

## بررسی بیان ژن کوماریل کوآنزیم آ-۳-هیدروکسیلاز در انشعابات مختلف ریشه برنج در پاسخ به شوری

احمدرضا معصومی<sup>۱</sup>، حسین عسکری<sup>۲\*</sup>، عباس سعیدی<sup>۳</sup>، مسعود سلطانی نجف‌آبادی<sup>۳</sup>

۱. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

۲. دانشیاران گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

۳. دانشیار بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۲/۵)

## Study of Coumaroyl Coenzyme A-3-Hydroxylase Gene Expression in Different Branches of Rice Roots in Response to Salinity

A. R. Masomi<sup>1</sup>, H. Askari<sup>2\*</sup>, A. Saidi<sup>2</sup>, M. Soltani-Najafabadi

1, M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Energy Engineering and New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. 2, Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Energy Engineering and New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. 3, Associate Professor, Department of Oil Seed Crops Research, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.

(Received: 6 Nov. 2013 - Accepted: 24 Feb. 2014)

### Abstract

Soil and water salinity is one of the limiting factors for rice cultivation in the worldwide. Among crops, rice is very sensitive to salinity but the sensitivity is higher at the seedling and heading stages. Study of gene expression patterns besides away of cellular proteins function, could be useful to create of resistance plants to stress such as salinity. In this study, expression of the Coumaroyl coenzyme A -3hydroxylase (C3H) gene and physiological processes was surveyed under salinity stress in *Oryza sativa* cv. IR65192-4B cultivar, by Complete Randomized Design (CRD) in three replicates and qRT-PCR technique. Physiological results showed that, salinity stress reduced root length in 100mM but not significant in 0 and 50 mM NaCl. In addition, reduction of root dry weight was significant under salinity. On the other hand, data analysis of C3H gene expression shown, expression altered in different ages of the rice roots under one level of NaCl, and also, is variable in one age but in different of NaCl concentrations. Weak gene performance in one branch can lead the loss of other branches efficiency. Therefore, this point must be consider to create of salt resistance plant because can play a major role in overall resistance.

**Keywords:** Rice, Salinity Stress, qRT-PCR, Branches of Rice Roots (R, S, B), Coumaroyl coenzymeA -3 - hydroxylase

### چکیده

شوری خاک و آب به‌عنوان یکی از عوامل محدودکننده کشت برنج در دنیا محسوب می‌شوند. این گیاه نسبت به شوری بسیار حساس است، اما حساسیت آن در مرحله گیاهچه‌ای و خوشه‌دهی بیشتر می‌باشد. مطالعه الگوی بیان ژن‌ها به همراه آگاهی از پروتئین‌های کدشونده توسط آن‌ها، می‌تواند در ایجاد گیاهان مقاوم به تنش از جمله شوری نقش مهمی داشته باشد. به همین منظور در این آزمایش تأثیر تنش شوری بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و الگوی بیانی ژن کوماریل کوآنزیم آ-۳-هیدروکسیلاز (C3H) گیاه برنج، بذور رقم (*Oryza sativa* cv. IR65192-4B)، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار، با استفاده از تکنیک qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت وزن‌خشک و طول ریشه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تنش شوری میانگین طول ریشه‌ها را در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کاهش داده است، اما در تیمار ۵۰ میلی‌مولار و شاهد نزدیک به هم بوده و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. از طرفی وزن‌خشک ریشه در شرایط تنش نسبت به شاهد معنی‌دار بودند. همچنین آنالیز داده‌های بیان ژن C3H، نشان داد که بیان این ژن در سنین مختلف ریشه یک گیاه متفاوت و این تفاوت با مقایسه بیان یک سن در تیمارهای مختلف، نیز قابل مشاهده است. به طوری که ضعف کارکرد مولکولی ژن‌های درگیر در یک انشعاب می‌تواند منجر به از بین رفتن ارزش کارکرد مؤثر ژن‌ها در انشعابات دیگر شود. بنابراین به‌منظور ایجاد گیاهان مقاوم به شوری، بایستی این نکته به‌عنوان عاملی تعیین‌کننده در تعیین مقاومت کلی گیاه به تنش شوری در نظر گرفته شود.

**واژه‌های کلیدی:** برنج، تنش شوری، qRT-PCR، انشعابات ریشه، ژن کوماریل کوآنزیم آ-۳-هیدروکسیلاز (C3H)

## مقدمه

برنج منبع اولیه غذایی بیش از نیمی از مردم دنیا است و نقش مهم آن در تغذیه انسان‌ها و پتانسیل بالای آن برای افزایش عملکرد، می‌تواند سهم عمده‌ای در کاهش نگرانی‌های موجود و تضمین امنیت غذایی جهان، در آینده داشته باشد. برنج گیاهی تک‌لپه، دیپلوئید که دارای  $2n=24$  کروموزوم می‌باشد و در مقایسه با سایر غلات ژنوم کوچک‌تر و ژن‌های کمتری دارد (Nourmohammadi, 1997).

