دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

شناسایی رونوشت‌های با افزایش تظاهر در رقم برنج (*Oryza sativa* L.) مقاوم به تنش شوری با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP

فاطمه زارع[۱]، غلامعلی رنجبر[۲]، علیرضا ترنگ[۳] و حمید نجفی زرینی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: fzfatemehzare@gmail.com)
۲ و ۴- دانشیار و استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، شعبه گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۴ تاریخ پذیرش:۹۵/۶/۱۳

چکیده

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی برای برنج است که به‌طور منفی رشد و باروری آن را متأثر می‌سازد. در این پژوهش اثرات تنش شوری بر بیان افتراقی برخی از ژن‌های مسئول در تنش شوری در دو ژنوتیپ برنج متحمل و حساس به شوری (FL478 و IR29) با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP مورد بررسی قرار گرفت. از میان TDFهای (Transcript Derived Fragments یا قطعات حاصل از رونوشت‌ها) حاصل از ۲ آنزیم برشی و ۱۸ ترکیب آغازگری که در پاسخ به تنش شوری در رقم مقاوم در مقایسه با تیمار شاهد و حساس افزایش بیان نشان داده بودند ۲۸ TDF جدا شد که در نهایت ۲۱ عدد از آن‌ها کلون، توالی‌یابی و در بانک ژن ثبت گردیدند و سپس با استفاده از الگوریتم بلاست مورد آنالیز قرار گرفتند. TDFهای شناسایی شده در این مطالعه متعلق به گروه‌های متفاوتی از ژن‌ها شامل متابولیسم، ترارسانی سیگنال، فاکتورهای رونویسی، سمیت‌زدایی، سیستم ترانسپورت و دیگر مکانیسم‌های مرتبط با تنش شوری بودند که این امر بیانگر آن است که تعداد زیادی از فرآیندها در پاسخ به تنش شوری درگیر هستند. سپس تعدادی از این ژن‌ها برای تأئید الگوهای بیانی به دست آمده توسط cDNA-AFLP با استفاده از آنالیز Real time PCR انتخاب گردیدند که نتایج به دست آمده از این آزمایش الگوهای بیانی ردیابی شده با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP را تأئید نمود. نتایج این تحقیق نشان داد که cDNA-AFLP تکنیک قدرتمندی برای بررسی الگوی بیان ژن‌های برنج تحت تنش شوری می‌باشد. علاوه بر این یافته‌های ما به روشن نمودن اساس مولکولی اثرات تنش شوری بر ژنوم برنج و شناسایی ژن‌هایی که می‌توانند تحمل به شوری برنج را افزایش دهند کمک می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، cDNA-AFLP ، رونوشت، بیان ژن، برنج

مقدمه

شوری خاک فاکتور بسیار مهمی است که تولید گیاهان زراعی را در جهان کاهش می‌دهد. همه‌ی قاره‌ها به جز قطب جنوب با مشکل شوری مواجه بوده و این مشکل سالانه با نرخ ثابتی در حدود ۱۰٪ افزایش می‌یابد (۳۹). شوری منجر به ایجاد تنش اسمزی، آسیب گونه‌های فعال اکسیژن و سمیت یونی می‌گردد و این اثرات در نهایت منجر به ایجاد آسیب‌های سلولی برگشت ناپذیر می‌گردند (۳۶). برنج (*Oryza sativa* L.) از مهم‌ترین غلات و اقلام غذایی جهان است. نیمی از جمعیت جهان، به برنج به‌عنوان یک غذای اصلی وابسته هستند. بیش از ۹۰٪ برنج در آسیا تولید و مورد مصرف واقع می‌شود، جایی که ۶۰٪ مردم جهان در آن زندگی می‌کنند (۲۵). شوری رایج‌ترین تنش غیر زیستی است که بوته‌های برنج با آن مواجه می‌شوند. گزارش شده است که برنج در مراحل اولیه‌ی گیاهچه‌ای به شوری حساس بوده و در مرحله‌ی رشد رویشی متحمل می‌شود و سپس دوباره در فاز رشد زایشی بسیار حساس می‌گردد (۵۵). در ایران علاوه بر اراضی مرغوب در جلگه‌های استان مازندران، گیلان و دشت خوزستان، مناطق نزدیک ساحل دریا، بخشی از اراضی گلستان و نقاطی از استان‌های برنج خیز جنوبی نیز متأثر از شوری و املاح موجود در خاک هستند که این امر سبب کاهش عملکرد برنج در ارقام غیر متحمل می‌گردد که مقدار آن بسته به شرایط جوی متفاوت می‌باشد (۲۲). یکی از اهداف اولیه‌ی بررسی‌های در حال انجام در حوزه‌ی ژنومیک برنج در شرایط تنش درک نقش ژن‌ها و شبکه‌های تنظیمی می‌باشد. علاوه بر این در راستای اصلاح گیاهان متحمل به تنش شوری، درک اساس ژنتیکی و مولکولی پاسخ به تنش از اصول مهم می‌باشد. انتظار بر آن می‌رود که پروفایل بیانی به دست آمده از از تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم در گیاهان در معرض تنش‌های محیطی منجر به شناسایی تنظیم کننده‌های کلیدی تحمل گردد که در نهایت می‌توانند در روش‌های اصلاحی برای بهبود تحمل به تنش مورد استفاده واقع گردند (۴۲). cDNA-AFLP به‌عنوان یک تکنیک ترجیحی به منظور مطالعات افتراقی بیان ژن در گستره‌ی ژنوم می‌باشد (۳). این تکنیک جزء روش‌های قدرتمندی است که به‌طور گسترده برای جداسازی و تعیین خصوصیت ژن‌هایی که به طور متفاوت در پاسخ به تنش‌های محیطی، هورمون‌ها، یا در خلال نمو و ... بیان می‌شوند استفاده شده است (۵۲،۴۶،۱۲،۱). بدان دلیل که تنظیم بیان ژن یک فرآیند دینامیک است، پروفایل بیانی به دست آمده در یک بازه‌ی زمانی با استفاده ازcDNA-AFLP اجازه‌ی مطالعه‌ی رفتار دینامیک بیان ژن و توصیف تغییرات در طول زمان را می‌دهد. بسته به روش استعمال NaCl، اینکه به صورت تدریجی و یا در یک مرحله مورد استفاده قرار گیرد، گیاهان ممکن است به ترتیب تنش شوری و یا شوک شوری را تجربه نمایند. تنش شوری شامل کاربرد تدریجی NaCl، معمولاً ۲۵ یا حداکثر ۵۰ میلی‌مولار، دو بار در روز، تا رسیدن به غلظت نهایی از پیش تعیین شده می‌باشد (۴۳). اعمال تنش شوری به صورت

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

کاربرد تدریجی NaCl نسبت به شوک شوری با یک مرحله استعمال، برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی توصیه شده است، زیرا این امر به صورت تنگاتنگی نحوه‌ی وقوع تنش در طبیعت را منعکس می‌نماید. علاوه بر این قرار گرفتن یکباره در معرض شوری هرگز در شرایط طبیعی رخ نمی‌دهد و بنابراین نتایج به دست آمده از این مطالعات در ارتباط با ژن‌ها یا مواد ژنتیکی مناسب برای استفاده در بهبود تحمل به تنش شوری قابل اعتماد نیستند. متأسفانه برخی از گزارشات تفاوت‌های بین تنش شوری و شوک شوری را تشخیص نداده و حتی از این دو اصطلاح وقتی که پاسخ به شوری را توصیف می‌کنند به صورت جا به جا استفاده می‌کنند (برای مثال ۲۱).

