسیم برگ‌های گندم بررسی شد.

مواد و روش‌ها: دانه‌رست‌های گندم رقم بم تحت تاثیر غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم قرار گرفتند و در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت پس از اعمال تنش، تغییرات محتوای نسبی آب، نسبت جذب سدیم به پتاسیم توسط برگ‌ها و همچنین بیان کمی ژن Sus به روش QRT-PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار محتوای نسبی آب، افزایش نسبت جذب سدیم به پتاسیم توسط برگ‌ها و بالا رفتن نسبی بیان ژن Sus1 در گیاهان تیمار شده نسبت به گروه شاهد بود.

نتیجه گیری: به‌طور کلی افزایش بیان ژن سوکروز سینتاز ۱ می‌تواند یکی از مکانیسم‌های احتمالی گیاه گندم در فرایند تحمل به تنش شوری باشد.

واژگان کلیدی: بیان کمی ژن، سوکروز سینتاز ۱، Real-Time PCR، گندم

مقدمه

سطح و توزیع فعالیت سوکروز سینتاز در بافت‌های مختلف، نگرش معنی‌داری نسبت به انتقال و مصرف کربوهیدرات‌ها در طول رشد گیاه و پاسخ گیاه به تنش‌های مختلف محیطی را فراهم می‌کند (۱۸ و ۱۹). در برخی از گونه‌های گیاهی مانند گندم، بیان ژن Sus در درجه حرارت پایین افزایش می‌یابد، که می‌تواند کمک مضاعفی برای مواجهه با افزایش تقاضای ناشی از فرآیند گلیکولیتیک باشد (۲۰ و ۲۴). مطالعات نشان داده است که افزایش بیان سوکروز سینتاز موجب تغییر در بیان ژن‌های دخیل در فرآیندهای متعددی مانند سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها، لیپیدها، بیوسنتز دیواره‌ها، تبدیل انرژی، تولید متابولیت‌های ثانویه، ساخت و حفاظت پروتئین‌ها و پاسخ به تنش‌ها می‌شود (۱۵). به‌طور کلی مشاهده شده است سوکروز سینتاز یکی از ژن‌هایی است که بیان آن در گیاهان تحت تنش تغییر می‌کند (۲۱).

در گندم و جو، دو ژن Sus (Sus1 و Sus2) وجود دارد که هر کدام از آن‌ها برای برخی بافت‌ها اختصاصی می‌باشند. ژن‌های Sus1 و Sus2 گندم در بازوی کوتاه گروه کروموزوم‌های یکسان ۷ جدا سازی و نقشه‌گذاری شده‌اند. در صورتی که جایگاه این ژن‌ها در جو به ترتیب روی کروموزوم‌های 7HS و 2HS مشخص شده است (۲۲ و ۲۵). Sus2 فقط در اندوسپرم بیان می‌شود در حالی که Sus1 هم در ریشه و هم برگ‌ها بیان می‌شود (۲۲ و ۲۳).

در این پژوهش، میزان کمی بیان ژن سوکروز سینتاز ۱ در سطح mRNA به روش Real - Time PCR و همچنین محتوای نسبی آب و نسبت یون سدیم جذب شده به پتاسیم برگ‌ها در فواصل زمانی پس از اعمال تنش شوری در رقمی متحمل به شوری از گندم، ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

شرایط رشد گیاهان و اعمال تنش: این پژوهش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در محل آزمایشگاه‌های دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور در سال ۱۳۹۳ انجام شد. بذر گندم رقم بم، که به‌عنوان یک رقم متحمل به شوری شناخته می‌شود از موسسه اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شد.

در ابتدا بذرهای به‌وسیله هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و اتانول ۷ درصد ضدعفونی و چندین بار توسط آب مقطر استریل شستشو و

همه خاک‌ها حاوی برخی نمک‌های محلول در آب هستند. گیاهان مواد غذایی خود را به‌شکل نمک‌های محلول جذب می‌کنند، اما انباشتگی اضافی نمک‌ها در خاک، شوری خاک نامیده می‌شود (۱). طبق گزارش مرکز بین‌المللی اصلاح گندم و ذرت (CIMMYT) ۸ الی ۱۰ درصد از مناطق تحت کشت گندم در کشورهای ایران، هند، پاکستان، لیبی و مکزیک تحت تاثیر شوری می‌باشند (۲). شوری اثرات متفاوتی را در گیاهان مختلف، همچون کاهش رشد (۳ و ۴)، کاهش سطح برگ‌ها (۵)، تغییر در تعداد و اندازه روزنه‌ها (۶)، زود چوبی شدن ریشه‌ها (۷) و جلوگیری از تمایز یافتن آوندهای چوبی و آبکش (۷) برجای می‌گذارد. علاوه بر موارد بالا، شوری چندین جنبه از رشد زایشی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد که شامل گل‌دهی، گرده افشانی، تکوین میوه، محصول و کیفیت دانه می‌باشد (۹).

در سطح سلولی اقداماتی که جهت مقابله با شوری صورت می‌گیرد را می‌توان شامل کدبندی درون سلولی، سنتز محافظت‌کننده‌های اسمزی، تحمل نسبت به Na^+ بالای سیتوپلاسمی، پاسخ به آسیب‌های حاصل از شوری و ترمیم آن‌ها، تغییر در بیان ژن و مسیریهای علامت‌دهی دانست (۱۰ و ۱۱). در تحقیقی Kawasaki و همکاران (۱۲) الگوی بیان ۱۷۲۸ ژن را در پاسخ به تنش شوری در گیاه برنج با روش ریز آرایه مورد بررسی قرار دادند. در پژوهشی دیگر Kawaura و همکاران (۱۳) نیز الگوی بیان ۳۲۰۰۰ ژن را در پاسخ به تنش شوری در گیاه گندم بررسی نمودند. به‌طور کلی ۳۴۱۶ ژن در شرایط شوری افزایش و ۲۵۸۰ ژن نیز کاهش بیان را نشان دادند. شناسایی ژن‌های جدید و تعیین الگوی بیان آن‌ها با هدف سازگار نمودن گیاهان به انواع تنش‌ها انجام می‌شود و باید در این راستا راه کارهای موثری در اصلاح گیاهان جهت بهبود تحمل تنش ایجاد شود (۱۴).