شوری خاک یکی از مهمترین تنش‌های غیرزنده محدودکننده تولیدات کشاورزی در بسیاری از نقاط دنیا محسوب می‌شود و حدود ۲۰ درصد از زمین‌هایی که زیر کشت آبی هستند، تحت تأثیر شوری قرار دارند (Munns and Tester, 2008). به‌طور معمول مناسب‌ترین مکانیزم در مقاومت به شوری کنترل جذب مواد سمی از طریق ریشه است. ریشه به‌عنوان اندامی که با خاک در تماس است، اولین سد دفاعی در مقابل شوری و انتقال سایر یون‌هایی می‌باشد که به‌صورت اختصاصی آن‌ها را جذب می‌کند. بنابراین برای جلوگیری از جذب مواد سمی در تنش‌های محیطی، جذب بافت آوندی بایستی با دقت بیشتری انجام شده و از ورود این مواد به دایره مرکزی جلوگیری شود. برای همین منظور، گیاهان رسوب لیگنین و ترکیبات شبه‌لیگنین را در این ناحیه افزایش می‌دهند تا جذب مواد با دقت بیشتری انجام شود (Chen et al., 2011).

یکی از ژن‌های مهم در مسیر سنتز لیگنین، ژن کوماریل کوآنزیم ۳-۳-هیدروکسیلاز بوده که متعلق به خانواده ژنی سیتوکروم مونواکسیژناز P450 می‌باشد و کربن موقعیت سه حلقه فنولی موجود در زیرواحدهای سازنده لیگنین را هیدروکسیله می‌کند (Goujon et al., 2003). در گیاه آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) ژن CYP98A3 آنزیم C3H مربوط به خانواده ژنی P450 را کد می‌کند که فقط یک نسخه از آن در ژنوم گیاه وجود دارد (Schoch et al., 2001). مطالعه انجام‌شده بر روی ریشه برنج نشان داد که بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های C3H و پراکسیداز در مراحل میانی و انتهایی تنش آبی، افزایش یافتند (Yang et al., 2006).

ژنومیکس کارکردی شاخه‌ای از ژنومیکس است که وظایف ژن‌های یک موجود را مورد مطالعه قرار داده و بر روی فرآیندهای پویایی مانند رونویسی، ترجمه و ارتباط بین ژن‌ها و اینکه چگونه مرتبط با فنوتیپ می‌شوند، تمرکز بیشتری داشته و با هم‌پوشانی بخش‌های دیگری مانند ترانسکریپتومیکس،

پروتئومیکس و متابولومیکس بین وظیفه یک ژن و خصوصیات مرتبط با ویژگی‌های زراعی آن مانند محصول، ساختار گیاهی و تحمل شرایط محیطی مختلف ارتباط برقرار می‌کند. این موضوع می‌تواند نقش مهمی در اصلاح ژنتیکی گیاهان برای مقاومت به تنش‌هایی مانند تنش شوری داشته باشد (Pérez-Torres et al., 2009).

برخلاف ژن C3H، تاکنون مطالعات زیادی برای دیگر ژن‌های درگیر در مسیر لیگنین مانند PAL، 4CL و CAD انجام شده و همچنین، ریشه به‌عنوان یک سیستم واحد بدون در نظر گرفتن انشعابات، مورد مطالعه قرار گرفته است. از این رو هدف ما از این مطالعه بررسی بیان ژن C3H تحت تنش شوری در انشعابات مختلف ریشه برنج می‌باشد، زیرا نتیجه این مطالعه به همراه سایر مطالعات مرتبط می‌تواند درک مناسبی از بیان ژن‌های مهم دخیل در سنتز لیگنین در انشعابات مختلف ایجاد نماید که بتوان از آن در ایجاد گیاهان مقاوم به تنش شوری استفاده نمود.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی در سال ۹۰-۹۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. بذر رقم IR65192-4B از مؤسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI) تهیه و به‌مدت پنج روز در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  بر روی کاغذ صافی مرطوب درون پتری‌دیش نگهداری شدند. سپس بذور جوانه‌زده در گلدان‌های حاوی محیط کشت پوشیدا (Yoshida et al., 1976) به‌روش هیدروپونیک در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  کشت شدند. محیط کشت هر هفته تعویض و pH محیط با استفاده از KOH و HCl بین ۵ تا ۵/۵ تنظیم شد. هنگامی که طول ریشه‌های جانبی فاقد انشعاب به حدود ۵ سانتی‌متر برای برجسب‌گذاری رسیده و حالت شکنندگی اولیه خود را نداشتند، تنش شوری NaCl در سه سطح تیماری ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار به‌مدت دو هفته اعمال گردید و نمونه‌های مربوط به آنالیز فیزیولوژیک ۲۰ روز پس از اعمال تیمار برداشت شدند. زیرا برخلاف برگ، رشد ریشه به‌طور قابل توجهی بازیابی می‌شود (Hsiao and Xu, 2000) و همچنین به‌دلیل اینکه برنج یک گیاه حساس به شوری است، تأثیرات تیمار شوری در پایان این مدت کاملاً قابل مشاهده است. نمونه‌های برداشت‌شده برای مدت ۷۲ ساعت به آون  $105^{\circ}\text{C}$  منتقل و نمونه‌های مربوط به آزمایشات مولکولی در ازت مایع فرو برده و در دمای  $80^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند.

