



تغییرات بیان ژن متالوتاینین، میزان کلروفیل و برخی صفات زراعی در واکنش به تنش شوری در گندم

نازیلا کمالی^۱، سعید نواب پور^۲، حسن سلطانلو^۳ و مهدی کلاته^۴

۱ و ۳- کارشناس ارشد و دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: s.navabpour@gu.ac.ir)
۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان
تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۰

چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر تنش شوری بر بیان افتراقی ژن متالوتاینین، میزان کلروفیل، شاخص اکسیداسیون سلولی و برخی صفات مورفولوژیکی در گندم، آزمایشی به صورت کرت خردشده- فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در سال ۸۸-۱۳۸۷ در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا گردید. عامل اصلی شامل سه مرحله رشد (پنجه‌زنی، ساقه‌دهی و ظهور سنبله) و عامل فرعی ترکیب چهار سطح شوری (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) و دو رقم گندم کویر (مقاوم) و فلات (حساس) بود. نمونه‌گیری تصادفی از برگ در سه مرحله رشدی صورت گرفت. صفات مورد مطالعه شامل وزن خشک اندام هوایی، سطح برگ، وزن ویژه برگ، سرعت رشد محصول، تعداد دانه، وزن هزار دانه، عملکرد دانه، میزان کلروفیل a و b، شاخص اکسیداسیون سلولی، میزان رادیکال سوپراکسید و میزان بیان نسبی ژن متالوتاینین بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری صفات مبین تأثیر معنی‌دار سطوح شوری بر کلیه صفات به جز وزن ویژه برگ بود. میزان وزن خشک اندام هوایی و ثبات کلروفیل همبستگی منطقی خوبی را در ارتباط با تحمل به شوری در رقم کویر نشان دادند. به طور کلی، افزایش تنش شوری موجب فزونی سطح شاخص اکسیداسیون TBARM گردید. این مسئله در مورد میزان رادیکال سوپراکسید به‌ویژه در مرحله ظهور سنبله صادق بود. بیان ژن متالوتاینین همبستگی بالایی با فراوانی رادیکال مزبور، به طور اخص در مرحله ظهور سنبله، نشان داد. این امر با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی ژن مزبور قابل انتظار بود و مؤید تحریک‌پذیری آغازگر ژن مزبور توسط رادیکال سوپر اکسید می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گندم، بیان ژن، متالوتاینین، تنش شوری، رادیکال سوپراکسید

مقدمه

گندم، به‌عنوان مهم‌ترین محصول زراعی در سطح جهان، حدود ۲۰ درصد از غذای انسان را تأمین می‌نماید. در بین غلات، گندم بیشترین سازگاری را با شرایط نامساعد محیطی داراست (۱۰). از بین تنش‌های غیرزنده، شوری یکی از بزرگ‌ترین محدودکننده‌های تولید محصولات زراعی است (۲۹). شوری بر اغلب فرآیندهای مهم متابولیکی گیاه نظیر فتوسنتز، تنفس، بیان ژن‌ها و بسیاری از چرخه‌های فعال زیستی تأثیر می‌گذارد (۲). واکنش گیاهان به شوری عموماً متفاوت، وابسته به مرحله رشد و در عین حال پیچیده می‌باشد. بر این اساس، تعیین یک معیار ثابت برای انتخاب و معرفی ژنوتیپ‌های برتر برای تحمل به شوری مشکل است (۳). در این ارتباط برخی محققین از بین صفات زراعی صفاتی چون سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی را به‌عنوان شاخص‌های مناسب در تحمل به شوری معرفی کرده‌اند (۸، ۱۱). محققان دیگر ارتباط خصوصیات چون میزان کلروفیل و شاخص سطح اکسیداسیون سلولی را، به‌ترتیب با همبستگی مثبت و

منفی، با تحمل به شوری مطرح نموده‌اند (۱۶، ۲۰). از آنجا که روند تغییر فعل و انفعالات سلولی و واکنش‌های زیستی در گرو الگوی فعالیت ژن‌هاست، نتایج برخی تحقیقات بر ارزیابی افتراقی بیان ژن‌های وابسته در القای تحمل به شوری تأکید دارند (۲۴، ۳۵). ژن متالوتاینین از جمله ژن‌های دفاعی با نقش آنتی‌اکسیدانی است که تحت تأثیر بسیاری از تنش‌های زنده و غیرزنده افزایش بیان نشان داده است (۵، ۲۱، ۲۲). با توجه به اهمیت نقش این ژن، بررسی تغییر رونوشت‌های آن در شرایط تنش‌های محیطی با استفاده از روش اندازه‌گیری بیان ژن در زمان واقعی^۴ در تحقیقات محدودی مورد نظر قرار گرفته است (۳۷، ۳۹). چنین به‌نظر می‌رسد که ترکیبی از روش‌ها و شاخص‌های مورد اشاره بتواند ارزیابی جامع‌تری در تحلیل ساز و کار تحمل و در پی آن معرفی ژنوتیپ‌های متحمل عرضه نماید. تنش شوری تنها بر یک مرحله نمو تأثیر نمی‌گذارد. به‌طور کلی میزان تأثیر مخرب شوری به عواملی چون شدت و مدت تنش، میزان تحمل گیاه، نوع بافت تحت تأثیر قرار گرفته شده و شاید مهم‌تر از

1- *Triticum aestivum* L.

2- Real time PCR

گردید. تیمار شوری نیز به همراه محلول غذایی در طول دوره رشد در گلدان‌ها اعمال گردید. پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشدی مورد نظر (پنجه‌زنی، ساقه‌دهی و ظهور سنبله)، برای اندازه‌گیری صفات، وزن خشک اندام هوایی، سطح برگ تک بوته، وزن ویژه برگ^۴ و سرعت رشد^۵، از هر واحد آزمایشی پنج بوته برداشت گردید.

برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن متالوتائینین در سه مرحله رشد ذکر شده، سه گرم برگ از تیمارهای مختلف برداشت شد و در نیتروزن مایع منجمد و تا مرحله استخراج RNA در دمای ۸۰- نگهداری شد. استخراج RNA از نمونه‌های برگ منجمد با استفاده از کیت Rnx-plus صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 28S و 18S روی ژل نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده بود (۱۹). برای بررسی کمی میزان استخراج، از اسپکتروفتومتر (Uvikon-Kontron) استفاده گردید. مقدار جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد و درصد خلوص RNA استخراج شده محاسبه گردید. نسبت به‌دست آمده برای طول موج ۲۶۰/۲۸۰ در این آزمایش در محدوده ۱/۸ تا ۲ (میکروگرم در میکرولیتر) بود که نشان‌دهنده خلوص قابل قبول RNA بود. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن متالوتائینین از دستگاه IQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبر بیوپارس استفاده شد. این دستگاه قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد و در هر چرخه از فعالیت مقدار محصول واکنش پلیمرز را نشان دهد. به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار GAPDH که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها بود، استفاده شد. در این دستگاه از آغازگر اختصاصی طراحی شده بر اساس انتهای ۳' کلون متالوتائینین استفاده شد. آغازگرهای مزبور بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ با در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR طراحی گردیدند. بر این اساس، توالی پیشرو و پسرو برای ژن متالوتائینین به ترتیب شامل:

5-ACTGCAAGTGCAACCCCTGC-3

5-GCATAGGCGGAGACCGAGCA-3

ارزیابی میزان بیان ژن توسط نرم‌افزار REST و با استفاده از آزمون تصادفی^۱ انجام شد.