آنزیم سوکروز سینتاز با داشتن قابلیت برگشتی، تبدیل ساکارز را به یوریدین دی فسفات گلوکز و فروکتوز بر عهده دارد (۱۵) که اولین قدم از تبدیل سوکروز به نشاسته است و از این نظر ورود کربن به مسیر بیوسنتز نشاسته را کنترل می‌نماید (۱۶). سوکروز سینتاز با جابه‌جا نمودن سوکروز بین بیوسنتز دیواره سلولی و گلیکولیز، یک نقش ممتاز در زمان کمبود اکسیژن بازی می‌کند به گونه‌ای که الگوی رسوب سلولز با مناطق فعالیت بالای سوکروز سینتاز همبستگی دارد (۱۷).

دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی با احتیاط خارج و به رسوب باقی مانده یک میلی‌لیتر اتانول (۷۰ درصد) که با آب فاقد ریبونوکلاز تهیه شده است، اضافه شد و برای ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه مجدداً سانتریفیوژ انجام شد. سپس مایع رویی با احتیاط خارج و جهت خشک شدن رسوب، لوله با درب باز در دمای آزمایشگاه و زیر هود به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. سپس به رسوب تقریباً خشک شده به میزان ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب فاقد RNase اضافه شد. محلول حاصل در مقادیر کوچکتر در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌ها بعدی نگهداری شد.

ساخت Cdna. ساخت cDNA با استفاده از کیت Thermo Scientific (USA) به شرح زیر انجام شد. ۱ تا ۲ میکروگرم RNA کل استخراجی که با DNase تیمار شده و در نهایت حجم آن با آب بدون RNase به ۱۰ میکرولیتر رسیده بود با ۱ میکرولیتر (۱۸) Oligo dT مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۱ میکرولیتر RNase inhibitor (10u/μl)، ۴ میکرولیتر 5X RT buffer، ۲ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۲ میکرولیتر DTT (0.1M) و ۰/۵ میکرولیتر Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase enzyme (AMV RT) (10u/ μl) به ترتیب روی یخ به ویال‌ها افزوده و برای چند ثانیه اسپین شدند. مخلوط فوق به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (برای فعالیت آنزیم RT). واکنش با قرار دادن تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد متوقف و نمونه روی یخ سرد شد.

طراحی آغازگر: آغازگرهای مربوط به ژن کنترل داخلی اکتین از مقاله Dubcovsky و همکاران (۲۶) که اثر فتوپریود را بر تنظیم ژن‌های گل‌دهی گندم مورد بررسی قرار داده بود، استخراج شد. جهت طراحی آغازگرهای مخصوص ژن سوکروز سینتاز ۱ از توالی مربوط به این ژن که در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی AJ001117.1 موجود است، استفاده شد. کار طراحی آغازگرها به وسیله نرم افزار GeneRunr صورت گرفت. ضمن در نظر گرفتن خصوصیات استاندارد آغازگرها برای طراحی، از جمله طول آغازگر، دمای اتصال، درصد G و C، ایجاد دایمرهای احتمالی و لوپ یا حلقه در درون هریک از آغازگرها و نیز G مناسب، آغازگرها با نرم افزارهای On-Line، مجدد مورد بررسی قرار گرفتند.

آبکشی شدند. بذرها در گلدان‌های هم شکل و هم‌اندازه حاوی ماسه با دانه‌های متوسط و ریز کشت داده شدند و به صورت روزانه توسط آب مقطر استریل، آبیاری شدند. از روز دوم بعد از جوانه‌زنی تعدیه گیاهان با محلول هوگلند ۲۵ درصد شروع گشد و به تناوب هر دو روز غلظت هوگلند افزایش یافت.

دانه‌رست‌های هشت روزه با غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم تیمار شدند. در سطح صفر نمک یا گروه کنترل، گلدان‌ها با هوگلند فاقد نمک کلرید سدیم آبیاری شدند. در سایر سطوح نیز مقدار معینی NaCl درون هوگلند حل شد تا غلظت‌های مورد نظر حاصل شود. گلدان‌ها در دو نوبت و به فاصله ۲۴ ساعت با غلظت‌های مربوطه تیمار شدند.

نمونه برداری در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت پس از اولین نوبت اعمال تنش، صورت گرفت. در زمان نمونه‌برداری آخرین برگ تکامل یافته جهت محاسبه محتوای نسبی آب (RWC) جدا گردید و بر اساس پروتکل مربوطه عمل شد، چند برگ دیگر هم برای سنجش مقدار سدیم و پتاسیم برگ‌ها و همچنین بررسی بیان کمی ژن سوکروز سینتاز ۱ پس از جمع‌آوری و قرار گرفتن در نیتروژن مایع، به فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج RNA استخراج RNA با کیت جداسازی RNA کل شرکت دنا زیست انجام شد. برای این کار حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت گیاهی به همراه نیتروژن مایع درون یک لوله اپندورف سرد با استفاده از میله شیشه‌ای، به خوبی کوبیده و پودر شد و یک میلی‌لیتر بافر G1 به میکروتیوب اضافه و در ۲ پرید زمانی ۱۵ ثانیه به شدت ورتکس شد. پس از انکوبه شدن در دمای آزمایشگاه به مدت ۵ دقیقه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول فوقانی لوله به میکروتیوب جدید منتقل شد و میزان ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت لوله تکان داده یا ورتکس شد. لوله در دمای آزمایشگاه به مدت ۳ دقیقه انکوبه شد و بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی که حاوی RNA است به میکروتیوب جدیدی منتقل و به میزان نیمی از حجمش، به ترتیب ایزوپروپانول و بافر G2 به آن اضافه شد. بعد از مخلوط کردن محتویات لوله و ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای آزمایشگاه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰

جدول ۱: توالی و خصوصیات آغازگرهای سوکروز سینتاز ۱ و اکتین

نام آغازگر	توالی	طول قطعه سنتز شده	طول نوکلئوتیدی	دمای ذوب (Tm)	GC درصد	Self complementarity	Self 3' complementarity
Sus Forward	TGTTTCGCAATGGTGAGCTGTAC	۱۲۱	۲۲	۶۱/۴۴	۵۰/۰	۴	۴
Sus Reverse	TGTCGGCAAACCACATTCATG	۱۲۱	۲۱	۵۹/۷۳	۴۷/۶۲	۴	۴
Act Forward	ACCTTCAGTTGCCAGCAAT	۹۰	۲۰	۶۰/۱۸	۵۰	۵	۳
Act Reverse	CAGAGTCGAGCACAAATACCAGTTG	۹۰	۲۴	۶۱/۶۷	۵۰	۴	۲

۴ درجه سانتی‌گراد درون آب مقطر قرار گرفتند. پس از آن، وزن اشباع برگ‌ها اندازه‌گیری شد و برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد درون آن قرار گرفتند تا بعد از آن وزن خشک هر کدام از آن‌ها اندازه‌گیری شود. با قرار دادن اعداد حاصل از توزین در فرمول زیر، RWC به دست آمده:

$$RWC = \frac{Fw - Dw}{Sw - Dw} \times 100$$

Fw: وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه‌برداری

Dw: وزن خشک برگ بعد از قرار گرفتن در آون

Sw: وزن اشباع برگ بعد از قرار گرفتن در آب مقطر

اندازه‌گیری مقدار جذب سدیم و پتاسیم: جهت اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم برگ به روش EL-enany (۲۸)، ابتدا اندام هوایی گیاهان برداشت شده و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در آون خشک شدند. نمونه‌های خشک شده با استفاده از آسیاب پودر و برای انجام سایر مراحل آماده شدند. در ادامه ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی آسیاب شده توزین و ۱۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال ۰/۱ نرمال به آن‌ها افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه نگهداری و پس از آن نمونه‌ها به مدت دو ساعت درون حمام آب گرم (بن ماری) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها توسط قیف و کاغذ صافی (واتمن ۴۱) صاف و عصاره حاصل به فالتکون ۱۵ میلی‌لیتری دیگری منتقل شد. حدود ۱۵ تا ۲۰ دقیقه قبل از قرائت، دستگاه فلیم فتومتر (مارک JENWAY، ساخت کشور انگلستان) روشن شد تا کاملاً گرم شود و فیلتر دستگاه روی عنصر سدیم و یا پتاسیم بر حسب نیاز تنظیم شد.

دستگاه ابتدا با آب مقطر و محلول استاندارد ۱۰۰ ppm سدیم و

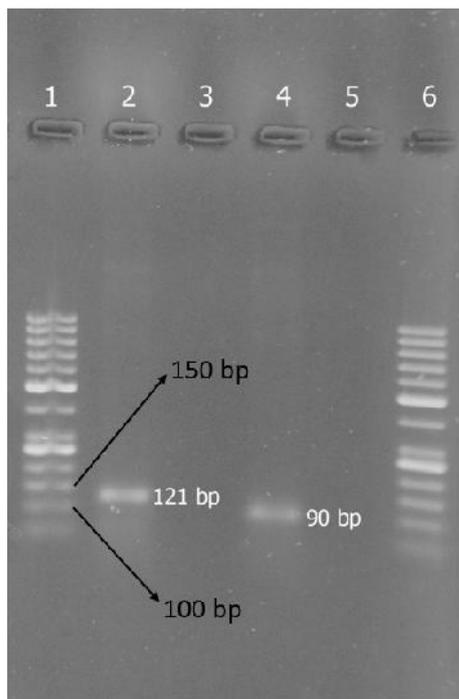
انجام روش QRT-PCR: مقایسه کمی بیان ژن Sus1 از روش Real time SYBER Green PCR با استفاده از دستگاه ABI (Applied Biosystems step-one) صورت گرفت. cDNA ساخته شده به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت و واکنش‌های qRT-PCR با پرایمرهای اختصاصی Sus1 و ژن کنترل داخلی Act (جدول ۱) انجام شد. برای هر واکنش ۳ تکرار در نظر گرفته شده بود. حجم مخلوط واکنش برای هر نمونه، ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBER Green، ۳ میکرولیتر از cDNA ساخته شده، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۶/۲ میکرولیتر آب مقطر استریل فاقد RNase، بود که پس از آماده و لود شدن در چاهک‌های پلیت مخصوص به دستگاه ABI منتقل شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با شرایط زیر انجام شد: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ تکرار با چرخه‌های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها به الگو و ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد جهت سنتز cDNA. مقادیر بیان کمی ژن با مقایسه بین میزان بیان ژن در نمونه‌ها و کنترل با استفاده از روش 2^{-CT} محاسبه گردید.