RNase inhibitor و ۲۵۰ واحد رونویسی معکوس (شرکت Vivantis) به مخلوط اول اضافه و به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده و مخلوط نهایی برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ قرار گرفت و برای غیرفعال کردن آنزیم رونویسی معکوس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C گذاشته شد. به منظور اطمینان از صحت سنتز cDNA از آغازگرهای ژن خانه دار استفاده شد که تکثیر آن طی واکنش PCR نشان دهنده صحت سنتز آن می‌باشد.

### طراحی آغازگر

آغازگرها براساس توالی‌های CDS مربوط به گیاه *Oryza sativa* ثبت شده در بانک داده‌های NCBI از زیر بخش Nucleotide طراحی شدند. این کار با استفاده از NCBI BLAST انجام و توالی‌های نزدیک به هم بر اساس E.Value و CoverageQuery شناسایی شدند (www.ncbi.nlm.nih.gov). سپس با نرم‌افزار Clustalw (www.EDBI.ir) نواحی حفاظت شده مورد نظر انتخاب و پس از طراحی آغازگر براساس این نقاط، برای اطمینان از اختصاصی بودن تکثیر با استفاده از PRIMER BLAST مورد آزمون قرار گرفته و در نهایت برای سنتز فرستاده شدند.

### اختصاصی بودن واکنش

در طراحی آغازگر شرایط استاندارد واکنش مانند دمای اتصال ( $2 \pm 60^\circ\text{C}$ )، طول قطعه تکثیرشده (۱۵۰bp - ۶۰)، طول آغازگر (۲۵۰-۲۰bp) و محتوای CG (حدود ۵۰٪) در نظر گرفته شدند. پس از سنتز و آزمون آغازگرها در واکنش PCR معمولی و مشاهده اختصاصی بودن تکثیر با استفاده از بارگیری محصولات بر روی ژل آگاروز ۳٪، برای تأیید نهایی از اختصاصی بودن تکثیر قطعه ژنی مورد نظر و عدم تشکیل آغازگر-دایمر، آنالیز نمودارهای ذوب آغازگرها انجام شد.

### انتخاب ژن مرجع برای واکنش qRT-PCR

با بررسی مطالعات انجام شده در زمینه شوری بر روی برنج سه ژن کنترل داخلی فاکتور طولی کننده رونویسی (eEF)، اکتین یک (AC1) و بتا-توبولین ( $\beta$ -tubulin) (Caldana et al., 2007; Kim et al., 2003) انتخاب و بیان آن روی نمونه‌های آزمایش بررسی شدند. پس از مقایسه سیکل آستانه (Ct) انحراف معیار و نمودارهای حاصل از تغییرات بیان در تیمارهای مختلف، ژن خانه دار فاکتور طولی کننده رونویسی (eEF) به عنوان ژن مرجع برای این آزمایش انتخاب شد (جدول ۱).

## برچسب گذاری<sup>۱</sup>

به منظور تعیین سنین مختلف ریشه، ریشه‌هایی را که فاقد انشعابات جانبی بودند، با نخ برچسب گذاری شدند و اولین برچسب گذاری هم‌زمان با تیماردهی بود. به این صورت که در ابتدای هفته پنجم گیاهان قبل از اعمال تیمار، ریشه‌های با مشخصات ذکر شده را با نخ قرمز (R) برچسب گذاری کرده و در پایان روز، تیمار شوری اعمال شد. همچنین در ابتدای هفته ششم برای سن بعد، این کار با نخ مشکی (B) صورت گرفت و در پایان ریشه‌های بذری به عنوان سن سوم (S) در نظر گرفته شدند. در هنگام برچسب گذاری باید دقت شود که ریشه‌هایی انتخاب شوند که دچار شکستگی و زخم نباشند. زیرا این عوامل باعث خطا در اندازه‌گیری بیان ژن‌های سنتز لیگنین می‌شوند.