نتایج حاصل از بررسی گیاهان مهندسی شده بیانگر آن هستند که ژن‌های القا شده توسط شوری ارزش بالقوه‌ای برای بهبود مکانیسم‌های سازگاری و بهبود تحمل به تنش دارند (۵۴،۱۴). بنابراین بررسی‌های بیشتر برای شناسایی ژن‌های پاسخ به شوری جدید برای تعیین اینکه هر کدام و یا همه‌ی آن‌ها می‌توانند به عنوان کاندیدهای جدید برای مهندسی تحمل به شوری مورد استفاده واقع شوند، موجه خواهد بود. مطالعه‌ی حاضر با هدف یافتن همبستگی بین بیان ژن‌های خاص با مقاومت به تنش شوری در گیاه برنج با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش دو رقم برنج FL478 (متحمل به شوری) و IR29 (حساس به شوری) در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار به صورت هیدروپونیک (محلول غذایی یوشیدا) در شرایط کنترل شده‌ی اتاقک رشد پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی کشاورزی شمال کشور واقع در رشت کشت داده شدند. ۱۸ روز بعد از جوانه‌زنی بذور تیمار تنش شوری با غلظت ۲۵ میلی‌مولار NaCl اعمال شد و در فاصله‌ی ۳ روز با مراحل افزایشی ۲۵ میلی‌مولار به غلظت نهایی ۱۰۰ میلی‌مولار رسید. تیمار شاهد نیز بدون تنش در ۱ میلی‌مولار NaCl حفظ شد. نمونه مواد گیاهی در بازه‌های زمانی ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از رسیدن به سطح شوری مورد نظر تهیه شدند (۴۳). همچنین به‌منظور ارزیابی اثرات تنش شوری بر بیوماس در زمان‌های مذکور، ریشه و اندام هوایی بوته‌ها پس از بریده شدن در پاکت‌های جداگانه ای قرار داده شدند. سپس پاکت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در درون آون با دمای ۷۰C° گذاشته شدند تا نمونه‌ها خشک شوند. پس از خشک شدن، وزن خشک آن‌ها به وسیله‌ی ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ تعیین شد.

استخراج RNA، mRNA و سنتز cDNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای

RNA موجود در برگ با استفاده از معرف ترایزول مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت اینویتروژن استخراج گردید. بدین منظور ml ۱ معرف ترایزول به ۱۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های پودر شده توسط نیتروژن مایع اضافه شد و پس از ورتکس و سانتریفیوژ فاز رویی جدا شد و به آن کلروفرم افزوده شد. در نهایت پلیت RNA با استفاده از ایزوپروپانول سرد و NaCl رسوب داده شد. جهت تعیین کیفیت RNAهای استخراجی از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد و کمیت آن‌ها نیز با استفاده از نانو دراپ مورد ارزیابی قرار گرفت. mRNA مطابق با دستورالعمل کیت الیگوتکس (Oligotex mRNA Mini Kit, Qiagen.Germany) استخراج گردید. در مرحله‌ی بعد سنتز رشته‌ی اول و دوم cDNA با استفاده از E. coli DNA Ligase, E. coli DNA Polymerase I, E. coli RNase H و T4 DNA Polymerase (موجود در کیت SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis Kit, Invitrogen) صورت گرفت. سپس مخلوط حاصل به‌منظور حذف آنزیم‌ها با استفاده از فنول: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۵: ۲۴: ۱) خالص گردید و با استات سدیم و اتانول رسوب داده شد.

آنالیز cDNA-AFLP و جداسازی TDFها

۵۰۰ نانوگرم از هر یک از نمونه‌های dscDNA با استفاده از ده واحد از آنزیم‌های *EcoR I* و *Mse I* (شرکت Fermentas) مورد هضم قرار گرفتند. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۵C° و ۲ ساعت در دمای ۳۷C° قرار داده شد. قبل از شروع مرحله‌ی اتصال ابتدا سازگارسازها دو رشته ای شده و سپس به مخلوط حاصل از مرحله‌ی هضم آنزیمی افزوده شدند. محصولات مرحله‌ی اتصال پس از رقیق شدن به نسبت ۱:۱۰ با استفاده از آغازگرهای زیر در معرض واکنش مرحله‌ی پیش تکثیر قرار گرفتند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در مرحله‌ی پیش تکثیر که وابسته به توالی سازگارسازها و سازگارسازها نیز وابسته به آنزیم‌های برشی بودند، به شرح ذیل بود (۵۱):

*Eco*RI: 5′ -AGACTGCGTACCAATTC- 3′
*Mse*I: 5′ -GATGAGTCCTGAGTAAC- 3′.

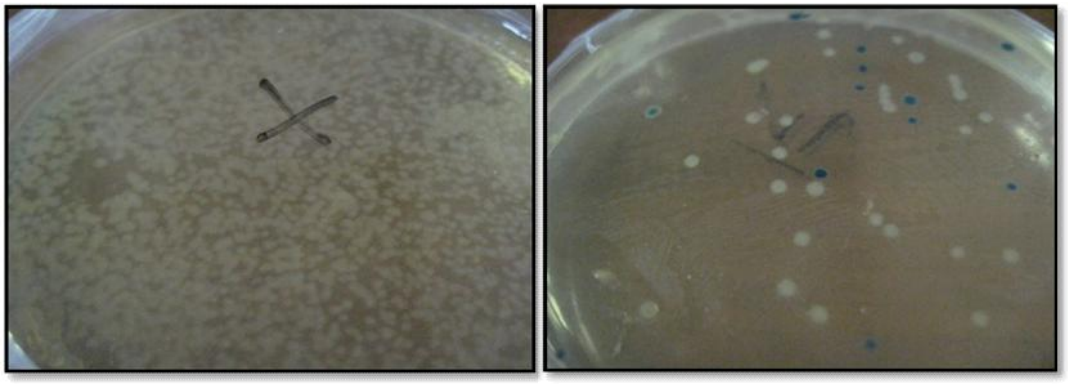
در مرحله‌ی آخر پس از رقیق‌سازی به نسبت ۱:۱۰، محصولات مرحله‌ی پیش تکثیر با استفاده از ۱۸ آغازگر دارای دو باز انتخابی در انتهای ۳′ (*Mse*I / *Eco*RI: GG/AG, CT/GA, AT/CT, CA/TC, GG/AT, GA/AT, GA/TC, TG/TC, AG/TT, GC/CG, CA/AG, TA/AA, AT/AT, CT/TA, GC/CT, AA/CA, GC/AA, GG/TC) مورد تکثیر انتخابی قرار گرفتند. به منظور اطمینان از صحت انجام واکنش، نمونه‌ها ابتدا بر روی ژل آگارز ۲٪ و سپس بر روی ژل آکریلامید ۶٪ الکتروفورز گردیدند. پس از پایان الکتروفورز از رنگ‌آمیزی نیترات نقره جهت مشخص نمودن الگوی باندی استفاده شد. باندهایی که در ژنوتیپ مقاوم در مقایسه با تیمار شاهد و ژنوتیپ حساس در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش شوری حالت افزایش بیان و یا القای بیان نشان دادند (TDFها) (بر مبنای حضور، عدم حضور و شدت باندها)، با استفاده از تیپ استریل و با اضافه نمودن مقداری آب به باند مورد نظر از سطح ژل جدا شدند و با استفاده از آغازگرهای مرحله‌ی تکثیر انتخابی مورد تکثیر مجدد قرار گرفتند. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و پس از تأیید اندازه‌ی باند بر روی ژل، این باندها از ژل جدا شده و جهت تعیین توالی و کسب نتایج بهتر کلون گردیدند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

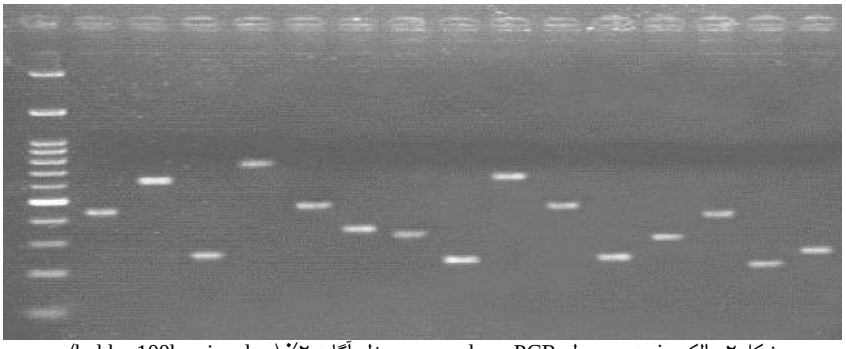
[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

همسانه‌سازی محصولات PCR، توالی یابی و آنالیز بیوانفورماتیک

همسانه‌سازی محصولات PCR در این پژوهش با استفاده از تکنیک TA Cloning و پلاسمید pTZ57R/T شرکت فرمنتاز (InsTAclone PCR cloning kit) صورت پذیرفت (شکل ۱). به‌منظور تأئید تراریختی کلونی‌های ظاهر شده، تک کلونی‌های سفید با یک جفت آغازگر M13، colony PCR شدند (شکل ۲). در کل ۲۱ عدد از ESTهای جدا شده کلون، توالی‌یابی و ثبت گردیدند. به‌منظور کسب اطلاعات بیشتر در ارتباط با عملکرد ESTهای جدا سازی شده میزان تشابه آنها با دیگر توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی با استفاده از الگوریتم Blastx و Blastn در بانک ژن مورد آزمون هم ردیفی قرار گرفت.