محاسبه محتوای نسبی آب (RWC): محاسبه محتوای

نسبی آب به روش Nguyen و Ritchie (۲۷) انجام شد. برای این منظور نمونه‌برداری با استفاده از قیچی از آخرین برگ نمو یافته تمامی تیمارهای آزمایشی انجام و نمونه‌ها بلافاصله درون یخ قرار گرفت و در آزمایشگاه وزن تر آن‌ها با ترازوی دقیق (۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد (برگ‌ها نباید دچار شکستگی و پارگی باشند). سپس تمامی نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای

QRT-PCR

برای اطمینان از انجام موفق و هدفمند PCR محصول واکنش که به روش QRT-PCR انجام شده بود، روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید (شکل ۲). وجود تک باندهای مربوط به قطعات ۱۲۱ جفت بازی از ژن *Sus* و ۹۰ جفت بازی از ژن خانه دار *Act* نشان می‌دهد واکنش با موفقیت انجام شده است.



شکل ۲: الکتروفورز محصول واکنش *qRT-PCR* روی ژل آگارز ۲ درصد. خط ۱ و ۶: سایز مارکر ۵۰bp شرکت *Fermentase* خط ۲: قطعه تکثیر شده از ژن *Sus1* به طول ۱۲۱bp. خط ۳: کنترل منفی *Sus1* خط ۴: قطعه تکثیر شده از ژن خانه دار *Act* به طول ۹۰bp خط ۵: کنترل منفی ژن خانه دار *Act*

محتوای نسبی آب (RWC)

نتایج این تحقیق نشان داد، مقدار RWC برگ‌ها به‌طور معنی‌داری ($p < 0/001$) در هر دو سطح شوری، نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. از دیگر سو، گذشت زمان نیز بر کاهش مقدار RWC، دارای اثر معنی‌دار ($p = 0/0019$) بود و بیشترین کاهش در زمان‌های ۲۴ و ۳۶ ساعت پس از تنش مشاهده شد. گیاهان تیمار شده با کلرید سدیم ۲۰۰ میلی‌مولار، در تمامی زمان‌های مورد بررسی، به‌جز زمان صفر، نسبت به گروه‌های تیماری ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و کنترل، کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0/05$). در حالی‌که تفاوت RWC در گروه تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک فقط در زمان‌های ۲۴

یا پتاسیم برای اعداد صفر و ۱۰۰ کالیبره گردید.

عدد حاصل از دستگاه بر روی منحنی استاندارد مشخص شد و غلظت معادل آن به میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌دست آمد. عدد حاصل از منحنی درون فرمول زیر قرار داده شد تا میزان سدیم یا پتاسیم بر حسب میلی‌گرم بر گرم محاسبه گردد.

$$y \times 10 \times 0.001 \times 10 = A \text{ mg.g-1}$$

A = میزان سدیم یا پتاسیم بر حسب میلی‌گرم بر گرم

y = عدد حاصل از منحنی بر اساس میلی‌گرم بر کیلوگرم

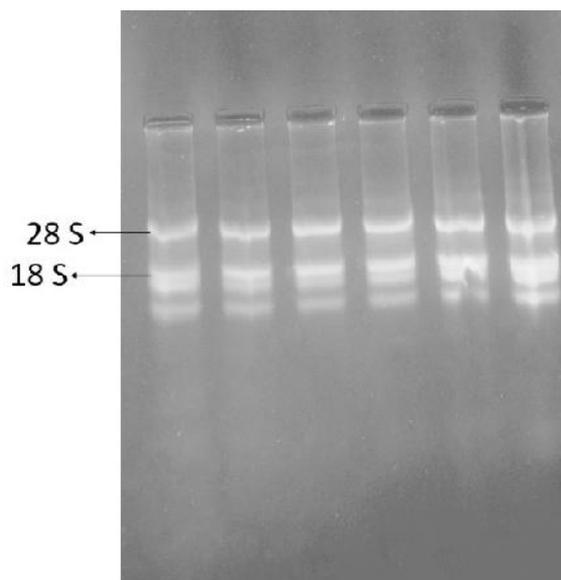
آنالیز آماری

برای تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹٫۱ استفاده شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ p لحاظ شد. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel (Microsoft office 2013) انجام شد.

نتایج

استخراج RNA

جهت اطمینان از کیفیت، RNA استخراج شده مورد بررسی‌های کمی و کیفی از طریق اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری و ژل الکتروفورز قرار گرفت. شکل ۱ باندهای مربوط به RNA ریبوزومی ۲۸S و ۱۸S را نشان می‌دهد.