## استخراج RNA

دو هفته پس از اولین برچسب گذاری نمونه‌ها برداشت و استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-plus (سیناژن-ایران) با اندکی تغییر انجام شد و در نهایت RNAهای استخراج شده، در دمای  $70^\circ\text{C}$ - نگهداری شدند. کیفیت و غلظت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگاروز یک درصد و دستگاه نانودراپ در طول موج A260/A280 و A260/A230 مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت RNA حدود 1500 ng/ $\mu\text{l}$  و نسبت‌های A260/A280 و A260/A230 به ترتیب حدود 1/6 و 1/9 بودند که نشان دهنده پایین بودن آلودگی ژنومی می‌باشد، اما به منظور حذف آلودگی ژنومی احتمالی از آنزیم DNaseI شرکت سیناژن انجام شد. به این صورت که در تهیه محلول اولیه مقدار  $2\mu\text{g}$  از RNA و  $0.8\mu\text{l}$  از آنزیم DNase I ( $1\text{u}/\mu\text{l}$ ) استفاده و به حجم نهایی  $10\mu\text{l}$  رسانده شد.

## واکنش رونویسی معکوس<sup>۲</sup>

یک میکروگرم RNA و  $1/3$  میکرولیتر مخلوط  $100\text{pmol}$  دارای الیگونوکلوئید (dT) با طول ۱۸ نوکلوئید که دارای انتهای A G C (به منظور اتصال بهتر آغازگرها و افزایش کارایی سنتز cDNA) با آب DEPC به حجم ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده و برای باز شدن ساختارهای ثانویه، مخلوط مورد نظر به مدت ۵ دقیقه در دمای  $65^\circ\text{C}$  قرار داده شد. سپس مخلوط دوم که دارای ۴ میکرولیتر بافر  $5\times$ ، ۲ میکرولیتر محلول ۱۰ میلی‌مولار حاوی نوکلوتیدها، ۴۰ واحد آنزیم

1. Labeling
2. Reverse Transcription

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای قطعات ژن‌های مورد نظر (Caldana et al., 2007, Kim et al., 2003)

number	Sequence	5'→3'
1	C3H F	5'-GAGCTGTTGCCGTTTCAGGTCAGG-3'
2	C3H R	5'-CCGAAGTCTCTCCATGCTCAGC-3'
3	eEF F	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'
4	eEF R	5'-GACTTCCTTACACGATTTTCATCGTAA-3'
5	TUbF	TACCGTGCCCTTACTGTTCC
6	TUbR	CGGTGGAATGTCACAGACAC
7	A1F	ATCCTTGATGCTAGCGGTCGA
8	A2R	ATCCAACCGGAGGATAGCATG

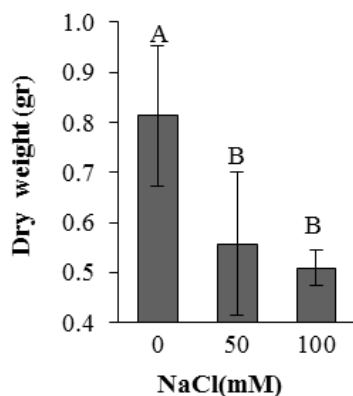
وزن خشک ریشه در دو تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار نسبت به تیمار شاهد کاهش قابل توجهی کرده است، اما در بین دو تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود، به عبارتی وزن خشک ریشه تحت تأثیر تنش شوری کاهش نشان داده است (شکل ۱).