برای سنجش میزان فرآیند سطح اکسیداتیو سلول، میزان مالون دی آلدئید (ماده نهایی که در فرآیند اکسیداسیون سلولی دارای ثبات نسبی بالایی است) مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. بدین منظور از روش تغییر یافته هگگ و همکاران (۱۵) استفاده گردید. برای استخراج کلروفیل ۰/۵ گرم از بافت تر برگ با ۱۰

همه، مرحله رشد گیاه بستگی دارد (۳۸). در گندم مراحل ابتدایی رشد و اوایل گرده افشانی از جمله حساس‌ترین دوره‌ها به تنش شوری هستند (۲). البته این مسئله همواره ثابت نبوده و بسته به ژنوتیپ و اثر متقابل ژنوتیپ × محیط (سطوح تنش شوری) می‌تواند متغیر باشد (۲۷).

نتایج مطالعات زیادی نشان داد که تنش شوری همانند اغلب تنش‌های محیطی منجر به افزایش فزاینده عوامل اکسیژن فعال^۱ می‌گردد (۳۶، ۱۹). این عوامل رادیکالی، به‌ویژه در غلظت‌های بالا، دارای ظرفیت اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها هستند (۱۴). در حالی که غلظت‌های متعادل این رادیکال‌ها به القای سازگاری نسبی گیاه در تحمل به تنش کمک می‌نماید. همچنین، عوامل مزبور به‌عنوان مولکول انتقال پیام^۲ در الگوی تنظیم بیان ژن‌های وابسته به تحمل ایفای نقش می‌نمایند (۲۱). تعداد و تنوع این رادیکال‌ها عموماً زیاد است و معمولاً طول عمر بسیار کوتاهی دارند. بر این اساس، استفاده از کیت‌های پر هزینه اندازه‌گیری آنها تنها در موارد خاص توصیه می‌شود (۱۶). تحقیقات زیادی نشان داده است که میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشایی بازتاب خوبی از سطح اکسیداسیون سلولی و شاخص مناسبی برای تعیین میزان و فعالیت رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌باشد (۲۵، ۷، ۳۱). در این راستا، استفاده از سنجش تیوبار بیتوریک^۳ که در آن میزان مالون دی آلدئید، محصول نهایی و نسبتاً پایدار پراکسیداسیون چربی‌ها اندازه‌گیری می‌شود قویاً توصیه شده است (۲۵، ۱۷).

با توجه به موارد فوق الذکر، این پژوهش به‌منظور بررسی الگوی افتراقی بیان ژن متالوتائینین در واکنش به سطوح تنش شوری، و ارزیابی تغییرات هم‌زمان صفات مهم زراعی، میزان کلروفیل و سطح اکسیداسیون سلولی در شرایط تنش شوری تنظیم شده است.

مواد و روش‌ها

آزمایش به‌صورت طرح کرت خرد شده فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در سال ۸۸-۱۳۸۷ در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا گردید. عامل اصلی شامل سه مرحله رشد (پنجه‌زنی، ساقه‌دهی و ظهور سنبله) و عامل فرعی ترکیب فاکتوریل چهار سطح شوری (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) و دو رقم گندم کویر (مقاوم) و فلات (حساس) بود. کشت در ظروف کشت با ابعاد ۳۵×۳۵×۳۰ سانتی‌متر حاوی محیط پرلیت کوکوپیت به نسبت ۲ به ۱ انجام گرفت و مواد غذایی مورد نیاز گیاه توسط محلول هوگلند تأمین

1- Active Oxygen Species (AOS)

3- Measurement of Thiobarbituric Acid Reactive Material (TBARM)

5- Crop Growth Rate (CGR)

2- Signaling Molecules

4- Special Leaf Weight (SLW)

6- Randomization test

۱۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ گردید. میزان جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (Uvikon-Kontron) خوانده شد. با استفاده از منحنی نرمال استاندارد، مقدار یون سوپر اکسید برحسب واحد تنظیم گردید.

داده‌های مورد اندازه‌گیری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی آماری صفات مورد بررسی

تجزیه و تحلیل آماری سه صفت تعداد دانه، وزن هزار دانه و عملکرد دانه با توجه به اینکه فقط در مرحله رسیدگی انجام شد، به صورت فاکتوریل صورت پذیرفت. تفاوت بسیار معنی‌داری بین ارقام (به جز برای صفت تعداد دانه) و سطوح شوری از نظر صفات مزبور مشاهده شد (جدول ۱).

میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر جذب محلول اندازه‌گیری شد و میزان کلروفیل a و b محاسبه گردید.

اندازه‌گیری رادیکال سوپر اکسید

میزان یون سوپر اکسید (O_2^-) با استفاده از روش الاستنر و هیوپل (۹) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد. یک گرم نمونه برگ یخ زده به‌طور یکنواخت کوبیده و مقدار ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۵mM (pH=7.8) به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰g سانتیفریوژ گردید. یک میلی‌لیتر از محلول فوق برداشت شده و به همراه ۰/۹ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۵mM، ۰/۱ میلی‌لیتر هیدرو کلراید هیدروکسیل آمین ۱۰mM در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن، مقدار معادل حجم محلول اتیل‌تر اضافه شد و با دور

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در دو رقم گندم پس از اعمال تنش شوری