شکل ۱- سمت راست: کلونی‌های سفید وکتورهای نوترکیب، سمت چپ: کنترل مثبت
Figure 1. Right side: white colonies recombinant vectors, Left side: positive control



شکل۲- الکتروفورز محصول colony PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ (ladder 100bp sinaclon)
Figure 2. Colony PCR product electrophoresis on 2% agarose gel

آنالیز ژن‌های TDFها با استفاده از Real Time PCR

به‌منظور تأئید اعتبار و تغییرات ردیابی شده به وسیله‌ی آنالیز cDNA-AFLP در این پژوهش، واکنش Real Time PCR برای چهار عدد از TDFهای مورد مطالعه با استفاده از دستگاه BioRad مدل IQ5 انجام شد. برای هر کدام از نقطه‌های زمانی شاهد معادل، گیاهان تیمار نشده، برای استخراج RNA و آنالیز qRT-PCR انتخاب شدند. آغازگرهای مورد استفاده برای هر TDF با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer 3 بر مبنای توالی TDFها طراحی شد. هر واکنش در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۷/۵ میکرولیتر مخلوط پایه‌ی سایبر گرین، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی هر ژن (۱۰ پیکا مول) و ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله‌ی واسرشت سازی اولیه ۱۰ دقیقه ۹۵C°، سپس ۴۰ چرخه شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵C°، ۱ دقیقه در ۶۰C° و ۳۰ ثانیه ۷۲C° انجام شد. پس از اتمام واکنش PCR، برای رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. ژن 18S به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد و تغییرات نسبی در بیان ژن‌های مورد بررسی نسبت به ژن 18S نرمال شدند. میزان بیان قبل از تیمار به‌عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد و محاسبه تغییرات بیان ژن مطابق با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (۲۸) انجام شد. این آزمایش در سه تکرار زیستی و سه تکرار آزمایشگاهی انجام شد و پس از محاسبه‌ی بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه برای هر نمونه انحراف معیار آن‌ها محاسبه و نتایج با استفاده از آزمون t بررسی شدند. لیست آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ آمده است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر Real time PCR

Table 1. Primer sequences used for Real time PCR

نام TDF	توالی آغازگر رفت 5′ ⟶ 3′	توالی آغازگر برگشت 5′ ⟶ 3′
DGEOS8	CAAGTGGCTCAAACCTGGG	AAGCATCTGTCCGTAAGCCC
DGEOS15	GATTGTTGGCACGGGAGGTA	CGGCCATCTCAACTGTCACT
DGEOS22	GCCAGAGAGTCAGCTCAGTG	GATCGTTGCTTCACCATGCC
DGEOS32	TCCTGTCGGCAAACTGTCTC	TCGTGGTATTCCTCTCCGGT
18S rRNA	ATGGTGGTGACGGGTGAC	CAGACACTAAAGCGCCCGGT

نتایج و بحث

پاسخ رشدی گیاهچه‌ها به تنش شوری

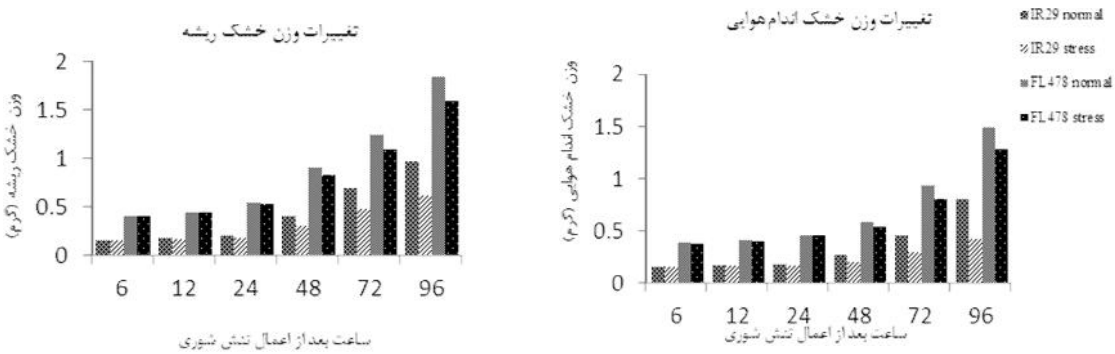
NaCl به‌طور منفی بر رشد گیاهچه‌های برنج تأثیر گذاشت و وزن خشک گیاهچه‌ها با افزایش غلظت NaCl کاهش یافت. مقایسه‌ی وزن خشک ریشه و اندام هوایی در نمونه‌های شاهد و در معرض تنش شوری نشان داد که وزن خشک ریشه و اندام هوایی در نتیجه‌ی تنش شوری در هر دو ژنوتیپ به‌طور معناداری کاهش یافت (شکل ۳- جدول ۲)، با این وجود این کاهش در ژنوتیپ حساس بیشتر بود (شکل ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تنش شوری بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه

Table 2. Variance analysis of salt stress effect on shoot and root dry matter

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه
رقم	۱	۲/۶۲۱**	۴/۲۰۶**
سطح تنش	۱	۰/۱۴۷**	۰/۱۵۵**
زمان نمونه برداری	۵	۰/۹۲۸**	۱/۸۴۱**
رقم×سطح تنش	۱	۰/۰۰۳*	۰/۰۰۴*
رقم×زمان نمونه برداری	۵	۰/۱۱۸**	۰/۲۰۶**
سطح تنش×زمان	۵	۰/۴۸**	۰/۰۳۶**
رقم×سطح تنش×زمان نمونه برداری	۵	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۴**
اشتباه آزمایشی	۴۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

** و *: به ترتیب معنادار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد



شکل ۳- تغییرات وزن خشک ریشه و اندام هوایی در ژنوتیپ متحمل و حساس تحت تنش شوری

Figure 3. Root and shoot dry matter changes in tolerant and sensitive genotypes under salt stress

تعیین عملکرد تعدادی از TDFهای جداسازی شده

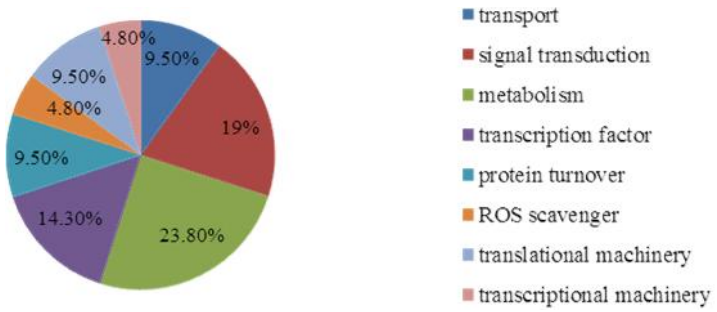
جهت اجرای تکنیک cDNA-AFLP انتخاب ترکیب‌های پرایمری به‌منظور بهینه‌سازی الگوی باندی صورت گرفت. از ۲۰ ترکیب پرایمری مورد استفاده ۱۸ ترکیب باندهای واضحی را ایجاد نمودند که جهت آنالیز ترانسکریپتوم انتخاب شدند. در این تحقیق در پاسخ گیاه برنج به تنش شوری الگوهای بیانی متفاوتی مشاهده گردید که می‌توان آن‌ها را به شش گروه کاملاً مجزا دسته بندی نمود: ۱) TDFهایی که در اثر تنش شوری میزان تظاهرشان افزایش یافت، ۲) TDFهایی که در اثر تنش شوری میزان تظاهر آن‌ها کاهش یافت، ۳) TDF هایی که در اثر اعمال تنش تظاهرشان متوقف شده و خاموش گردیدند، ۴) TDFهایی که در گیاه شاهد خاموش بوده و در اثر اعمال تنش تظاهر یافتند، ۵) TDFهایی که تظاهر آن‌ها هم در شرایط عادی رشد گیاه و هم در شرایط تنش تغییری نکرده و ثابت بوده‌اند، ۶) TDFهایی که بصورت ناپایدار تظاهر پیدا می‌کنند. جهت درک هر چه بهتر مکانیسم‌های احتمالی تحمل تنش در گیاه برنج، TDFهایی که در شرایط تنش شوری در رقم مقاوم در مقایسه با تیمار شاهد و رقم حساس تظاهرشان افزایش یافت، پس از جداسازی برای توالی‌یابی ارسال گردیدند و در ادامه با استفاده از الگوریتم بلاست مورد آنالیز بیوانفورماتیکی قرار گرفتند. در زیر نقش فرآورده‌ی برخی از این ژن‌ها در شرایط تنش شوری مورد بحث واقع شده است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