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تیمارهای شوری بر صفات وزن خشک (گرم) و طول (سانتی‌متر) ریشه

Source	Df	Root dry weight (gr)	Root length (cm)
Treatment	2	**0.080	*342.333
Error	4	0.014	2.889

\*\* معنی‌دار در سطح ۵ درصد

\* معنی‌دار در سطح ۱ درصد



شکل ۱- مقایسه تغییرات وزن خشک ریشه بین تیمارهای مختلف

### بررسی وضعیت طول ریشه‌ها

طول ریشه در تیمارهای شوری نظر آماری در سطح ۱ درصد ( $p \leq 0/01$ ) اختلاف معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲). میانگین طول ریشه در تیمار ۱۰۰ میلی مولار کاهش معنی‌دار داشت (شکل ۲)، اما در تیمار ۵۰ میلی مولار و شاهد نزدیک به هم بوده و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲)، همچنین در گزارشی که Munns و همکاران (۲۰۰۸) ارائه

### شرایط واکنش qRT-PCR و آنالیز داده‌ها

این آزمون به صورت غیراختصاصی در دستگاه ترمال سایکلر مدل ABIstep one (Applied Biosystems)، در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر که شامل یک میکرولیتر cDNA، پنج میکرولیتر معرف سایبرگرین (شرکت Bioneer)، ۱/۲ میکرولیتر رنگ ROX، هر کدام از آغازگرها ( $5 \mu\text{M}$ ) ۰/۶ میکرولیتر و ۲/۶ میکرولیتر آب مقطر اتوکلاو شده و چرخه‌های دمایی، که به صورت دمایی واسرشت‌سازی اولیه  $95^\circ\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه و  $45^\circ\text{C}$  چرخه دمایی که شامل واسرشت‌سازی در  $95^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر و تکثیر در  $60^\circ\text{C}$  به مدت ۱۵ ثانیه و در پایان، تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در  $60^\circ\text{C}$  انجام گرفت. پس از ۴۵ سیکل برای آزمون اختصاصی بودن و رسم نمودار ذوب تکثیر شیب دمایی از  $60^\circ\text{C}$  تا  $95^\circ\text{C}$  درجه با سرعت ثابت  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  اعمال شد. برای آنالیز آماری داده‌های حاصل از واکنش qRT-PCR از نرم‌افزار MSTATC در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سطح خطای ۵ درصد ( $p \leq 0/05$ ) و برای محاسبه کارایی واکنش هر جفت آغازگر PCR از نرم‌افزار LinRegPCR استفاده شد. تمامی نمودارهای تکثیر با یک رنگ مرجع زمینه (ROX) نرمال شده و آستانه ۰/۱ برای تعیین  $C_T$  در نظر گرفته و ژن مرجع نیز برای سه تکرار هر نمونه در نظر گرفته شد و میانگین  $C_T$  آن‌ها برای آنالیز بیان نسبی مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز بیان با محاسبه  $C_T$  ژن مورد نظر و ژن مرجع و با استفاده از روش Pfaffl انجام شد (Pfaffl, 2001). سپس اعداد حاصل با استفاده از  $\log_2$  تبدیل شدند.

### نتایج و بحث

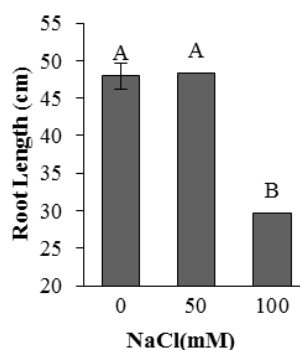
#### بررسی وضعیت وزن خشک ریشه‌ها

نتایج آزمایش نشان می‌دهد که تیمارهای تحت تأثیر شوری، در صفت وزن خشک ریشه، از نظر آماری در سطح ۵ درصد ( $p \leq 0/05$ ) اختلاف معنی‌داری دارند (جدول ۲).