منابع تغییر	د. آزادی	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات
	د. آزادی	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات
بلوک	۳	۰/۰۴۹ ^{ns}	۴/۱۰ ^{ns}	۰/۶۳ ^{ns}	۲/۴۵ ^{ns}	۱/۷۱ ^{ns}	۱/۹۳ ^{ns}	۲/۷۳ ^{ns}	۳/۳۶ ^{ns}	۰/۰۰۷ ^{ns}	عملکرد دانه در بوته
مرحله نمو	۲	۳/۱۳۰ ^{**}	۷۰۵۶/۳ ^{**}	۷/۱۳ ^{**}	۴۱/۰۱ ^{**}	۲۳/۸۱ ^{**}	۱۸/۰۱ ^{**}	-	-	-	وزن هزار دانه
خطای I	۶	۰/۰۱۱	۷/۳۳	۶/۱۱	۵/۸۹	۲/۶۱	۲/۰۲	-	-	-	تعداد دانه
رقم	۱	۰/۰۱۳ ^{ns}	۳۰۱۲۰ ^{**}	۳/۰۱ ^{**}	۸/۱۳ ^{**}	۳/۹۸ ^{**}	۲/۵۱ ^{**}	۲/۲۱ ^{ns}	۳۶/۱ ^{**}	۰/۰۳ ^{**}	کلروفیل b
شوری	۳	۰/۵۱۱ ^{**}	۱۳۳/۰۱ ^{**}	۰/۵۷ ^{**}	۱۹/۹۱ ^{**}	۹۳/۰۱ ^{**}	۷۰/۱۱ ^{**}	۱۸۵/۳ ^{**}	۱۲/۶۷ ^{**}	۰/۰۳۸ ^{**}	کلروفیل a
مرحله×رقم	۲	۰/۰۱۰ ^{ns}	۲۷/۸۰ ^{ns}	۰/۶۱ ^{ns}	۴/۰۱ ^{ns}	۸/۱۱ ^{ns}	۵/۸۳ ^{ns}	-	-	-	تعداد دانه
مرحله×شوری	۶	۰/۱۷۰ ^{**}	۱۶۰/۸۰ ^{**}	۰/۱۸ ^{ns}	۶/۹۱ ^{**}	۴۰/۰۱ ^{**}	۲۰/۰۷ ^{**}	-	-	-	وزن هزار دانه
رقم×شوری	۳	۰/۰۲۳ ^{**}	۳۰/۱۰ ^{ns}	۰/۴۳ ^{ns}	۱۱/۷۱ ^{**}	۲۰/۱۸ ^{**}	۱۱/۹۸ ^{**}	۱۱/۹۵ [*]	۰/۱ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	عملکرد دانه در بوته
رقم×شوری×مرحله	۶	۰/۰۰۶ ^{ns}	۱۸/۷۳ ^{ns}	۰/۱۲ ^{ns}	۳/۸۱ ^{ns}	۱۷/۳۱ ^{**}	۱۵/۰۱ ^{**}	-	-	-	وزن هزار دانه
خطای II	۶۳	۰/۰۰۵	۱۷/۷۹	۰/۲۹	۲/۰۱	۱/۰۲	۰/۷۲	۳/۰۲	۳/۶۱	۰/۰۰۶۳	عملکرد دانه در بوته

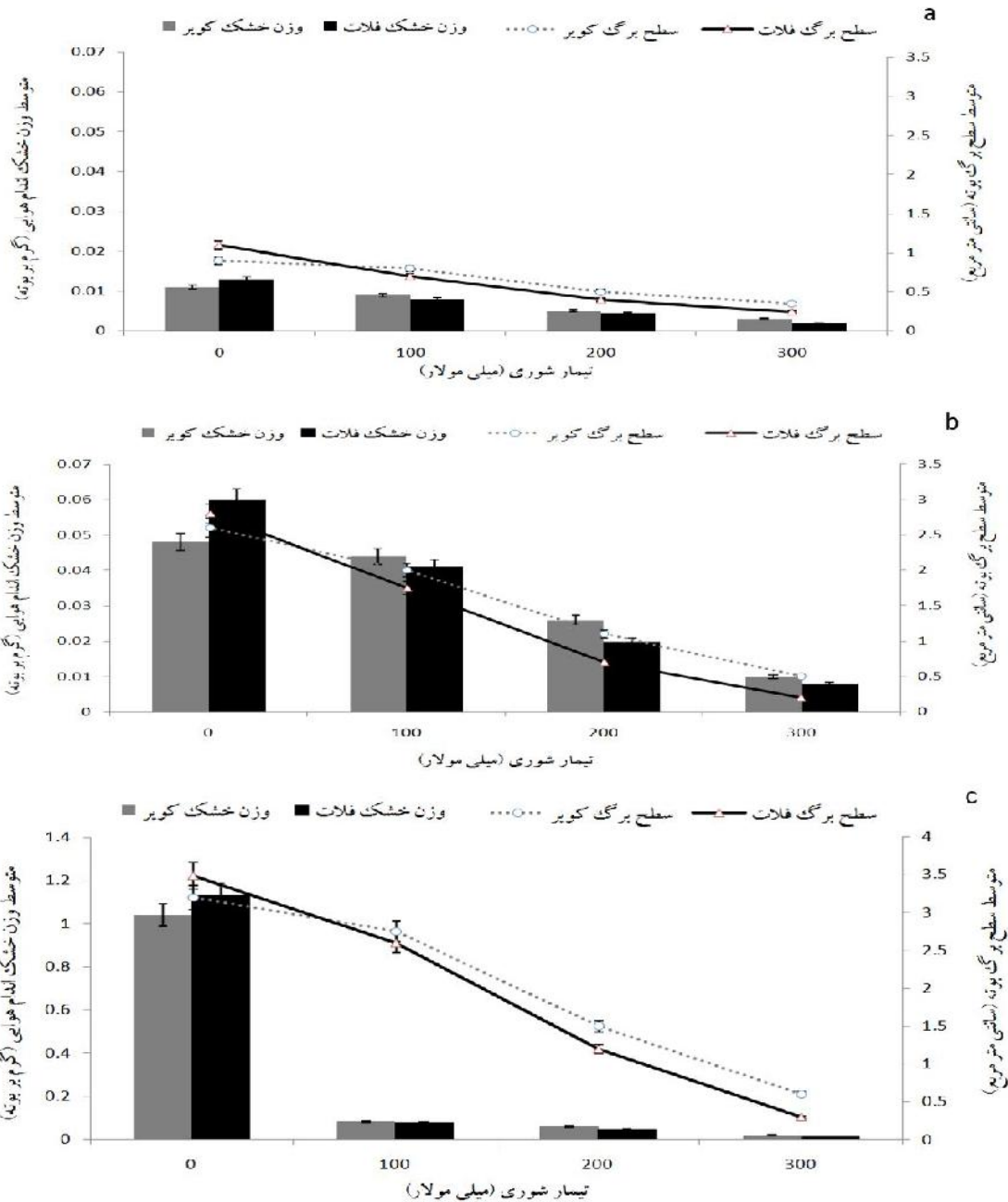
ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد. + در مورد صفات مزبور با توجه به اندازه‌گیری در مرحله رسیدگی تجزیه آماری به صورت فاکتوریل (رقم و شوری) در قالب طرح بلوک انجام شد و درجه آزادی خطای مربوطه برابر ۲۱ است.

در مورد صفات وزن هزار دانه و عملکرد دانه، اثر متقابل رقم × شوری معنی‌دار نگردید. این مسئله به مفهوم استقلال عکس‌العمل ارقام مورد بررسی نسبت به سطوح شوری از نظر صفات مزبور بود. سایر صفات طی مراحل رشد تجزیه و تحلیل شد. تفاوت بسیار معنی‌داری برای صفات مربوطه طی مراحل نمو ملاحظه شد. در مورد کلیه صفات به جز وزن خشک اندام هوایی و تعداد دانه بین ارقام تفاوت معنی‌داری ملاحظه شد. سطوح شوری نیز اختلاف معنی‌داری برای کلیه صفات به جز وزن ویژه برگ را موجب گردید. مقادیر میانگین وزن خشک اندام هوایی و میزان سطح برگ ارقام مورد مطالعه طی مراحل رشد در (شکل ۱) نشان داده شده

است. به‌طورکلی میزان سطح برگ با افزایش تنش شوری کاهش نشان داد. میزان سطح برگ رقم حساس فلات علی‌رغم اینکه در تیمار شاهد نسبت به رقم کویر بالاتر بود، با فزونی تنش شوری با شیب تندتری کاهش یافت. این موضوع که در برخی مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۳۳، ۱۳) به‌عنوان یک ساز و کار گریز از تنش محسوب می‌گردد. در واقع گیاه با کاهش سطح برگ میزان تعرق را تعدیل نموده و در پی آن سطح متابولیت‌های محلول را در جهت افزایش نسبی تحمل به شوری تنظیم می‌نماید. از طرفی تنش شوری موجب شکستگی پیوندهای پروتئینی گردیده و تداوم تنش موجب کاهش رشد و وزن خشک گیاه می‌گردد (۱۳).