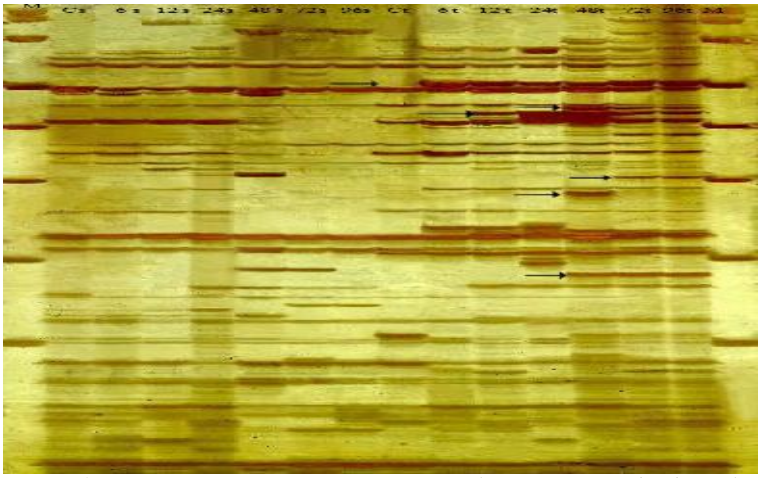
[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

جدول ۳- همولوژی TDFهای به دست آمده با توالی ژن‌های شناخته شده در NCBI با استفاده از الگوریتم Blastx و Blastn
Table 3. homology of the TDF derived with known gene sequences in NCBI used Blastx and Blastn algorithms

نام TDF	اندازه TDF (bp)	پروتئین مرتبط	حداکثر تشابه (٪)	میزان همپوشانی (٪)	ارزش مورد انتظار	Gene bank Accession Number
DGEOS1	264	sucrose transporter	94	88	2e-35	JZ917320
DGEOS6	478	type I inositol polyphosphate 5-phosphatase 4	86	99	8e-76	JZ917325
DGEOS8	511	phosphoethanolamine N-methyltransferase	100	99	6e-117	JZ917327
DGEOS10	324	salt-stress inducible bZIP protein	93	99	6e-45	JZ917329
DGEOS11	280	E3 ubiquitin ligase	97	98	7e-41	JZ917330
DGEOS13	92	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	97	97	3e-09	JZ917332
DGEOS14	160	glutathione S-transferase	91	88	2e-20	JZ917333
DGEOS15	97	Putative mitochondrial RNA helicase	95	64	5e-04	JZ917334
DGEOS18	618	arginine decarboxylase	100	32	7e-19	JZ917337
DGEOS20	84	hypothetical protein OsJ_10195	100	82	1e-05	JZ917339
DGEOS22	111	salt-inducible protein kinase	97	97	5e-15	JZ917341
DGEOS24	198	40S ribosomal protein S6	95	98	4e-23	JZ917343
DGEOS26	333	14-3-3-like protein GF14-B	97	99	4e-68	JZ917345
DGEOS32	75	NADP-dependent malic enzyme, chloroplastic-like	92	96	6e-05	JZ917351
DGEOS35	177	ubiquitin-specific protease 26	88	84	2e-19	JZ917354



شکل ۴- دسته‌بندی کارکردی TDFهای پاسخگو به تنش شوری (Functional classification of TDFs)
Figure 4. Functional classification of responsive TDFs to salt stress



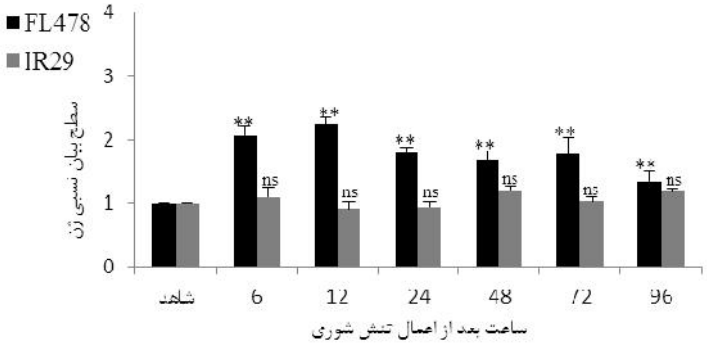
شکل ۵- افزایش تظاهر تعدادی از رونوشت‌های مرتبط با تنش شوری در رقم مقاوم در بازه‌های زمانی مختلف در مقایسه با شاهد و رقم حساس (Cs شاهد حساس، Ct شاهد مقاوم، ۶ تا ۹۶ زمان‌های نمونه برداری M مارکر)
Figure 5. overexpression some of related transcript with salt stress in tolerant cultivar under different times in comparison to check and sensitive cultivar (Cs: sensitive check, Ct: tolerant check, 6-96 sampling times and M: marker)

NADP- مالیک آنزیم

در این مطالعه یک ژن کدکننده‌ی NADP- مالیک آنزیم در رقم متحمل FL478 بعد از ۶ ساعت افزایش بیان قابل ملاحظه‌ای نشان داد و مقدار آن تا ۹۶ ساعت بعد از اعمال تنش شوری همچنان بالا باقی ماند، که این امر با یافته‌های چی و همکاران (۷)، فوشیمی و همکاران (۱۶) که اظهار داشتند همه‌ی ژن‌های NADP-مالیک آنزیم به وسیله‌ی تنش شوری افزایش بیان می‌یابند، مطابقت داشت. نتایج

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

آزمایش Real time PCR نیز نشان داد که تیمار شوری سبب افزایش بیان نسبی این ژن در رقم مقاوم در مقایسه با تیمار شاهد به میزان ۲/۰۵، ۲/۲۴، ۱/۷۹، ۱/۶۷، ۱/۷۶، ۱/۳۴ برابر به ترتیب در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از اعمال تنش گردید و این افزایش بیان در تمام زمان‌ها در مقایسه با شاهد معنادار بود (شکل ۶) و اختلاف معناداری را نسبت به بیشینه‌ی بیان آن در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش نشان ندادند. رقم حساس بیان کم و نسبتاً ثابتی از بیان این ژن را در طول دوره‌ی تنش نشان داد که نسبت به شاهد مربوطه معنادار نبود. همچنین اختلاف بیان این ژن بین گیاهان مقاوم و حساس نیز در تمام زمان‌ها معنادار بود. علاوه بر نقش این آنزیم در فتوسنتز، آن‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی نیز درگیر هستند. نتایج تحقیقات لیو و همکاران (۲۷) نشان داد که میزان بیان ژن کد کننده‌ی NADP– مالیک آنزیم تحت شرایط تنش شوری و اسمتیک در مقایسه با شاهد افزایش می‌یابد. همچنین آن‌ها در مطالعه‌ای دیگر اظهار داشتند که فوق تظاهر ژن NADP– مالیک آنزیم از برنج در آرابیدوپسیس سبب افزایش تحمل به تنش شوری و اسمتیک در آرابیدوپسیس می‌گرددد که این امر گواه قوی‌تری دال بر نقش NADP– مالیک آنزیم در پاسخ به تنش‌های شوری و اسمتیک فراهم می‌آورد.از طرف دیگر تنش شوری و اسمتیک می‌توانند سبب تولید مقادیر زیادی از گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS) و در نتیجه القای تنش اکسیداتیو گردند. ROSها از طریق ترکیبات آنتی اکسیدانت و یا فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی اکسیدانت حذف می‌گردند. مالیک آنزیم‌ها دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو L– مالات را کاتالیز نموده و پیرووات، CO_2 و NAD(P)H را در حضور یک کاتیون دو ظرفیتی تولید می‌نمایند. NADPH قدرت احیای مورد نیاز در راستای حذف ROSها را فراهم می‌نماید (۳۳). برای مثال NADPH می‌تواند به وسیله‌ی گلوتاتیون ردوکتاز وابسته به NADPH برای کاتالیز احیای گلوتاتیون به وسیله‌ی یک سیستم همراه با آسکوربات، در راستای حذف گونه‌های فعال اکسیژن مورد استفاده واقع شود. بنابراین NADP– مالیک آنزیم در متابولیسم به‌منظور حفظ تعادل در میزان ROS ها تحت شرایط تنش شوری نیز درگیر می‌باشد (۳۴). از طرف دیگر یک ویژگی برجسته‌ی سلول‌های گیاهی آن است که قادر به حفظ هموستازی pH سیتوزول که در شرایط بدون تنش در حدود ۷/۵-۷/۲ می‌باشد نیز هستند (۱۵). pH سیتوزولی در پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف از جمله تنش شوری تغییر می‌یابد و به سمت اسیدی شدن پیش می‌رود. دو مکانیسم برای تنظیم pH سیتوزولی پیشنهاد شده است: تنظیم بیوشیمیایی (تولید یا مصرف داخلی پروتون‌ها) و تنظیم بیوفیزیکی. NADP–مالیک آنزیم و فسفو انول پیرووات کربوکسیلاز دو تا از آنزیم‌های کلیدی در تنظیم بیوشیمیایی pH می‌باشند. افزایش در میزان بیان ژن کدکننده‌ی این آنزیم در شرایط تنش شوری می‌تواند pH سیتوزولی را به وسیله‌ی تعادل سنتز و تجزیه‌ی مالات کنترل نماید (۳۱،۱۱).