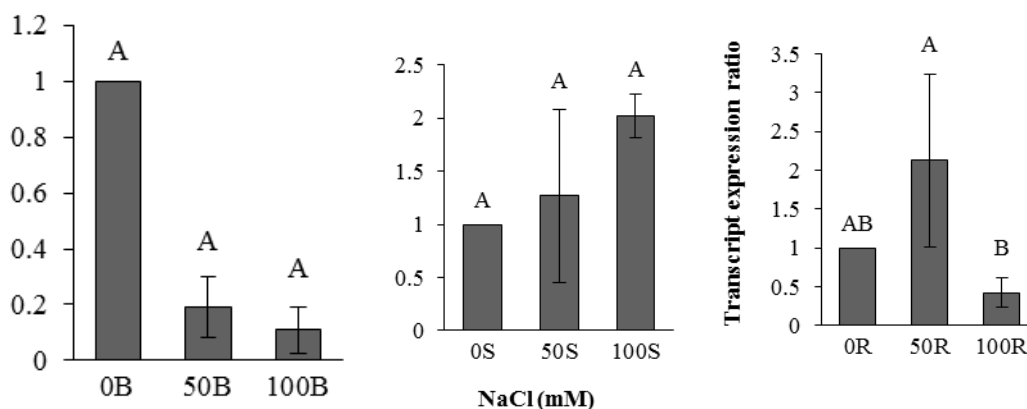
### مطالعه بیان ژن C3H در تیمارهای شوری

در این آزمایش مشاهده شد که در هر کدام از سنین انتخاب شده، بیان ژن C3H تحت تأثیر تنش شوری الگوی بیانی متفاوتی را نشان می‌دهد؛ به طوری که نتایج حاصل از آنالیز داده‌های Real Time\_PCR نشان داد، در سنین S و B افزایش غلظت، تأثیر معنی‌داری در کاهش یا افزایش بیان ژن C3H نداشته است، این در حالی است که رفتار بیانی این ژن در پاسخ به تیمارهای مختلف شوری در سن R متفاوت از دو سن دیگر است و الگوی بیانی مشخصی قابل مشاهده نیست. به طور مثال در غلظت ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، بیان نسبت به تیمار شاهد افزایش پیدا کرد اما در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار بیان آن، کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۳).

کرده‌اند، رشد ریشه نسبت به برگ معمولاً کمتر تحت تأثیر شوری قرار گرفته و طولی شدن آن به طور قابل توجهی پس از مواجه شدن با کلرید سدیم و یا تنش اسمزی به حالت اولیه باز می‌گردد.



شکل ۲- مقایسه تغییرات طول ریشه در بین تیمارهای مختلف

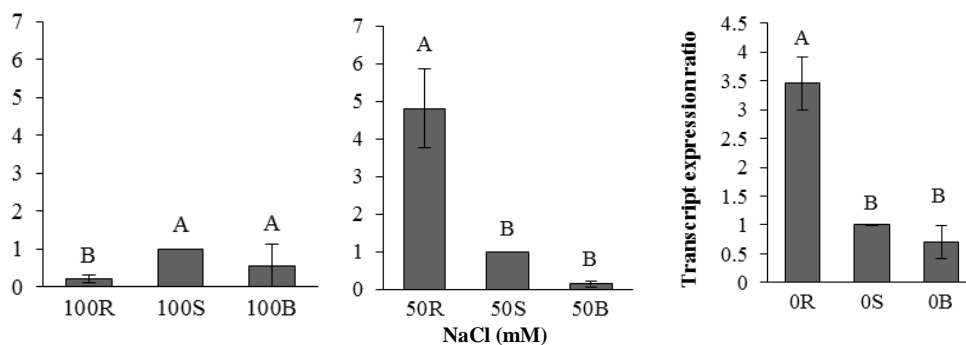


شکل ۳- مقایسه بیان ژن C3H در سه سن B, S, R در سه سطح تیماری ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم

سن ریشه باعث الگوی بیانی متفاوت برای ژن مورد نظر شده است و همچنین با افزایش غلظت شوری بیان ژن C3H کاهش پیدا کرده است که با توجه به نمودارهای زیر قابل مشاهده است (شکل ۴).

### مطالعه بیان ژن C3H در انشعابات مختلف

آنالیز داده‌های بیان انشعابات مختلف ریشه در یک گیاه، که از نظر سنی با هم اختلاف دارند، نشان داد که الگوی بیانی آن‌ها نسبت به هم متفاوت است. به این منظور که اختلاف



شکل ۴- مقایسه بیان ژن C3H در انشعابات مختلف ریشه (سه سن B, S, R) در یک سطح تیمار شوری

همان‌طور که در بررسی‌های فیزیولوژیکی مشاهده شد، تیمار شوری باعث کاهش طول اندام‌هوایی و وزن خشک ریشه شد به‌طور کلی هنگام مواجه‌شدن گیاه برنج با شوری میزان رشد برگ‌ها تغییرات سریع نشان می‌دهد (Yeo *et al.*, 1991) که این تغییرات ناگهانی در ذرت (Cramer and Bowman, 1991; Neumann, 1993) و جو (Passioura and Munns, 2000) نیز گزارش شده است. این امر به دلیل کاهش در تقسیم و رشد طولی سلول بوده که در نهایت منجر به پیدایش کندتر و اندازه نهایی کوچک‌تر برگ می‌شود (Munns and Termaat, 1986). کاهش وزن خشک ریشه در آزمایش‌های مشابه نیز (Hernandez *et al.*, 1995; AliDinar *et al.*, 1999; Chartzoulakis and Klapaki, 2000) و Neves *et al.* (2010) قابل مشاهده است و این در حالی است که در طول ریشه و وزن اندام‌هوایی تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

مقایسه اندام‌های هوایی و ریشه این نتیجه قابل استنباط است که گیاه دارای یک مرزبندی بین اندام‌هوایی و ریشه است به‌طوری‌که برخلاف اندام‌هوایی طول ریشه تغییر پیدا نکرده، ولی وزن آن کاهش یافت. از نظر Munns و همکاران (۲۰۰۸)، برخلاف برگ‌ها، بازسازی رشد ریشه در شرایطی از تورژسانس سلولی اتفاق می‌افتد که هنوز به‌طور کامل به حالت اول نرسیده است. این عمل تغییرات متفاوتی در دیواره سلول‌های ریشه نسبت به برگ نشان می‌دهد اما مکانیزم آن هنوز ناشناخته است (Munns and Tester, 2008).