مقایسه با رقم فلات کمتر بود. این مسئله در تمام سطوح تنش شوری و در همه مراحل نمو (پنجه‌زنی (شکل ۱-ا) ساقه‌دهی (شکل ۱-ب) ظهور سنبله (شکل ۱-ج)) ملاحظه شد. نکته جالب توجه اینکه میزان وزن خشک اندام هوایی رقم فلات در تیمار شاهد بیشتر از رقم کوبیر بود.

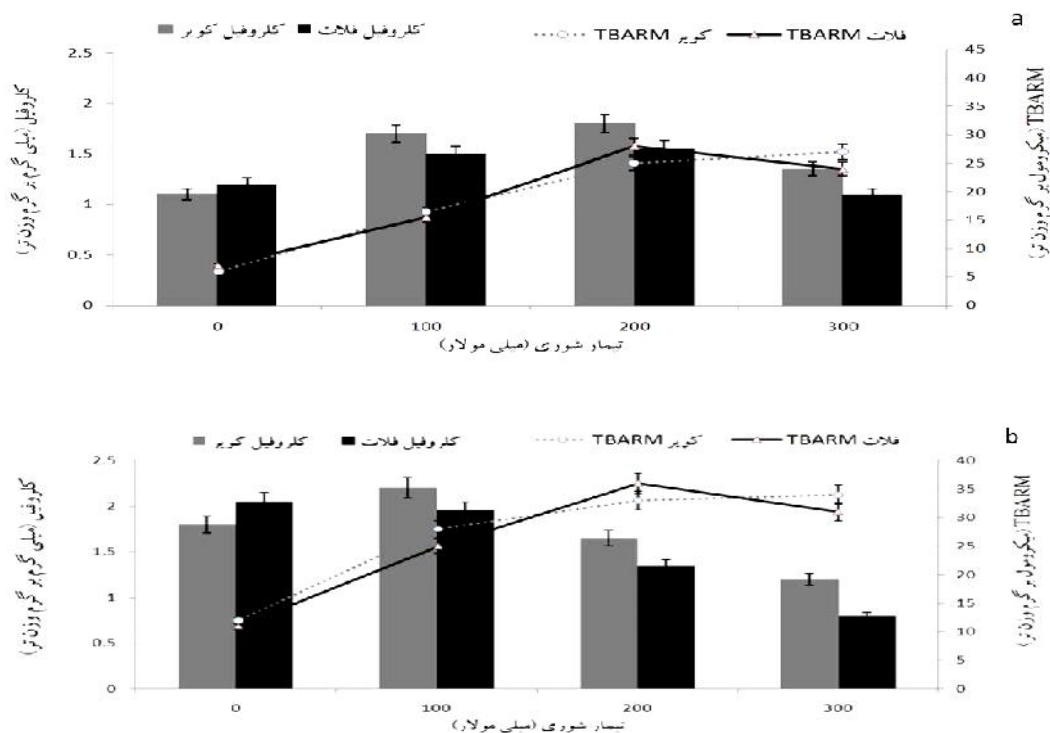
همچنین شوری با تأثیر سوء بر روند جذب یون‌ها و عناصر غذایی سبب افت فعالیت آنزیم‌ها و کاهش ماده‌سازی می‌شود (۲۶). بر این اساس، پایداری وزن خشک به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم در تحمل به شوری معرفی شده است (۳۱). در این تحقیق نیز میزان کاهش وزن خشک اندام هوایی در رقم مقاهم کوبیر در



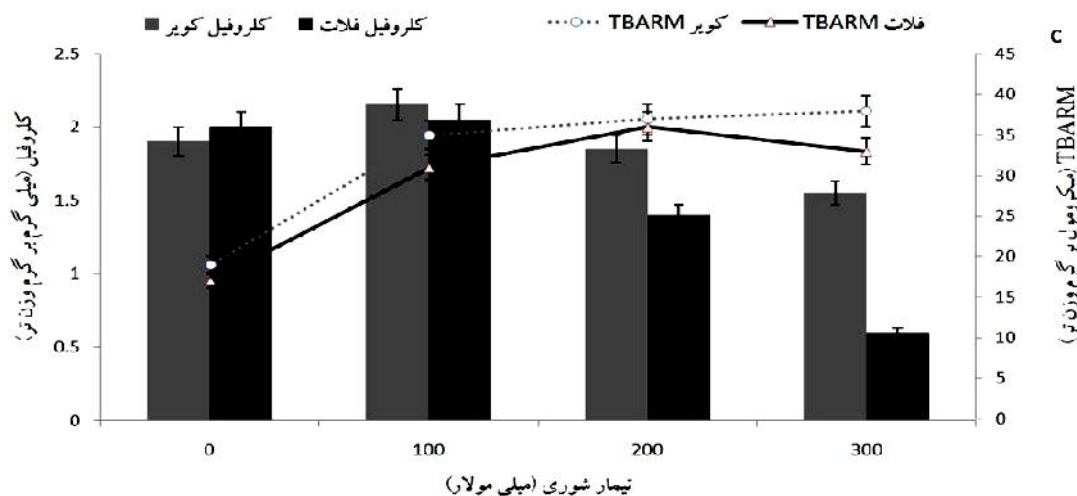
شکل ۱- تغییرات میزان متوسط وزن خشک اندام هوایی و سطح برگ ارقام کوبیر و فلات در شرایط تنش شوری طی مراحل مختلف نمو: a- پنجه‌زنی b- ساقه‌دهی c- ظهور سنبله. مقدار خطای معیار (n=4) به‌منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.

نشان داد. تحقیقات صالحی و همکاران (۲۸) نشان می‌دهد کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش شوری در مراحل پایانی رشد سرعت می‌یابد. این امر به دلیل کاهش بیوسنتز کلروفیل و افزایش فرآیندهای اکسیداسیونی مرحله پیری قابل انتظار است. سطح بالای شاخص اکسیداسیون سلولی (TBARM) در مرحله ظهور سنبله مؤید این موضوع است (شکل ۲-۲). افزایش میزان اکسیداسیون سلولی به عنوان نقطه مشترک اغلب تنش‌های محیطی اعم از زنده و غیرزنده تلقی می‌گردد (۳۶). با توجه به سرعت بالای تبدیل عوامل اکسیژن و اکشن گر و پیچیدگی فعل و انفعالات بیوشیمیایی، استفاده از سنجش تیوباربتوریک دقت عمل قابل قبولی دارد (۲۵،۷). نتایج این مطالعه نیز مبین افزایش سطح شاخص TBARM طی مراحل نمو بود، به گونه‌ای که بیشترین میزان در مرحله ظهور سنبله حاصل گردید. ضمناً با افزایش تنش شوری نیز سطح شاخص مزبور افزایش نشان داد. افت ناگهانی میزان TBARM در رقم حساس فلات در سطح ۳۰۰ میلی‌مولار تنش شوری در هر سه مرحله رشد ملاحظه شد (پنجه‌زنی (شکل ۱-۱) ساقه‌دهی (شکل ۱-۲) ظهور سنبله (شکل ۱-۳)). دلیل احتمالی این مسئله می‌تواند بروز مرگ سلولی ناشی از شدت تخریب در تیمار مزبور باشد (۲۱).