شکل ۶– سطح بیان ژن NADP– مالیک آنزیم در رقم مقاوم و حساس در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش شوری در مقایسه با شاهد. **و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و غیر معنی‌دار

Figure 6. NADP-Malic enzyme gene expression level in tolerant and sensitive cultivar in different times after salt stress apply in comparison to check. ** and ns significant in 1% probability level and non significant respectively

آرژنین دکربوکسیلاز

داده‌ها در این آزمایش نشان داد که بیان یک ژن کدکننده‌ی آرژنین دکربوکسیلاز ۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش شوری در مقایسه با شاهد و رقم حساس افزایش یافت و مقدار آن تا پایان دوره‌ی تنش بالا باقی ماند. افزایش بیان این ژن بعد از اعمال تنش شوری در رقم مقاوم بیانگر آن است که فعالیت آرژنین دکربوکسیلاز و تجمع رونوشت‌های آن در طی تنش شوری در بوته‌های برنج با میزان تحمل رقم به تنش شوری وابسته می‌باشد. دی آمین پوتریسین و پلی آمین‌هایی نظیر اسپرمیدین و اسپرمین پلی کاتیون‌های موجود در گیاهان عالی هستند. آن‌ها در فرآیندهای سلولی مهم و متعددی مانند تکثیر سلولی، پایداری غشاها، ساختار اسیدهای نوکلئیک، همانند سازی، سنتز پروتئین و اثر متقابل پروتئین–DNA نقش دارند (۴۸). تجمع پلی آمین‌ها در پاسخ به شرایط تنشی متعددی مانند کمبود پتاسیم (۴۵)، تنش اسمتیک (۴۹)، تنش گرما (۱۰) و تنش شوری (۴۱،۲۴) گزارش شده است. گیاهان و برخی از باکتری‌ها پوتریسین که پیش ماده‌ای ضروری برای بیوژنز پلی آمین از دو مسیر است، را هم به صورت مستقیم از آرنیتین به وسیله‌ی آرنیتین دکربوکسیلاز و هم به صورت غیر مستقیم از آرژنین (۴۸) به وسیله‌ی آرژنین دکربوکسیلاز سنتز می‌نمایند. در اغلب موارد افزایش فعالیت آرژنین دکربوکسیلاز دلیل تجمع پلی آمین پوتریسین در نظر گرفته می‌شود. ماناس

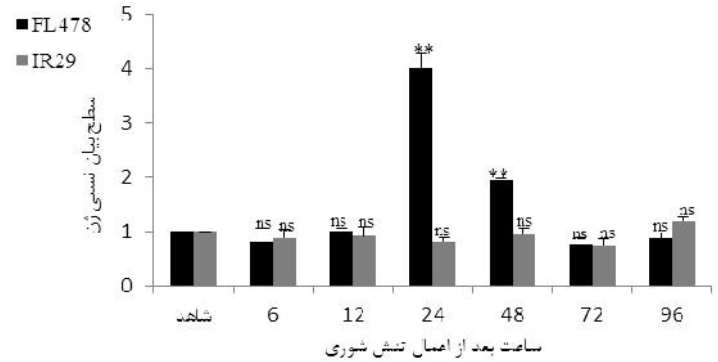
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

و همکاران (۲۹) گزارش کردند که بیان آرژنین دکربوکسیلاز در گیاهچه‌های برنج به وسیله‌ی تنش شوری تحت تأثیر قرار گرفته و افزایش می‌یابد.

ترارسانی سیگنال- پروتئین کیناز فعال شونده توسط تنش شوری

در گروه ترارسانی سیگنال یک TDF کد کننده‌ی پروتئین کیناز القا شونده توسط شوری با دومین کاتالیتیکی MAPK کیناز کیناز شبیه سرین-ترئونین پروتئین کیناز در ژنوتیپ FL478 بعد از ۲۴ ساعت از اعمال تنش شوری بیان گردید و تا ۴۸ ساعت مقدار آن همچنان بالا باقی ماند اما ۷۲ ساعت بعد از تنش نسبت به ۴۸ ساعت روند کاهشی را نشان داد. بررسی الگوی وضعیت بیان این ژن با استفاده از qRT-PCR همبستگی خوبی با پروفایل بیانی به دست آمده با cDNA-AFLP نشان داد، به‌طوری‌که میزان رونوشت این ژن در گیاه متحمل به ترتیب در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش حدود ۴ و ۱/۹ برابر گیاه شاهد مربوط افزایش نشان داد و این افزایش در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین در رقم حساس بیان این ژن تحت تأثیر تنش قرار نگرفت و در ساعات مختلف بعد از تنش اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل ۷). علاوه بر این تفاوت بین ارقام حساس و مقاوم در زمان‌های یاد شده نیز معنی‌دار بود. سیگنالینگ از طریق مسیر MAPK می‌تواند منجر به بروز پاسخ‌های سلولی شامل تقسیم سلولی، تمایز و پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف گردد (۴۴). نتایج این پژوهش نشان داد که تنش شوری باعث فعال شدن این پروتئین کیناز در لاین متحمل گردید، که در نهایت بیان این ژن سبب ترارسانی سیگنال و فعال شدن ژن‌های پاسخگو به تنش خواهد گردید. ناتوانی تنظیم بیان این ژن توسط رقم حساس در شرایط تنش شوری ممکن است حداقل بخشی از حساسیت آن را پوشش دهد. در گونه‌های گیاهی متعددی مانند آرابیدوپسیس نشان داده شده است که آبشار MAPK در سیگنالینگ مسیرهای فعال شده به‌وسیله‌ی تنش‌های غیرزیستی مانند سرما یا شوری فعال است (۴۴). همچنین در یونجه نیز گزارش شده است که یک پروتئین کیناز القا شونده توسط شوری به نام SIMK به وسیله‌ی تنش شوری فعال می‌گردد (۳).



شکل ۷- سطح بیان ژن سرین- ترئونین پروتئین کیناز در رقم مقاوم و حساس در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش شوری در مقایسه با شاهد. * * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و غیر معنی‌دار

Figure 7. serine-threonine gene expression level in tolerant and sensitive cultivar in different times after salt stress apply in comparison to check. ** and ns significant in 1% probability level and non significant respectively

فاکتورهای رونویسی

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که فاکتورهای رونویسی نقش‌های محوری و مهمی در تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به تنش‌های محیطی ایفا می‌نمایند (۶). در این مطالعه بیان TDF DGEOS10 که یک فاکتور رونویسی bZIP (salt-stress inducible bZIP protein) را کد می‌نماید در ژنوتیپ مقاوم بعد از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال تنش شوری القا شد و بیان آن تا انتهای تنش ثابت باقی ماند در حالی‌که باند مربوط به این ژن در طی تنش در رقم حساس مشاهده نگردید. فرآورده‌ی این ژن می‌تواند ژن‌های پائین دست را از طریق اتصال به نواحی پروموتوری آن‌ها فعال نموده و یا از طریق ایجاد اثر متقابل با دیگر فاکتورهای رونویسی سبب تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به تنش گردد. همچنین در این مطالعه یک ژن کدکننده‌ی ریبونوکلئوپروتئین ناهمگن هسته‌ای (hnRNP) نیز در رقم مقاوم بعد از گذشت ۲۴ ساعت افزایش بیان نشان داد که این افزایش بیان تا پایان دوره‌ی تنش ثابت باقی ماند. ریبونوکلئوپروتئین‌های ناهمگن هسته‌ای شامل خانواده‌ی بزرگی از پروتئین‌های متصل شونده به RNA هستند که دارای نقش‌های وسیعی مانند تعمیر DNA، تغییر وضع یا remodeling کروماتین و سیگنالینگ سلولی بوده و تقریباً در تمام چرخه‌ی زندگی mRNA از جمله رونویسی، کلاهک گذاری '۵، پیرایش، پلی آدنیلاسیون و ... نقش دارند. بسیاری از hnRNPها جابجایی بین فضای سیتوپلاسم-هسته را نشان داده و نقش مهمی در صادر کردن و انتقال RNA ایفا می‌نمایند (۲۶،۱۳). علاوه بر این نقش‌های مولکولی به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های تابولیک mRNA، hnRNPهای گیاهی نقش‌های بیولوژیکی خاص گیاهی مانند تنظیم نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی و تحمل نسبت به آن‌ها نیز یفا می‌نمایند (۸). در کل، این مشاهدات بیانگر آن هستند که فاکتورهای رونویسی نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به تنش شوری ایفا می‌نمایند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