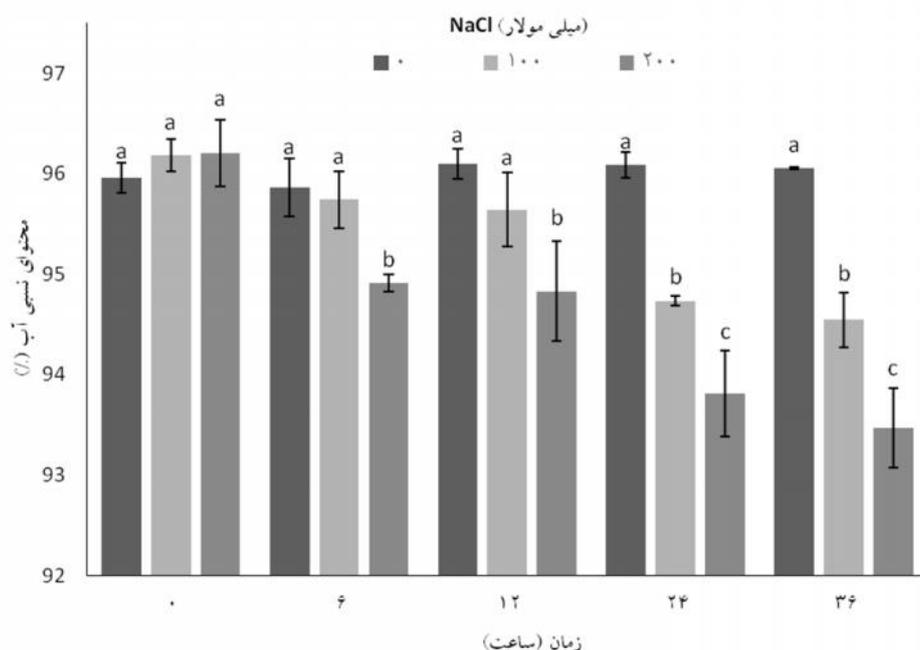


شکل ۱: اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی ۲۸S و ۱۸S

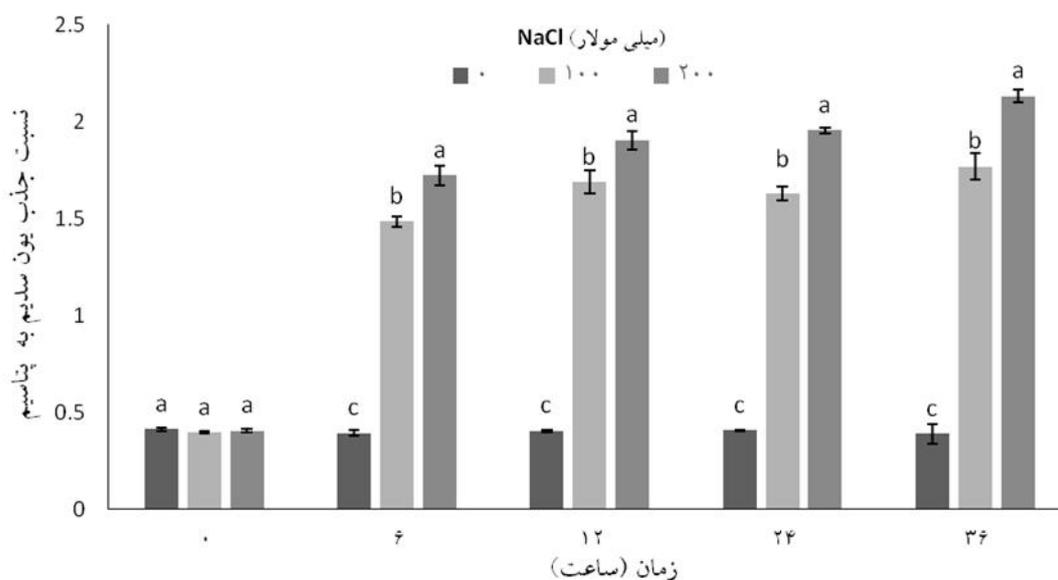
و ۳۶ ساعت پس از اعمال تنش با گروه کنترل معنی‌دار ($p < 0.05$) بود (نمودار ۱).
 و ۳۶ ساعت پس از تنش محاسبه شد (نمودار ۲).
 با هم بودند. در هر دو سطح شوری بالاترین نسبت

نسبت سدیم به پتاسیم جذب شده توسط برگ‌ها

نسبت جذب سدیم به پتاسیم توسط برگ‌ها در غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم دارای تفاوتی معنی‌دار



نمودار ۱: تاثیر متقابل زمان و NaCl بر محتوای نسبی آب. میانگین‌ها حاصل ۳ تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون LSD است. بارها نشان دهنده خطای استاندارد می‌باشند. زمان‌ها متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری شده‌اند.

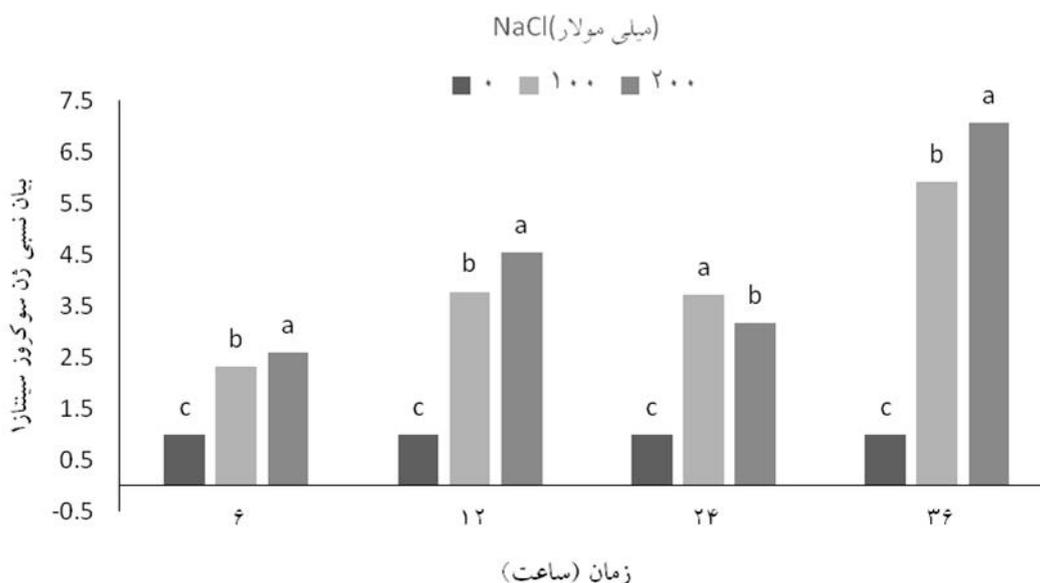


نمودار ۲: تاثیر متقابل زمان و NaCl بر نسبت سدیم جذب شده به یون پتاسیم توسط برگ‌ها. میانگین‌ها حاصل ۳ تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون LSD است. بارها نشان دهنده خطای استاندارد می‌باشند. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری شده‌اند.