مطالعه Schoch و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد، ژن کوماریل کوآنزیم A-۳-هیدروکسیلاز در همه بافت‌های گیاهی بیان می‌شود اما بیان آن در ساقه و ریشه بسیار بالاتر است. همچنین در آنالیز ترکیب فنولیکی موتانت ref8 گیاه آراییدوپسیس مربوط به ژن C3H، مشخص شد که مقدار لیگنین در این گیاه ۲۰ تا ۴۰ درصد نسبت به نوع وحشی کاهش یافته است. علاوه بر این کاهش بیان این ژن باعث فروریختن دیواره آوندی و افزایش حساسیت به حمله قارچی شد (Franke *et al.*, 2002).

با مقایسه نتایج حاصل از داده‌های بیان در این آزمایش و نتایج مطالعه‌های انجام‌شده این مفهوم قابل استنباط است که در تیمار صفر و ۵۰ میلی‌مولار بیان این ژن در سن R نسبت به دو سنین دیگر بالاتر است (شکل ۴). شاید بتوان گفت به دلیل اینکه از نظر سنی حد واسط دو سنین دیگر است که در سن S به دلیل مسن‌تر بودن بیان در تیمار شاهد بالا بوده و

تیمار شوری نتوانسته است در این سن افزایش بیان معنی‌داری ایجاد کند و اینکه در سن B به دلیل جوان‌بودن دچار بحران شده و نتوانسته است غلظت‌های شوری را کنترل کرده و به‌همین دلیل کاهش بیان مشاهده می‌شود. همان‌طور که مشاهده شد، الگوی بیانی در هر انشعاب در برخورد با تنش شوری متفاوت از سایرین می‌باشد و با توجه به اینکه انشعابات مختلف از نظر سنی با یکدیگر متفاوت هستند، احتمالاً می‌توان گفت که بیان ژن‌ها وابسته به سن بوده و دینامیک بیان ژن در بافت‌های مختلف تابعی از سن و محل قرارگیری می‌باشد، بنابراین انشعابات مختلف تحت تأثیر زمان و مکان قرار گرفته و در دوره زندگی خود الگوی بیانی متفاوتی را نشان می‌دهند که این الگو می‌تواند بر رفتار کل سیستم ریشه‌ای در پاسخ به شرایط محیطی تأثیر تعیین‌کننده‌ای داشته باشد و باعث حساسیت یا مقاومت آن انشعاب در دوره زمانی مختلف در مواجه با تنش پیش رو شود، که در نهایت می‌تواند در مقاومت کلی گیاه تعیین‌کننده باشد.

نکته دیگری که بایستی در نظر گرفته شود، اهمیت لیگنین در کنترل جذب یون‌ها از جمله یون سدیم توسط گیاه می‌باشد. به‌طور کلی گیاهان عالی مکانیزم‌های متنوعی در جذب و انتقال یون سدیم در شرایط تنش شوری دارند، نوار کاسپارین به‌عنوان سدی در انتقال آپوپلاستیک است که باعث می‌شود یون‌ها در هنگام انتقال، مجبور به عبور از غشای پلاسمایی شوند بنابراین تراکم نوار کاسپارین که شامل سوپرین و لیگنین است، تعیین‌کننده کارایی آن می‌باشد (Chen *et al.*, 2011). بنابراین تجمع لیگنین در آپوپلاست ریشه، همبستگی مناسبی با مقاومت سلولی در برابر شوری دارد و همان‌طور که در این مطالعه مشاهده شد این همبستگی در انشعابات مختلف ریشه به جهت کارکرد مختلف انشعابات با هم متفاوت است به‌طوری‌که ضعف کارکرد مولکولی ژن‌های درگیر در یک انشعاب می‌تواند منجر به از بین رفتن ارزش کارکرد مؤثر ژن‌ها در انشعابات دیگر شود که می‌تواند کنترل جذب یون سدیم و در نهایت مقاومت به تنش شوری را تحت تأثیر قرار دهد، که این موضوع در مطالعات قبلی کمتر مورد توجه قرار گرفته است و بایستی این نکته به‌عنوان عاملی تعیین‌کننده در تعیین مقاومت کلی گیاه به تنش شوری در نظر گرفته شود.