ترانسپورتر ساکارز

پروتئین‌های ترانسپورتر قندها بدان دلیل که کربوهیدرات‌ها را در درون سلول‌ها انتقال می‌دهند نقش مهمی در تنش‌های غیر زیستی ایفا می‌کنند. برخی از شواهد و آزمایشات نشان داده‌اند که تنش‌های غیر زیستی بر بیان ترانسپورتر قندها اثر می‌گذارد. اخیراً گزارش شده است که رونوشت ژن‌های *AtSUC2* و *AtSUC4* به وسیله‌ی تیمارهای شوری، اسمتیک، درجه حرارت پائین و ABA در آرابیدوپسیس القا شدند (۱۷). همچنین نتایج مطالعات بیان ترانسپورتر ساکارز *OsSTU2* در طی تیمار خشکی و شوری در برگ‌های برنج نشان داد که رونوشت این ژن به تیمار خشکی و شوری واکنش داده و افزایش بیان یافت (۱۸). با توجه به آن که تجمع قندها با تجمع رونوشت ژن‌های ترانسپورتر قندها و تحمل به تنش شوری به میزان زیادی همبستگی دارد، بنابراین همان‌طورکه در مطالعه‌ی حاضر اتفاق افتاده است دور از انتظار نخواهد بود که در پاسخ به تنش شوری بیان ترانسپورتر ساکارز ۷۲ ساعت بعد از اعمال تنش شوری در رقم مقاوم افزایش یابد و این افزایش تا پایان زمان نمونه برداری ثابت باقی بماند.

سمیت‌زدایی

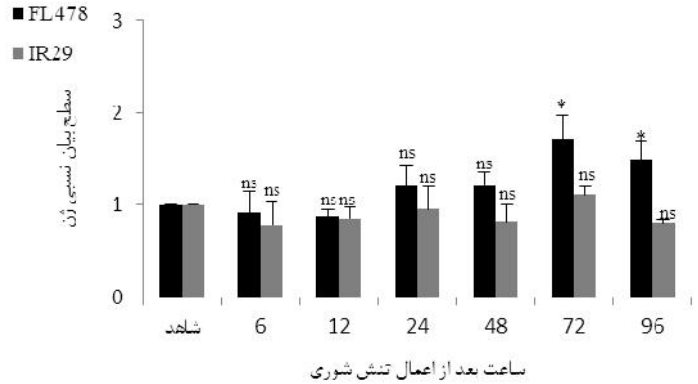
در گروه ژن‌های مرتبط با سمیت‌زدایی TDF با نام DGEOS14 (جدول۳) که کدکننده‌ی ژن گلوتاتیون S–ترانسفراز بود، در ژنوتیپ متحمل افزایش بیان را بعد از ۲۴ ساعت از اعمال تنش شوری در مقایسه با شاهد و رقم حساس نشان داد و در ساعات ۹۶–۴۸ ام بعد از تنش این افزایش بیان ثابت باقی ماند. گلوتاتیون S– ترانسفرازها که به‌عنوان آنزیم‌های سمیت‌زدا معروفند، به وسیله‌ی محرک‌های محیطی مختلفی القا می‌شوند. آن‌ها اتصال ترکیبات الکترون دوست به GSH را کاتالیز نموده و آن‌ها را برای ذخیره در واکوئل‌ها یا آپوپلاست نشان‌دار می‌نمایند (۳۰). با افزایش در میزان گلوتاتیون S– ترانسفراز هموستازی رداکس سلولی حفظ شده و در نتیجه سبب حفاظت ارگانیسم در برابر اثرات نامطلوب تنش اکسیداتیو می‌گردد. مطالعات متعدد نشان داده اند که گلوتاتیون S– ترانسفرازها در تحمل به تنش‌های مختلف مانند تنش آب‌گیری (۴)، سرما (۲)، شوری (۱۹) و غیره درگیر هستند. از آنجا که قرار گرفتن در معرض تنش شوری سبب تغییر در جذب عناصر غذایی، تجمع یون‌های سمی، تنش اسمتیک، افزایش در تولید گونه‌های واکنشی اکسیژن، ایجاد اختلال در وضعیت رداکس سلولی و در نتیجه تنش اکسیداتیو می‌گردد (۵۰)، افزایش بیان این TDFدر ژنوتیپ متحمل می‌تواند به گیاه در سمیت‌زدایی گونه‌های واکنشی اکسیژن و بنابراین حفاظت در برابر آسیب ایجاد شده به وسیله‌ی ROS ها و غلبه بر شرایط نامطلوب کمک نماید. چن و همکاران (۵) گزارش نمودند که افزایش در میزان گلوتاتیون S– ترانسفراز سبب افزایش تحمل به خشکی و شوری در آرابیدوپسیس می‌گردد. همچنین جی و همکاران (۲۰) نیز اظهار داشتند فوق تظاهر ژن گلوتاتیون S– ترانسفراز تحمل به خشکی و شوری را در توتون افزایش می‌دهد.

RNA هلیکازها

RNA دیگر TDF افزایش بیان یافته در رقم مقاوم در نتیجه اعمال تنش شوری، رونوشت مرتبط با یک ژن کد کننده‌ی RNA هلیکاز بود (TDF DGEOS15) که ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از اعمال تنش افزایش نشان داد. تشریح وضعیت الگوی بیان این ژن با استفاده از Real time PCR نیز حاکی از آن بود که تغییر بیان این ژن تا ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش معنی‌دار نبود، اما در ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از اعمال تنش افزایشی معنی‌دار در بیان این ژن در سطح ۵ درصد در مقایسه با شاهد صورت پذیرفت. همچنین ردیابی تغییرات الگوی بیان این ژن در رقم حساس نیز در زمان‌های مختلف بعد از تنش تغییر معنی‌داری را نسبت به شاهد مربوط نشان نداد (شکل ۸) و تفاوت این دو رقم نیز در زمان‌های مذکور معنی‌داری آماری را نشان داد. هلیکازها ساختارهای ثانویه در RNA را باز نموده و در بایوژنز ریبوزوم، پیرایش RNA، انتقال، تغییر و تبدیل، رونویسی، شروع ترجمه، پایداری mRNA و تجزیه‌ی آن درگیر هستند (۹). همه‌ی سلول‌ها دامنه‌ای از شرایط تنشی هم زیستی و هم غیرزیستی را درک می‌نمایند و در چنین شرایطی تمایل به کاهش شایستگی‌های سلولی خود دارند. از آنجا که ارگانیسم‌ها در سکونت گاه‌های زیستی خود مکرراً با تنش‌های غیرزیستی مواجه می‌شوند، فعالیت RNA هلیکازها ممکن است برای سازگاری‌های سلولی به چنین شرایط محیطی تغییر یافته‌ای مورد نیاز باشد. در ارتباط با درگیری RNA هلیکازها در پاسخ‌های سلولی به تنش‌های غیر زیستی پیشنهاد شده است که هلیکازهای تنظیم شونده به وسیله‌ی تنش می‌توانند یک توالی غیر خطی و برگشت‌پذیر از ساختار ثانویه‌ی RNA را کاتالیز نمایند که در بلوغ RNA یا ویرایش آن نقش ایفا می‌نماید و مکانیسمی فراهم می‌نماید که فعالیت هلیکازی آن، RNA های هدف را از طریق تنظیم تعادل واکنش، فعال می‌نماید (۳۸). یافته‌های اخیر نشان دهنده‌ی آن هستند که بیان RNA هلیکازها و یا فعالیت‌ها آن‌ها نه تنها به منظور مشارکت در فرآیندهای housekeeping مانند مواردی که در بالا ذکر گردید، بلکه در پاسخ به تغییرات در متغیرهای محیطی خاصی شامل تغییر در دما، اکسیژن، اسمولاریته، سرما، شوری و.. نیز تنظیم می‌شود. تنظیم محیطی از بیان ژن RNA هلیکازها به احتمال خیلی زیاد از طریق مسیرهای درک و پاسخ به تنش کنترل می‌شود که آن‌ها نیز به نوبه‌ی خود به وسیله‌ی شرایط محیطی مرتبط فعال می‌شوند. بنابراین RNA هلیکازها نقش محوری مثبتی در تنظیم بیان ژن دارا می‌باشند. در آرابیدوپسیس مشخص شده است که بیان دو ژن RNA هلیکاز در پاسخ به تنش سرما، شوری و تنش اسمتیک کاهش یافت (۲۳) که این امر منعکس کننده‌ی اتحاد یا یک‌پارچگی پاسخ سلولی به این متغیرها می‌باشد. همچنین در گیاهچه‌های نخود فرنگی رونوشت یک ژن کدکننده‌ی RNA هلیکاز به نام PDH45 در پاسخ به برخی از تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش شوری، آب‌گیری، جراحت و درجه حرارت پایین القا گردید (۴۰).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