بیان نسبی ژن *Sus1*

به کنترل افزایش یافت. اما در ۲۴ ساعت پس از تنش، گروه‌های تیماری در هر دو سطح شوری، کاهش نسبی بیان را نسبت به زمان قبل نشان دادند. حال آنکه این کاهش در گروه تیماری ۲۰۰ میلی مولار نمک بیشتر بود. در زمان ۳۶ ساعت پس از تنش نیز گیاهچه‌ها افزایش شدیدتری را در بیان ژن *Sus1* نشان دادند، در این زمان بیان نسبی ژن در گروه تیماری ۱۰۰ میلی مولار نمک ۵/۹۳ برابر و در گروه تیمار شده با نمک ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم به میزان ۷/۰۸ برابر نسبت به شاهد بود (نمودار ۳). به نظر می‌رسد افزایش بیان در زمان آخر را می‌توان به تشدید و تجمع شوری پس از نوبت دوم آبیاری گیاهچه‌های گندم در ساعت ۲۴ بعد از تنش اولیه دانست.

انجام QRT-PCR و تجزیه نتایج آن توسط دستگاه ABI نشان داد، در هر دو سطح شوری، بیان ژن *Sus1* نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) داشت. افزایش بیان، ۶ ساعت بعد از اعمال تنش، در هر دو غلظت مورد مطالعه رخ داد به طوری که گیاهچه‌های تیمار شده با نمک ۱۰۰ میلی مولار افزایش بیان ۲/۳۳ برابری و گروه تیماری ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم افزایش بیان ۲/۶ برابری را نسبت به کنترل نشان دادند. در ۱۲ ساعت بعد از تنش در هر دو غلظت مورد استفاده نمک، بیان نسبی ژن *Sus1* به ترتیب به میزان ۳/۷۸ و ۴/۵۵ برابر نسبت



نمودار ۳: تاثیر متقابل زمان و NaCl بر بیان نسبی ژن *Sus1* در برگ‌ها. میانگین‌ها حاصل ۳ تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون LSD است. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشند. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری شده‌اند

بحث

RWC به شکل معنی‌داری در هر دو غلظت کاهش پیدا کرد. هم‌سو با نتایج این تحقیق، Zheng و همکاران (۲۹)، Sairam و همکاران (۳۰) و Shamsi و Kobraee (۳۱) کاهش RWC را تحت تنش شوری گزارش نموده‌اند.

در این پژوهش، اثرات نمک کلرید سدیم با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار، بر محتوای نسبی آب، نسبت سدیم به پتاسیم جذب شده توسط برگ‌ها و بیان نسبی ژن سوکروز سینتاز ۱ در گیاهچه‌های رقم بم گندم (متحمل به شوری) بررسی شد و نتایج حاصل با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت.

محتوای نسبی آب (RWC)

تنش شوری همچون تنش‌های خشکی و سرما، علاوه بر سمیت یونی از طریق کاهش محتوای آب سلول‌های گیاهی موجب کاهش عملکرد گیاهان زراعی می‌شود. ارزیابی وضعیت آب گیاه به‌علت آنکه می‌تواند از دقیقه‌ای به دقیقه دیگر متغییر باشد، بسیار مشکل است. چرا که باید عواملی همچون هدایت روزنه‌ای، شرایط فیزیومتریک و فشار محیط رشد به‌طور دقیق اندازه‌گیری شوند. در مقابل به‌راحتی می‌توان محتوای نسبی آب را

بر اساس نتایج تحقیق، مقدار RWC در هر دو غلظت به‌کار رفته از نمک، کاهش یافت. در این‌حال کاهش در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک بیشتر بود. از طرفی با گذشت زمان نیز مقدار

فعال می‌باشد که به ماندگاری گیاه در این شرایط کمک می‌نماید. اگر چه سابقه‌ای از تحقیقات انجام شده در خصوص بررسی بیان این ژن در شرایط شوری و در گیاه گندم به دست نیامد، اما در تحقیقاتی افزایش بیان این ژن تحت تنش‌های سرما و کمبود اکسیژن را در برخی گیاهان گزارش شده است (۱۷) و (۴۰). عموماً نمی‌توان یک ژن را مسئول اصلی پاسخ گیاه در برابر عامل تنش‌زا دانست بلکه باید در تحقیقات مستمر به دنبال یک سری از عوامل موثر در پاسخ‌دهی گیاه بود. در این بین برخی عوامل مستقیم و برخی دیگر به شکل غیر مستقیم قدرت پاسخ‌دهی و تحمل گیاه را افزایش می‌دهند. در تحقیقات گذشته وجود همبستگی بین رسوب سلولز در دیواره سلولی با بیان بالای ژن سوکروز سینتاز به اثبات رسیده است (۱۷) که با توجه به نقش تنظیمی محصول این ژن در هدایت هدفمند کربوهیدرات‌ها به بیوسنتز دیواره سلولی و در نتیجه تقویت آن دور از انتظار نیست.

نتیجه گیری

هم‌راستای با بسیاری از تحقیقات گذشته، نسبت سدیم جذب شده به پتاسیم در برگ‌ها و محتوای نسبی آب آن‌ها در شرایط تنش شوری به ترتیب، افزایش و کاهش می‌یابند. با این توضیح که این تغییرات در غلظت بالاتر نمک شدیدتر می‌باشد. همچنین می‌توان ژن سوکروز سینتاز ۱ را جزء آن دسته از عوامل مفید و موثر در فرایند تحمل گندم به تنش شوری دانست. چرا که در شرایط این تنش و به خصوص غلظت بالاتر آن افزایش نسبی در میزان بیان این ژن اتفاق می‌افتد.