تغییرات کلروفیل و شاخص سطح اکسیداسیونی
میزان کلروفیل در رقم مقاوم کویر در تمام مراحل رشد با افزایش شوری تا سطح ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش نشان داد (شکل ۲). اختلاف میزان کلروفیل در سطوح شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار در مرحله پنجه‌زنی (شکل ۲-۱) غیرمعنی‌دار بود. نتایج مطالعه وانگ و همکاران (۳۶) نیز مؤید این موضوع است. کاهش چشمگیر میزان کلروفیل در تنش ۳۰۰ میلی‌مولار می‌تواند به دلیل تخریب ساختار پروتئینی ناشی از شدت تنش رخ دهد (۲۸). اصولاً واکنش تغییرات میزان کلروفیل در شرایط تنش شوری همواره ثابت نیست. به طوری که ارقام حساس در مواجهه با تنش ضمن کاهش سطح برگ مقدار بیشتری از کلروفیل در واحد سطح برگ را احراز می‌نمایند (۱). بر این اساس، محققین میزان ثبات نسبی کلروفیل را به عنوان شاخص مناسبی از سطح تحمل به شوری معرفی نموده‌اند (۲۰). در این تحقیق رقم مقاوم کویر ثبات بیشتری را در میزان کلروفیل در شرایط تنش شوری نشان داد. شاخص پایداری بالا به مفهوم تأثیر محدودتر تنش بر گیاه می‌باشد که در نتیجه آن، گیاه راندمان بیشتری در استفاده بهینه از کلروفیل نشان می‌دهد (۲۰). میزان کلروفیل رقم حساس فلات به‌ویژه در مرحله ظهور سنبله شیب کاهشی شدیدی را با افزایش سطح شوری



شکل ۲- میزان کلروفیل و سطح اکسیداسیون سلولی (TBARM) ارقام کویر و فلات در شرایط تنش شوری طی مراحل مختلف نمو: a- پنجه‌زنی b- ساقه‌دهی c- ظهور سنبله. مقدار خطای معیار (n=۴) به منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.



ادامه شکل ۲- میزان کلروفیل و سطح اکسیداسیون سلولی (TBARM) ارقام کویر و فلات در شرایط تنش شوری طی مراحل مختلف نمو: a- پنجه‌زنی b- ساقه‌دهی c- ظهور سنبله. مقدار خطای معیار (n=۴) به‌منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.

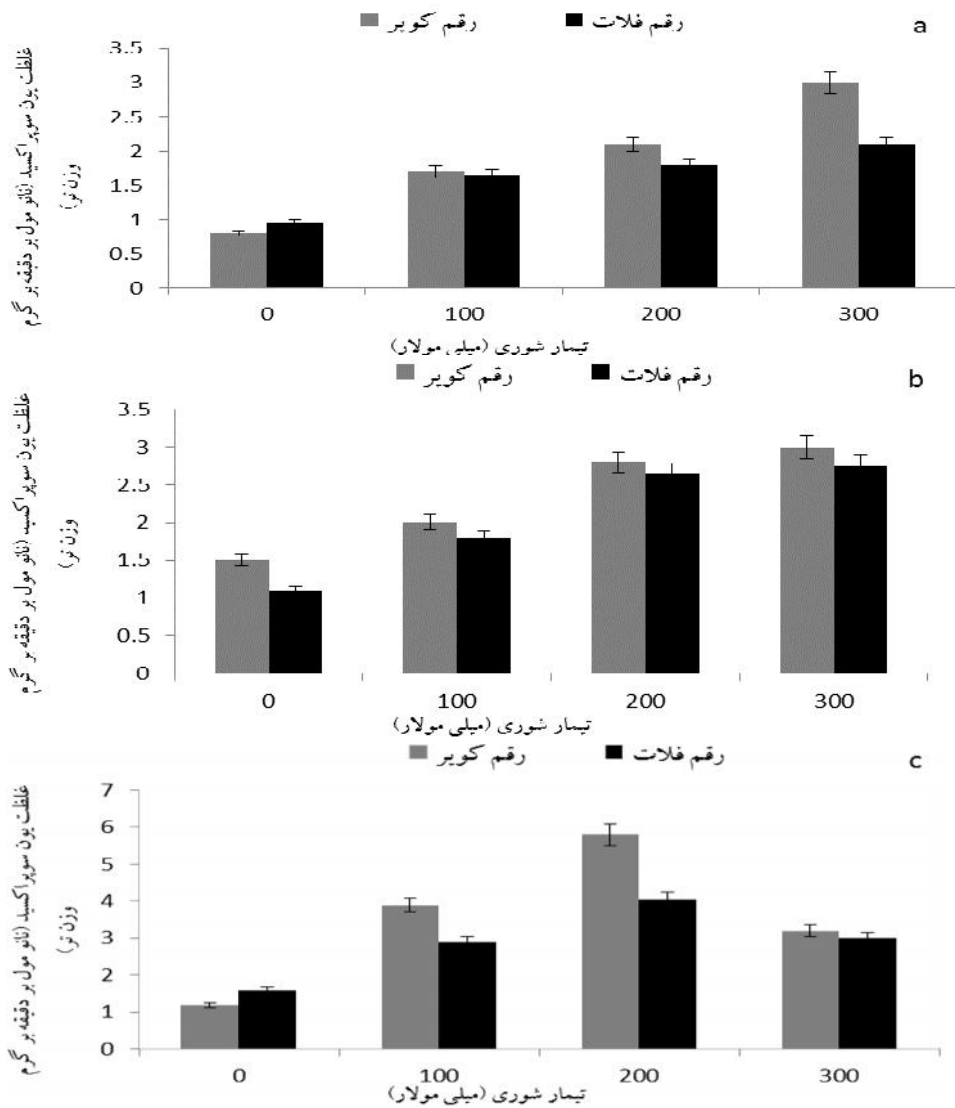
($P < 0.05$) را نسبت به رقم فلات نشان داد (جدول ۱).

نتایج نشان داد که وزن هزار دانه در توجیه برتری عملکرد رقم کویر نقش مهم‌تری را در مقایسه با تعداد دانه ایفا نموده است. همچنین، میزان عملکرد این رقم ثبات نسبی بیشتری را در شرایط تنش شوری داشت (شکل ۴). در این ارتباط سهم نسبی تعداد دانه در مقایسه با وزن هزار دانه بیشتر بود. کافی و همکاران (۱۸) نیز بر اهمیت نقش تنظیمی تعداد دانه در شرایط تنش تأکید نموده‌اند. به‌طور کلی نقش تبدالی و جبرانی اجزای عملکرد به ویژه در شرایط تنش موجب تعدیل خسارت ناشی از شرایط نامساعد محیطی می‌گردد (۳۴). اثر متقابل رقم \times شوری برای صفات وزن هزار دانه و عملکرد دانه غیرمعنی‌دار گردید (جدول ۱).