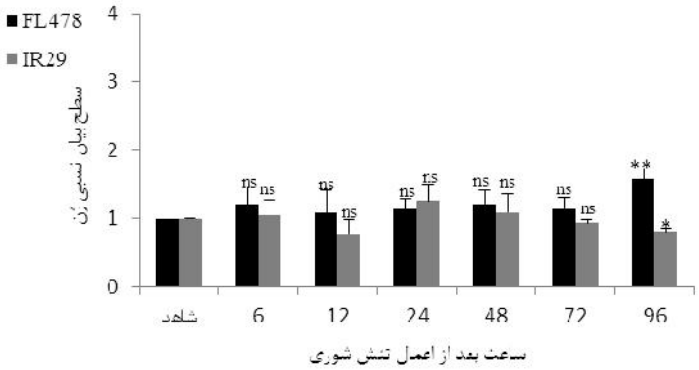


شکل ۸- سطح بیان ژن RNA هلیکاز در رقم مقاوم و حساس در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش شوری در مقایسه با شاهد. * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و غیرمعنی‌دار

Figure 8. RNA helicase gene expression level in tolerant and sensitive cultivar in different times after salt stress apply in comparison to check. * and ns significant in 5% probability level and non significant respectively

فسفو اتانول آمین N – متیل ترانسفراز

در این پژوهش یک ژن کد کننده‌ی آنزیم فسفو اتانول آمین N– متیل ترانسفراز که مرحله‌ای کلیدی در بیوسنتز کلین شامل متیلاسیون فسفو اتانول آمین را کاتالیز می‌نماید در ژنوتیپ مقاوم بعد از گذشت ۹۶ ساعت از اعمال تنش شوری القا گردید. نتایج حاصل از Real time PCR نیز افزایش معنی‌دار ۱/۵۷ برابری برای این TDF را در ۹۶ ساعت بعد از اعمال تنش در رقم مقاوم نشان داد، در حالی‌که در رقم حساس تغییر معنی‌دار آشکاری در بیان این ژن تا ساعت ۷۲ بعد از اعمال تنش مشاهده نشد، اما در نمونه‌های تهیه شده در روز چهارم بیان این ژن در مقایسه با شاهد مربوطه کاهش معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد (شکل ۹). همچنین اختلاف بین گیاهان شاهد و حساس در تمام زمان‌های نمونه برداری معنی‌دار بود. کلین پیش ماده‌ای ضروری برای تولید فسفاتیدیل کلین غشای فسفولیپیدی می‌باشد. برخی گیاهان از کلین برای تولید حفاظت‌کننده‌ی اسمزی گلایسین بتائین استفاده می‌کنند که سبب مقاومت به شوری، خشکی و دیگر تنش‌ها می‌گردد (۳۵). در مطالعات پیشین این مسئله به اثبات رسیده است که فعالیت فسفو اتانول آمین N– متیل ترانسفراز زمانی که فسفاتیدیل کلین و یا کلین به اندازه‌ی کافی در محیط موجود باشد متوقف شده و در پاسخ به تنش شوری و نور القا می‌گردد (۵۳،۴۷). مو و همکاران (۳۵) گزارش نمودند که خاموش نمودن ژن فسفو اتانول آمین N– متیل ترانسفراز منجر به کاهش ۶۴ درصدی در میزان کلین و در نتیجه بروز فوق حساسیت به شوری و گرما در آرابیدوپسیس می‌گردد. همچنین گزارش شده است در گیاهان توتونی که در آن‌ها آنزیم فسفو اتانول آمین N – متیل ترانسفراز فوق تظاهر یافته بود ۵۰ برابر کلین بیشتری تولید گردید (۳۲).



شکل ۹- سطح بیان ژن فسفو اتانول آمین N – متیل ترانسفراز در رقم مقاوم و حساس در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش شوری در مقایسه با شاهد. **، *و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱، ۵ درصد و غیر معنی‌دار

Figure 9. Phosphoethanolamine N- methyltransferase gene expression level in tolerant and sensitive cultivar in different times after salt stress apply in comparison to check. **, * and ns significant in 1% and 5% probability levels and non significant respectively

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

مقاومت به تنش‌های غیرزیستی و به‌طور ویژه تنش شوری، مکانیسمی پیچیده و شامل ژن‌های متفاوت و زیادی می‌باشد. با توجه به توانایی گیاهان برای تغییر در الگوی بیان ژن‌های خود در پاسخ به تنش‌های محیطی، بررسی پروفایل بیان ژن‌ها به ابزار ارزشمندی در راستای بررسی چگونگی این تغییرات تبدیل شده است. در این مطالعه بر مبنای بررسی تنظیم الگوی بیان ژن با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP و تعیین نقش فرآورده‌ی آن‌ها با استفاده از پایگاه داده‌ی NCBI، مشخص شد که پاسخ به تنش شوری شامل جنبه‌های متعددی از قبیل: ۱) فعال شدن مسیرهای ترارسانی سیگنال، ۲) افزایش ترانسپورت سلولی، ۳) تغییر در متابولیسم، ۴) فعال شدن فاکتورهای رونویسی و ... می‌باشد. علاوه بر این، تغییرات موقت و متنوع ردیابی شده در بیان ژن در رقم مقاوم در این مطالعه منعکس کننده‌ی آن است که ارقام متحمل ممکن است تغییرات رونویسی متعددی را که در واقع سازگاری‌های ارزشمندی در راستای بهبود تحمل به تنش هستند، به‌منظور برقراری مجدد هموستازی و تعمیر آسیب ایجاد شده به پروتئین‌ها و غشاها به کار گیرند. با توجه به اهمیت برنج در تأمین امنیت غذایی در جهان و مشکل روز افزون شوری، درک عمیق‌تری از مکانیسم‌های تحمل و پاسخ ژنتیکی به تنش شوری دراین گیاه می‌تواند به طور معنی‌داری در اصلاح و مهندسی ژنتیک واریته‌های متحمل سودمند واقع گردد. علاوه بر این همه‌ی این ژن‌ها می‌توانند دریچه‌ی تازه‌ای برای بررسی پاسخ این ژن‌ها به دیگر تنش‌ها در برنج نیز باز نمایند.