منابع

1. Blaylock AD. Soil salinity, salt tolerance and growth potential of horticultural and landscape plants. Circular B988, Cooperative Extension Service, University of Wyoming, Laramie, WY, USA, 1994.
2. Colmer T, Flowers T, Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2006; 57: 1-20.
3. Ali Y, Aslam Z, Ashraf MY, Tahir GR. Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield component of rice genotypes grown under saline environment. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2004; 1(3): 221- 225.
4. Enferad A, Poustini K, Majnoon Hosseini N, Khajeh-Ahmad-Attari AA. Physiological responses of rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties to salinity.

اندازه‌گیری نمود (۳۲). افزایش املاح محیط خارج سلولی گیاهان تیمار شده با نمک، باعث کاهش جذب آب در مقایسه با گیاهان کنترل می‌شود، لذا در گروه تیمار شده با شوری، RWC کم‌تر خواهد بود (۳۳). همچنین احتمالاً میزان اشباع فسفولیپیدها با افزایش شوری زیاد شده و در نتیجه سیالیت غشا کاهش یافته و در نهایت نشت آن افزایش می‌یابد (۳۴). در این شرایط وظیفه غشاهای زیستی مختل و محتوای نسبی آب برگ کاهش می‌یابد.

نسبت سدیم به پتاسیم جذب شده توسط برگ‌ها

نسبت سدیم به پتاسیم در گیاه به عنوان یک عامل مهم جهت تعیین میزان تحمل گیاه به شوری، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۵). بر اساس نتایج پژوهش حاضر هر دو غلظت مورد مطالعه شوری، باعث افزایش چشم‌گیر نسبت سدیم به پتاسیم جذب شده توسط برگ‌ها شد. افزایش غلظت یون Na^+ و افزایش نسبت Na^+/K^+ در شرایط تنش شوری در منابع متعددی گزارش شده است (۳۶ و ۳۷). در گندم مشخص شده است که تحمل نسبت به شوری با انتقال مقادیر پایینی از Na^+ به بافت هوایی همراه با حفظ نسبت بالای K^+/Na^+ در ارتباط می‌باشد (۳۴ و ۳۸). به عبارتی در ارقام دارای تحمل شوری میزان تجمع کمتر یون Na^+ و حفظ نسبت پایین Na^+/K^+ در اندام‌های جوان گیاه به عنوان شاخصی جهت بهبود تحمل شوری استفاده می‌شود (۳۳ و ۳۸). با توجه به موارد ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که کم‌تر بودن نسبت جذب سدیم به پتاسیم در گروه تیماری ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی مولار شوری به علت فعال‌تر و نتیجه بخش‌تر بودن مکانیسم‌های مربوط به تحمل گیاه است.

بیان نسبی ژن *Sus1*

بر اساس نتایج این تحقیق، بیان ژن سوکروز سینتاز ۱ در گیاه‌چه‌های گندم تیمار شده با نمک کلرید سدیم نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. همچنین مشخص شد، گروه تیمار شده با نمک ۲۰۰ میلی مولار بیان نسبی بالاتری را نسبت به گروه تیمار شده با نمک ۱۰۰ میلی مولار داشت. همان‌طور که گزارشات قبلی نشان می‌دهد، سرما، خشکی و تنش شوری از جمله تنش‌هایی هستند که منجر به دهیدراسیون و تنش اسمزی می‌شوند که متعاقب آن بیان آنزیم سوکروز سینتاز را تحریک می‌کنند (۳۹). می‌توان از نتایج استنباط نمود، رقم بم که از متحمل‌ترین گندم‌های قابل کشت در ایران نسبت به شوری می‌باشد، در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم، دارای سیستم دفاعی