در نهایت پیشنهاد می‌شود که بیوسنتز لیگنین را برای مقاومت به تنش شوری از وضعیت وابسته به سن خارج و در صورت ضرورت برای دوره‌های بازیافت، تولید انشعابات جدید با محتوای لیگنین کم در اصلاح نباتات مدنظر داشته باشیم.

## REFERENCES

- Ali-Dinar HM, Ebert G, Ludders P (1999) Growth, Chlorophyll Content, Photosynthesis and Water Relations in Guava (*Psidium Guajava* L.) Under Salinity and Different Nitrogen Supply. *Gartenbauwissenschaft*. 64: 54-59.
- Caldana C, Scheible WR, Mueller-Roeber B, Ruzicic S (2007) A Quantitative RT-PCR Platform for High-Throughput Expression Profiling of 2500 Rice Transcription Factors. *Plant Methods*. 3(7): 1-9.
- Chartzoulakis K, Klapaki G, (2000). Response of Two Green House Pepper Hybrids to NaCl Salinity During Different Growth Stages. *Sci. Hortic*, 86: 247-260.
- Chen T, Cai X, Wu X, Karahara I, Schreiber L, Lin J (2011) Casparian Strip Development and Its Potential Function in Salt Tolerance. *Plant. Signal. Behav*. 6(10): 1499-1502.
- Cramer GR, Bowman DC (1991) Kinetics of maize leaf elongation 1. Increased yield threshold limits short-term, steadystate elongation rates after exposure to salinity. *J. Exp. Bot*. 42: 1417-1426.
- Franke R, Humphreys JM, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Cusumano JC, Chapple C (2002) The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant. J*. 30:33-45.
- Goujon T, Sibout R, Eudes A, MacKay J, Jouanin L (2003) Genes Involved in the Biosynthesis of Lignin Precursors in Arabidopsis Thaliana. *Plant. Physiol. Bioch*. 41: 677-687.
- Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Rio LA (1995) Salt-Induced Oxidative Stress in Chloroplasts of Pea Plants. *Plant Sci*. 105: 151-167.
- Hsiao TC, Xu LK (2000) Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Bot*. 51: 1595-1616.
- Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ (2003) Normalization of Reverse Transcription Quantitative-PCR with Housekeeping Genes in Rice. *Biotechnol. Lett*. 5: 1869-1872.
- Munns R, Termatt A (1986) Whole Plant Responses to Salinity. *Aust. J. Plant. Physiol*. 13: 143-160.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Plant Biol*. 59: 651-681.
- Neumann PM (1993) Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Plant. Cell. Environ*. 16: 1107-1114.
- Neves GYS, Marchiosi R, Ferrarese MLL, Siqueira-Soares RC, Ferrarese-Filho O (2010) Root Growth Inhibition and Lignification Induced by Salt Stress in Soybean. *J. Agron. Crop Sci*. 196(6): 467-473.
- Nourmohammadi GH, Siadat E, Kashani E (1997) Agriculture. Shahid Chamran University Press, Volume I (cereals), 446 p.
- Passioura JB, Munns R (2000) Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Aust. J. Plant Physiol*. 27: 941-948.
- Pérez-Torres E, Paredes CM, Polanco V, Becerra B, V (2009) Gene Expression analysis: A Way to Study Tolerance to Abiotic Stresses in Crops Species. *Chil. J. Agric. Res*. 69(2): 260-269.
- Pfaffl Michael W (2001) A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic. Acids. Res*. 29(9): 2003-2007.
- Schoch G, Goepfert S, Morant M, Hehn A, Meyer D, Ullmann P, Werck-Reichhart D (2001) CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* Is a 3-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway. *J. Biol. Chem*. 276 (39): 36566-36574.
- Yang L, Wang CC, Guo WD, Li XB, Lu M, Yu CL (2006) Differential Expression of Cell Wall Related Genes in the Elongation Zone of Rice Roots Under Water Deficit. *Russ. J. Plant. Physl*. 53: 390-395.
- Yeo AR, Lee KS, Iazard P, Boursier PJ, Flowers TJ (1991) Short- and long-term

effects of salinity on leaf growth in rice  
(*Oryza sativa* L.) J. Exp. Bot. 42: 881-  
889.  
Yoshida AS, Forno DA, Cock JH, Gomez KA

(1976) Laboratory manual for  
physiological studies of rice, 3<sup>rd</sup> ed.  
International Rice Research Institute, Los  
Baños, Philippines.