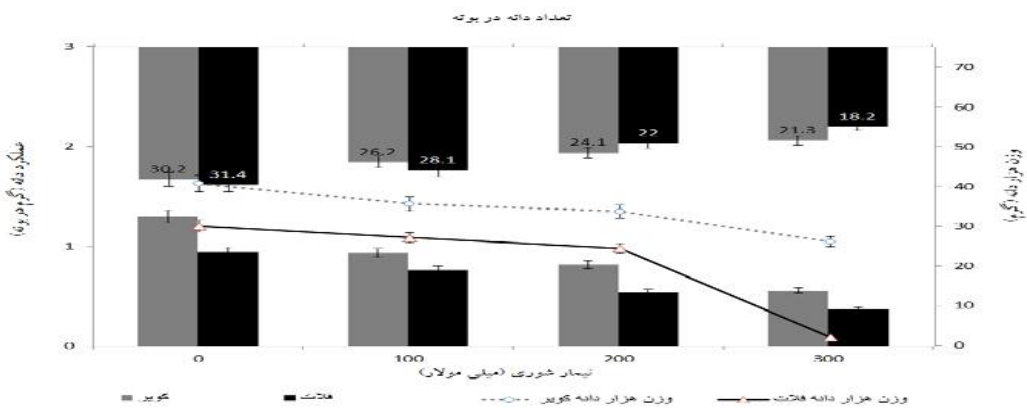
این موضوع مبین یکنواختی عکس‌العمل ارقام در سطوح شوری بود. در حالیکه این اثر متقابل برای تعداد دانه معنی‌دار گردید. توجه به روند تغییرات داده‌ها در شکل ۴ نشان می‌دهد که وجود این اثر متقابل به دلیل تفاوت در شیب تغییرات تعداد دانه ارقام به ازای سطوح شوری بوده است.

تغییرات میزان رادیکال سوپر اکسید

با توجه به اهمیت میزان یون سوپراکسید به‌عنوان یک عامل انتقال پیام در تحریک آغازگر ژن متالوتائینین (۲۱)، تغییرات مقدار آن در شرایط تیمار تنش و طی مراحل رشد اندازه‌گیری و در شکل ۳ نشان داده شده است. در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی با افزایش میزان تنش شوری مقدار یون سوپراکسید در هر دو رقم افزایش نشان داد. در مرحله ظهور سنبله میزان افزایش نسبی رادیکال سوپراکسید تا مرز ۲۰۰ میلی مولار شدت بیشتری نسبت به مراحل رشد پنجه‌زنی و ساقه‌دهی نشان داد. در سطح تنش ۳۰۰ میلی مولار، کاهش نسبی مقدار رادیکال مزبور در هر دو رقم ملاحظه شد. صرف‌نظر از تغییرات جزئی حاصله در تیمارهای مختلف تنش طی مراحل رشد، افزایش سطح رادیکال سوپراکسید به ویژه در مورد رقم مقاوم کویر خصوصاً در مرحله ظهور سنبله القای قابل ملاحظه‌ای را در تحریک آغازگر ژن متالوتائینین ایجاد نمود. این مسئله در برخی مطالعات انجام شده گزارش شده است (۲۱). میزان عملکرد دانه در رقم مقاوم کویر برتری معنی‌داری



شکل ۳- تغییرات میزان یون سولفر اکسید در برگ ارقام کویبر و فلات در شرایط تنش شوری طی مراحل رشدی: a- پنج‌زنی b- ساقه‌دهی c- ظهور سنبله. مقدار خطای معیار (n=۴) به‌منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.

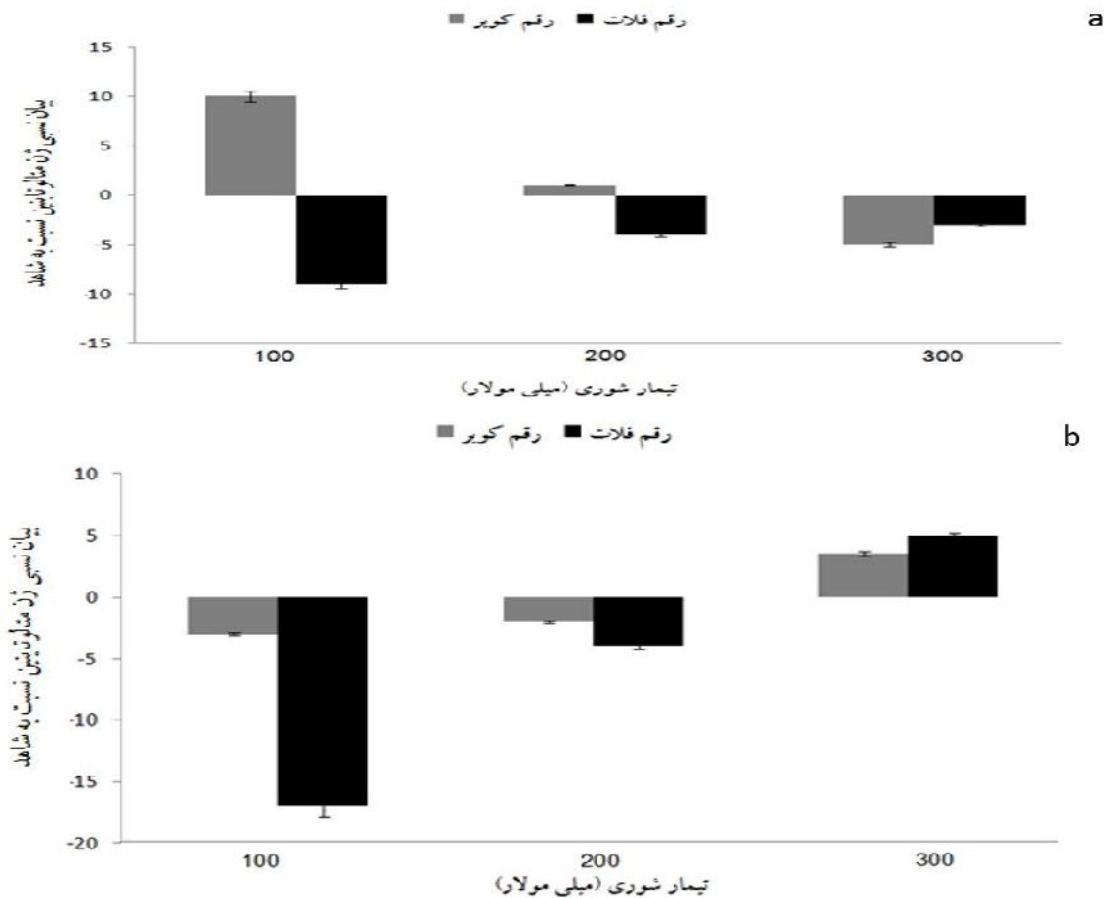


شکل ۴- تغییرات میزان عملکرد دانه، تعداد دانه و وزن هزار دانه در ارقام کویبر و فلات تحت شرایط تیمار خشکی. مقدار خطای معیار (n=۴) به‌منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است. * اعداد روی ستون‌ها تعداد دانه را نشان می‌دهد.