5. J. Sci. Tech. Agric. Natur. Resour. 2004; 7(4):103- 113.
6. Croser C, Renault S, Franklin J, Zwiazek J. The effect of salinity on the emergence and seedling growth of *Picea mariana*, *Picea glauca*, and *Pinus banksiana*. *Environmental Pollution*. 2001; 115(1): 9–16.
7. Pattanagul W, Thitisaksakul M. Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2008; 46(10): 736-742.
8. Davis L, Sumner M, Stasolla C, Renault S. Salinity-induced changes in the root development of a northern woody species, *Cornus sericea*. *Botany*. 2014; 92(8): 597-606.
9. Cachorro P, Ortiz A, Barcelo AR, Cerda A. Lignin deposition in vascular tissues of *Phaseolus vulgaris* roots in response to salt stress. *Phyton-Ann Rei Bot*. 1993; 33:33-40.
10. Kozłowski TT. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology Monograph*. 1997; 1(1):1-29.
11. Tester M, Davenport R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*. 2003; 91(5): 503-527.
12. Kamaluldeen J, Yunusa I, Zerihun A, Bruhl J, et al. Uptake and distribution of ions reveal contrasting tolerance mechanisms for soil and water salinity in okra (*Abelmoschus esculentus*) and tomato (*Solanum esculentum*). *Agricultural Water Management*. 2014; 146 95–104.
13. Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, et al. Gene expression profile during the initial phase of salt stress in Rice. *The Plant Cell*. 2001; 13(4): 889-905.
14. Kawaura K, Mochida K, Yamazaki Y, Ogihara Y. Genome-wide analysis for identification of salt responsive in common wheat. *Functional Integrated Genomics*. 2008; 8: 277-286.
15. Cushman J, Bohnert H. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*. 2000; 3: 117-124.
16. Fernandez EB, Munoz FJ, Montero M, Etxeberria Ed, et al. Enhancing Sucrose Synthase Activity in Transgenic Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers Results in Increased Levels of Starch, ADPglucose and UDPglucose and Total Yield. *Plant Cell Physiol*. 2009; 50(9): 1651-1662.
17. Jiang Q, Jian H, Chenyang H, Lanfen Wang, et al. The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (TaSus2) active in endosperm development is associated with yield traits. *Funct Integr Genomics*. 2011; 11:49–61.
18. Albrecht G, Mustroph A. Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. *Planta*. 2003; 217(2): 252-260.
19. Fallahi H, Scofield GN, Badger MR, Chow WS, et al. Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *J Exp Bot*. 2008; 59(12): 3283-3295.
20. Klotz KL, Haagenson DM. Wounding, anoxia and cold induce sugar beet sucrose synthase transcriptional changes that are unrelated to protein expression and activity. *J Plant Physiol*. 2008; 165(4): 423-434.
21. Sturm A, Tang GQ. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in plant science*. 1999; 4(10): 401-407.
22. Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, et al. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*. 2005; 5: 3162-3172.
23. Marañá C, Garcla-Olmedo F, Carbonero P. Equivalent locations of sucrose synthase genes in chromosomes 7D of wheat, 7Ag of *Agropyron elongatum*, and 7H of barley. *FEBS Letters*. 1988; 234(2): 417–420.
24. Jiang Q, Jian H, Chenyang H, Lanfen W, et al. The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (TaSus2) active in endosperm development is associated with yield traits. *Funct Integr Genomics*. 2011; 11(1): 49–61.
25. Maraina C, Garcia-Olmedo F, Carbonero P. Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold stock and light. *Gene*. 1990; 88: 167-172.
26. Martinez de Ilarduya O, Vicente-Carbajosa J, Sanchez de la Hoz P, Carbonero P. Sucrose synthase genes in barley. cDNA cloning of the Ss2 type and tissue-specific expression of Ss1 and Ss2. *FEBS Lett*. 1993; 320: 177–181.
27. Dubcovsky J, Loukoianov A, Daolin Fu, Valarik M, et al. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes VRN1 and VRN2. *Plant Molecular Biology*. 2006; 60:469–480.
28. Ritchie SW, Nguyen HT. Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*. 1990; 30: 105-111.

29. EL-enany AE. Effect of NaCl salinity on growth, pigment and mineral element contents, and gas exchange of broad bean and pea plants. *Biologia Plantarum*. 1994; 36(1): 75-81.
30. Zheng Y, Zhenlin W, Xuezhen S, Aijun J, et al. Higher salinity tolerance cultivars of winter wheat relieved senescence at reproductive stage. *Environmental and Experimental Botany*. 2008; 62(2): 129-138.
31. Sairam RK, Veerabhadra Rao K, Srivastava GC. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci*. 2002; 163(5): 1037-1046.
32. Shamsi K, Kobraee S. Biochemical and physiological responses of three wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) to salinity stress. *Annals of Biological Research*. 2013; 4(4): 180-185.
33. Lafitte R. Relationship between leaf relative water content during reproductive stage water deficit and grain formation in rice. *Field Crops Research*. 2002; 76(2-3): 165-174.
34. Munns R, Richard A, James, Andre' La' uchli. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany. Plants and Salinity Special Issue*. 2006; 57(5): 1025-1043.
35. Song JQ, Mei XR, Fujiyama H. Adequate internal water status of NaCl salinized rice shoots enhanced selective calcium and potassium absorption. *Soil Sci. Plant Nutr*. 2006; 52(3): 300-304.
36. Weimberg R. Solute adjustments in leaves of two species of wheat at two different stages of growth in response to salinity. *Physiol. Plant*. 1987; 70: 38-78.
37. Schachtman DP, Munns R. Sodium accumulation in leaves for *Triticum* species that differ in salt tolerance. *Aust. J. Plant Physiol*. 1992; 19(3): 331-340.
38. Wei G, Ji S, Lu Y, Feng J, et al. Isolation and analysis of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. *Nucleic Acids Research*. 2003; 31(10): 2534-2543.
39. Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 2008; 59: 651-658.
40. Fernandes F, Arrabaca MC, Carvalho LMM. Sucrose metabolism in *Lupinus albus* L. under salt stress. *Biol Plant*. 2004; 48(2): 317-319.
41. Zheng Y, Yong Wu, Wayne T Avigne, Karen E Koch. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses, *Plant Physiol*. 1998; 116(4): 1573-1583.

Quantitative Analysis of Sucrose Synthase1 Gene Expression in Wheat Under Salinity Stress

Chobdari AA, M.Sc., Safipour Afshar A, Ph.D.*, Saeid Nematpour F, Ph.D.

1. Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

* Email corresponding author: asafshar4@gmail.com

Received: 16 Feb. 2015

Accepted: 15 Aug. 2015

Abstract

Aim: In this study, the effect of salinity stress on quantitative gene expression of sucrose synthase1, relative water content and the uptake ratio of sodium to potassium in the leaves of wheat were evaluated.

Material and Methods: Wheat seedlings treated with 100 and 200 mM sodium chloride and at times zero, 6, 12, 24 and 36 hours after treatment relative water content, the uptake ratio of sodium to potassium in the leaves and quantitative gene expression of Sus1 by qRT-PCR method were studied.

Results: Results showed a significant decrease in relative water content, increase in the uptake ratio of sodium to potassium by leaves and increase in the relative expression of sucrose synthase1 gene at treated plants compared to control group.

Conclusion: Generally, increase in the expression of sucrose synthase 1 gene could be one of the possible mechanisms in the process of tolerance to salinity stress.

Keywords: Quantitative gene expression, sucrose synthase 1, Real-Time PCR, wheat