ارزیابی الگوی بیان ژن متالوتاینین

پروتئین رمز شده ژن متالوتاینین واجد وزن مولکولی پائین با محتوای بالای اسید آمینه سیستئین (حدود ۳۰ درصد) است که ظرفیت بالایی برای پیوندهای فلزی را داراست (۳۲). با توجه به گستردگی ایزوژن‌های متالوتاینین، الگوی بیان این ژن در اندام‌های مختلف گیاهی تنوع زیادی دارد (۶). نقش اصلی این ژن در رسم زدایی یون‌های فلزی در سطح سلولی است (۱۲). در عین حال، گزارشاتی از اهمیت این ژن در القای تحمل نسبت به تنش اکسیداتیو ناشی از شرایط تنش‌های محیطی ارائه شده است (۲۱). نتایج این مطالعه نشان داد که رقم کویر عموماً برتری معنی‌داری را در بیان نسبی این ژن در مقایسه با رقم حساس فلات نشان داد (پنجه‌زنی (شکل a-1) ساقه‌دهی (شکل b-1) ظهور سنبله (شکل c-1)). عکس‌العمل بیان این ژن نسبت به سطوح شوری در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی ثبات چندانی نداشت. با توجه به اینکه ژن مزبور از ژن‌های وابسته به مرحله پیری است (۴)، این موضوع چندان غیر قابل انتظار نبود به‌ویژه اینکه بیان این ژن در مرحله

ظهور سنبله افزایش نشان داد (شکل ۵-c). افزایش قابل توجه بیان ژن متالوتاینین در مرحله ظهور سنبله با میزان تجمع رادیکال سوپراکسید (شکل ۳) هم‌خوانی زیادی داشت. نقش این رادیکال در تحریک آغازگر ژن مزبور در برخی مطالعات گزارش شده است (۲۱). بر اساس نتایج تحقیق حاضر چنین به‌نظر می‌رسد بیان این ژن در القای تحمل نسبی به تنش شوری واجد نقش قابل قبولی است. روند بیان نسبی این ژن در رقم مقاوم کویر در مقایسه با رقم حساس فلات در شرایط تیمارهای تنش مؤید این مسئله است (شکل ۵). نتایج مشابهی در افزایش نسبی بیان این ژن تحت تأثیر تیمارهای تنش زا گزارش شده است (۲۳، ۵). شوری از مهم‌ترین محدودکننده‌های تولید محصولات زراعی است که بر اغلب فرآیندهای مهم متابولیکی گیاه در مراحل مختلف رشد تأثیر می‌گذارد. در این مطالعه تأثیر سطوح متفاوت شوری در مراحل مختلف رشد در دو رقم مقاوم و حساس گندم از نظر صفات مختلف زراعی، بیوشیمیایی و مولکولی بررسی گردید.



شکل ۵- تغییرات بیان ژن متالوتاینین در ارقام مورد مطالعه تحت شرایط تنش شوری طی مراحل نمو: a- پنجه‌زنی b- ساقه‌دهی c- ظهور سنبله. مقدار خطای معیار (n=4) به منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.



شکل ۵- تغییرات بیان ژن متالوتاینین در ارقام مورد مطالعه تحت شرایط تنش شوری طی مراحل نمو: a- پنجه‌زنی b- ساقه‌دهی c- ظهور سنبله. مقدار خطای معیار (n=4) به منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.

بیشتری را در میزان کلروفیل تحت شرایط تنش نشان داد. با توجه به این مسئله و بر اساس نتایج سایر تحقیقات ثبات کلروفیل به‌عنوان شاخص پایداری مطرح می‌باشد. بر خلاف کلروفیل، مقدار شاخص اکسیداسیون سلولی (TBARM) با تشدید تنش شوری افزایش نشان داد. در این راستا، اندازه‌گیری میزان یون سوپراکسید به‌عنوان عامل انتقال پیام در تحریک آغازگر ژن دفاعی متالوتاینین نشان داد که مقدار این یون در سطح شوری ۲۰۰ میلی مولار و در مرحله ظهور سنبله بیشترین مقدار بود. این موضوع توجیه خوبی از بیان بیشتر ژن مزبور طی مرحله پرشدن دانه به‌ویژه در رقم متحمل کویر را اثبات می‌نماید.

تفاوت بسیار معنی‌داری بین ارقام (کویر و فلات) و سطوح شوری بر عملکرد و اغلب صفات وابسته مشاهده شد. عدم معنی‌دار بودن اثر متقابل رقم × شوری برای صفات تعداد دانه، وزن دانه و میزان عملکرد مبین استقلال عکس‌العمل ارقام مورد بررسی نسبت به سطوح شوری از نظر صفات مزبور بود. میزان سطح برگ با افزایش تنش شوری کاهش قابل توجهی به‌ویژه در رقم حساس فلات نشان داد. از طرفی تنش شوری سبب کاهش معنی‌داری در میزان وزن خشک گیاه طی مراحل رشد گردید. این امر با توجه به نقش شوری در شکستگی پیوندهای پروتئینی و اختلال در روند جذب و ماده‌سازی دور از انتظار نیست. میزان کلروفیل با افزایش سطح شوری طی مراحل رشد روند کاهشی داشت. با این حال، رقم مقاوم کویر ثبات

منابع

1. Ameer Khan, S.A., A. Habib-ur-Rehman and M. Ashraf. 2006. Interactive effect of foliarly applied ascorbic acid and salt stress on wheat at the seedling stage. *Pakistan of Journal Botany*, 38(5): 1407-1414.
2. Amjad, H., N. Shazia, I. Tahira, S. Hina and M. Ahsanul. 2008. Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Pakistan of Journal Botany*, 40(3): 1043-1051.
3. Ashraf, M. and P.J.C. Haris. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166: 3-16.
4. Buchanan-Wollaston, V. 1994. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiology*, 105: 839-846.
5. Butt, A., K. Mousley, K. Morris, J. Beynon, C. Can, E. Holub, J.T. Greenberg and V. Buchanan-Wollaston. 1998. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal*, 16(2): 209-221.
6. Choi, H.W., Y.J. Kim, S.C. Lee, J.K. Hong and B.K. Hwang. 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology*, 145: 890-904.
7. Dař, J., E. Vandenamele, M. Vranova, M. Van Montagu, D. Inze and F. Van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Molecular Life Science*, 57: 779-795.
8. Din, J., S.U. Khan and I. Ali. 2008. Physiological response of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties as influenced by salinity stress. *Journal Anim. Plant Science*, 18: 125-129.
9. Elstner, E.F. and A. Heupel. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxyl ammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Annual Biochemistry*, 70(2): 616-620.

10. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2005. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/>.
11. Flowers, T.J., P.F. Torke and A.R. Yeo. 1997. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiology*, 28: 89-121.
12. Foley, R.C., Z.M. Liang and K.B. Singh. 1997. Analysis of type 1 metallothionein cDNA in *Vicia faba*. *Plant Molecular Biology*, 33: 583-591.
13. Gharayazi, B. and S.A.M. Mirmohamad Meibody. 2002. Physiological aspect and crop breeding to drought stress. Isfahan University of Technology Press, 274pp. (In Persian)
14. Golden, T., A.D. Hinerfeld and S. Melov. 2002. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell*, 1(2): 117-123.
15. Hagege, D., A. Nouvelot, J. Boucard and T. Gaspar. 1990. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Photochemistry Analytical*, 1: 86-89.
16. Jain, M., G. Mathur, S. Koul and N.B. Sarin. 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Cell Reproduction*, 20: 463-468.
17. Jukanti, A., N. Heidlebaugh, D. Parrott, I. Fischer, K. McInnerney and A. Fischer. 2008. Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *New Phytologist*, 77: 333-349.
18. Kafi, M., A. Jafarnejad and M. Jami Al-Ahmadi. 2005. Wheat Ecology, Physiology and Yield Estimate (Translation). Ferdowsi University of Mashhad Press. 478 pp. (In Persian)
19. Luna, C.M., G.M. Pastori, S. Driscoll, K. Groten, S. Bernard and C.H. Foyer. 2004. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 56: 417-423.
20. Modhan, M.M., S.L. Narayanan and S.M. Ibrahim. 2000. Chlorophyll stability indexes (CSI): its impacts on salt tolerance in rice. *International Rice Res Institute*, 25(2): 38-40.
21. Navabpour S., K. Morris, R. Allen, E. Harrison, S. Mackerness and V. Buchanan-Wollaston. 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Experimental Botany*, 54: 2285-2292.
22. Navabpour, S. and M.B. Bagherieh Najjar. 2008. Molecular and biochemical analysis of oxidative stress and UV-B radiation in *Brassica napus*. *Journal Agriculture Science Natural Resource*, 15(5): 1-10.
23. Navabpour, S., M.B. Bagherieh and R. Haddad. 2011. Comparison of induced gene response to stressful treatment in *spinacia oleracea* and *brassica napus*. *Agricultural Biotechnology*, 10(1): 1-10. (In Persian)
24. Nishiuchi, S.h., S.h. Liu and T. Takano. 2007. Isolation and characterization of a metallothionein-1 protein in *Chloris virgata* swartz that enhances stress tolerances to oxidative, salinity and carbonate stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letter*, 29: 1301-1305.
25. Pitzschke, A., C. Forzani and H. Hirt. 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Antioxidative Redox Signal*, 8: 1757-1764.
26. Rahman, M., U.A. Soomro, M. Zahoor-ur-Haq and S.H. Gul. 2008. Effect of NaCl salinity on wheat cultivars. *Agriculture Sciences*, 4(3): 398-403.
27. Sadeghi, H. and Y. Emam. 2005. Sodium chloride on morphological traits, chemical compound and yield component in tow wheat cultivars. *Desert Journal*, 2(1): 268-278. (In Persian)
28. Salehi, M., M. Nassiri Mahalati and A. Koocheki. 2003. Leaf nitrogen and chlorophyll as indicators drought stress in wheat. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 1(2): 199-205. (In Persian)
29. Sangam, S., D. Jayasree and K. Janardhan. 2005. Salt tolerance in plants-transgenic approaches. *Plant Biotechnology*, 7: 1-15.
30. Scharrenberg, C., J. Falk, S. Quast, K. Haussühl and K. Humbeck. 2003. Isolation of senescence-related cDNAs from flag leaves of field grown barley plants. *Physiologia Plantarum*, 118(2): 278-288.
31. Schatchman, D.P., E.S. Lagudah and R. Munns. 1992. The expression of salt tolerance from *tritium tauschii* in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet*, 84: 714-719.
32. Sestakova, I., P. Mader, H. Vodickova and V. Pacakova. 1999. Voltammetric methods in isolation and identification of plant metallothioneins from alga *Chlorella*. *Birkhauser Verlag Basel/Switzerland, Chemicke Listy Journal*, 1: 111-115.
33. Sohan, D., R. Jasoni and J. Zajicek. 1999. Plant-water relation of NaCl and calcium treated. *Environmental and Experimental Botany*, 42(2): 105-111.
34. Soughi, H., M. Kalateh and S.A. Abroudy. 2006. Stability analysis of grain yield and inter relationships of characters of bread wheat advanced lines in Gorgan. *Pajohesh and Sazandegi*, 70: 56-62. (In Persian)
35. Wang, W.X., B. Vinocur and A. Altman. 2003. A plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14.
36. Xue, T., X. Li, W. Zhu, C.h. Wu, G. Yang and Ch. Zheng. 2008. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *Journal of Experimental Botany*, 60: 339-349.
37. Yadlerloo, L. and A. Majidi hervan. 2008. Evaluation of salt stress on morphological traits in some salt tolerance wheat cultivars. *Iranian Journal of Agronomy Research*, 6(1): 205-215. (In Persian)
38. Yang, J., Y. Wang, G. Liu, C.H. Yang and C.H. Li. 2011. *Tamarix hispida* metallothionein-like ThMT3, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ and NaCl in transgenic yeast. *Molecular Biology Reproduction*, 38: 1567-1574.

Changes in Metallothionein Gene Expression, Chlorophyll Content and Some Agronomic Traits in Response to Salt Stress in Wheat

Nazila Kamali¹, Saeid Navabpour², Hasan Soltanloo³ and Mehdi Kalate⁴

1 and 3- M.Sc. and Associate Professor, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University

2- Associate Professor, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University

(Corresponding author: s.navabpour@gau.ac.ir)

4- M.Sc. of Agricultural Research Center, Gorgan

Received: May 21, 2012

Accepted: February 9, 2014

Abstract

In order to evaluate salinity stress effects on differential expression of metallothionein gene, chlorophyll content, TBARM and some agronomic traits in wheat, the experiment has been carried out using split factorial format based on RCBD design with 4 replications in 2008-09. The main factor included three developmental stages (tillering, stem elongation, heading) and sub factors included factorial arrangement of two wheat cultivars (Kavir and Falat) and 4 salinity levels (0, 100, 200 and 300 mM). The seeds have been sown in pots containing perlite and cocopit (2:1) and were nutritioned with Hogland solution. Leaf samples were taken at three growth stages. The studied traits included shoot dry weight, leaf area, special leaf weight, growth rate, seed number, seed weight, grain yield, chlorophyll a-b, TBARM, superoxide ion content and metallothionein gene expression. Results of statistical analysis showed significant effects of salinity levels on all traits except special leaf weight. Shoot dry weight and chlorophyll stability showed strong correlation in favor of resume salt stress in Kavir cultivar. Generally, increased salinity stress resulted in high TBARM index. It was almost the same for super-oxide radical specially at heading stage. Metallothionein gene expression showed high correlation with the amount of this radical specifically in heading stage. This was expected given the anti-oxidant role of the gene, and confirmed this gene promoter induced by super oxide radical.

Keywords: Wheat, Gene expression, Metallothionein, Salt stress, Super-oxide radical