منابع

1. Akihiro, T., T. Umezawa, C. Ueki, B.M. Lobna., K. Mizuno, M. Ohata and T. Fujimura. 2006. Genome wide cDNA-AFLP analysis of genes rapidly induced by combined sucrose and ABA treatment in rice cultured cells. FEBS Letters, 580: 5947-5952.
2. Anderson, J.V. and D.G. Davis. 2004. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. Physiologica Plantarum, 120: 421-433.
3. Bachem, C.W.B., R.S. Hoeven, S.M. Bruijn, D. Vreugdenhil, M. Zabeau and R.G.F. Visser. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. Plant Journal, 9: 745-53.
4. Bianchi, M.W., C. Roux and N. Vartanian. 2002. Drought regulation of GST8, encodes the Arabidopsis homologue of ParC/Nt107 glutathione transferase/peroxidase. Physiologica Plantarum, 116: 96-105.
5. Chen, J.H., H.W. Jiang, E.J. Hsieh, H.Y. Chen, C.T. Chien, H. Lhsieh and T.P. Lin. 2012. Drought and salt stress tolerance of an Arabidopsis Glutathione S -Transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. Plant Physiology, 158: 340-351.
6. Chen, W., N.J. Provart, J. Glazebrook, F. Katagiri, H.S. Chang, T. Eulgem, F. Mauch, S. Luan, G. Zou, S.A. Whitham, P.R. Budworth, Y. Tao, X. Xie, X. Chen, S. Lam, J.A. Kreps, J.F. Harper, A. Si-Ammour, B. Mauch-Mani, M. Heinlein, K. Kobayashi, T. Hohn, J.L. Dangl, X. Wang and T. Zhu. .2002. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. Plant Cell, 14: 559-574.
7. Chi, W., J.H. Yang, N.H. Wu and F. Zhang. 2004. Four rice genes encoding NADP-ME exhibit distinct expression profiles. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 68: 1865-1874.
8. Ciuzan, O., J. Hancock, D. Pamfil, I. Wilson and M. Ladomery. 2015. The evolutionarily conserved multi–functional glycine-rich RNA-binding proteins play key roles in development and stress adaptation. Physiologica Plantarum, 153: 1-11.
9. Cordin, O., J. Banroques, N.K. Tanner and P. Linder. 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. Gene, 367: 17-37.
10. Das, S., R. Basu and B. Ghosh. 1987. Heat stress induced polyamine accumulation in cereal seedlings. Plant Physiology and Biochemistry, 14: 108-116.
11. Davies, D.D. 1986. The fine control of cytosolic pH. Physiology of Plant, 67: 702-706.
12. Dinari, A., A. Niazi, A.R. Afsharifar and A. Ramezani. 2013. Identification of upregulated genes under cold stress in cold-tolerant chickpea using the cDNA-AFLP approach. PLOS One, 8: 527-533.
13. Dreyfuss, G., V.N. Kim and N. Kataoka. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and and the messages they carry. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 3: 195-205.
14. Dubouzet, J.G., Y. Sakuma, Y. Ito, M. Kasuga, E.G. Dubouzet, S. Miura, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2003. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant Journal, 33: 751-63.
15. Felle, H.H. 2001. PH: signal and messenger in plant cells. Plant Biology, 3: 577-591.
16. Fushimi, T., M. Umeda, T. Shimazaki, A. Kato, K. Toriyama and H. Uchimiya. 1994. Nucleotide sequence of a rice cDNA similar to a maize NADP-dependent malic enzyme. Plant Molecular Biology, 24: 965-967.
17. Gong, X., M. Liu, L. Zhang, Y. Ruan, R. Ding, Y. Ji, N. Zhang, S. Zhang, J. Farmer and C. Wang. 2015. Arabidopsis *AtSUC2* and *AtSUC4*, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. Physiologia Plantarum, 153: 119-136.
18. Ibraheem, O., G. Dealtry, S. Roux and G. Bradley. 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

19. Jha, B., A. Sharma and A. Mishra. 2011. Expression of *SbGSTU* (tau class glutathione S-transferase) gene isolated from *Salicornia brachiata* in tobacco for salt tolerance. Molecular Biology Reports, 38: 4823-4832.
20. Ji, W., Y. Zhu, Y. Li, L. Yang, X. Zhao, H. Cai and X. Bai. 2010. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. Biotechnology Letters, 32: 1173-1179.
21. Kawasaki, S., C. Borchert, M. Deyholos, H. Wang, S. Brazilles, K. Kawai, D. Galbraith and H. J. Bohnert. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. The Plant Cell, 13: 889-905.
22. Kawousi. 2001. Effect of different nitrogen and potassium levels on rice yield. Rasht research deputy, 24 pp (In Persian).
23. Kreps, J.A., Y. Wu, H.S. Chang, T. Zhu, X. Wang and J.F. Harper. 2002. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. Plant Physiology, 130: 2129-41.
24. Krishna, R. and K.A. Bhagwat. 1989. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. Plant Physiology, 91: 500–504.
25. Kumar, V., V. Shriram, T.D. Nikam, N. Jawali and M.G. Shitole. 2008. Sodium chloride-induced changes in mineral nutrients and proline accumulation in indica rice cultivars differing in salt tolerance. Journal of Plant Nutrition, 31: 1999-2017.
26. Li, T., E. Evdokimov, R.F. Shen, C.C. Chao, E. Tekle, T. Wang, E.R. Stadtman, D.C. Yang and P.B. Chock. 2004. Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins and nuclear pore complex proteins: A proteomic analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101: 8551-8556.
27. Liu, S., Y. Cheng, X. Zhang, Q. Guan, S. Nishiuchi, K. Hase and T. Takano. 2007. Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance. Plant Molecular Biology, 64: 49-58.
28. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}$CT method. Methods, 25: 402-408.
29. Mannas, K.C., S. Gupta, D.N. Sengupta and B. Ghosh. 1997. Expression of arginine decarboxylase in seedling of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars affected by salinity stress. Plant Molecular Biology, 34: 477-483.
30. Munnik, T., W. Ligterink, I. Meskiene, O. Calderini, J. Beyerly, A. Musgrave and H. Hirt. 1999. Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyper-osmotic stress. Plant Journal, 20: 381-388.
31. Marrs, K.A. 1996. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. Annual Review of Plant Physiology, 1996. 47: 127-58.
32. Martinoia, E. and D. Rentsch. 1994. Malate compartmentation: responses to a complex metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 45: 447-467.
33. McNeil, S.D., M.L. Nuccio, M.J. Ziemak and A.D. Hanson. 2001. Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine N-methyltransferase Proceeding of National Academy Science, 98: 10001-10005.
34. Moller, I.M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 52: 561-591.
35. Moller, I.M. and A.G. Rasmusson. 1998. The role of NADP in the mitochondrial matrix. Trends in Plant Science, 3: 21-27.
36. Mou, Z., X. Wang, Z. Fu, Y. Dai, C. Han, J. Ouyang, F. Bao, Y. Hu and J. Li. 2002. Silencing of phosphoethanolamine N- methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in Arabidopsis. The Plant Cell, 14: 2031-2043.
37. Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment, 25: 239-250.
38. Munnik, T., W. Ligterink, I. Meskiene, O. Calderini, J. Beyerly, A. Musgrave and H. Hirt. 1999. Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyper-osmotic stress. Plant Journal, 20: 381-388.
39. Owttrim, G.W. 2006. RNA helicases and abiotic stress. Nucleic Acids Research, 1: 3220-3230.
40. Pessarakli, M and I. Szabolcs. 1999. Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. In: Pessarakli M (ed) Handbook of plant and crop stress. Dekker, New York, pages: 3-21.
41. Pham, X.H., M.K. Reddy, N.Z. Ehtesham, B. Matta and N. Tuteja. 2000. A DNA helicase from Pisum sativum is homologous to translation initiation factor and stimulates topoisomerase I activity. Plant Journal, 24: 219-229.
42. Priebe, A. and H.I. Jagar. 1978. Effect of NaCl on the levels of putrescine and related polyamines in plants differing in salt tolerance. Plant Science Letters, 12: 365-369.
43. Rodríguez, M., M.C. González, E. Cristo, O. Oliva, M. Pujol and O. Borrás-Hidalgo. 2013. Identification of genes with altered expression levels in contrasting rice cultivars exposed to salt stress treatments. Biotecnología Aplicada, 30: 178-181.
44. Shavrukov, Y. 2013. Salt stress or salt shock: which genes are we studying? Journal of Experimental Botany, 64: 119-127.
45. Sinah, A.K., M. Jaggi, B. Raghuram and N. Tuteja. 2011. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. Plant Signaling and Behavior, 6: 196-203.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

46. Smith, T.A. 1973. Amine levels in mineral deficient *Hordeum vulgare* leaves. Phytochemistry, 12: 2093-2100.
47. Song, Y., Z. Wang, W. Bo, Y. Ren, Z. Zhang and D. Zhang. 2012. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP analysis showed differential transcript abundance in response to water stress in *Populus hopeiensis*. BMC Genomics, 13: 286-304.
48. Summers, P. and E.A. Weretilnyk. 1993. Choline synthesis in spinach in relation to salt stress. Plant Physiology, 103: 1269-1276.
49. Tabor, C.W. and H. Tabor. 1984. Polyamines. Annual Review of Biochemistry, 53: 749-790.
50. Turner, L.B. and G.R. Stewart. 1986. The effect of water stress upon polyamine levels in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. Journal of Experimental Botany, 37: 170-177.
51. Verslues, P.E., M.A. Garwal, S. Katiyar-Agarwal, J. Zhu and J.K. Zhu. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant Journal, 45: 523-539.
52. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman and M. Kuiper. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-4414.
53. Wang, X., W. Liu, X. Chen, C. Tang, Y. Dong, J. Ma, X. Huang, G. Wei, Q. Han, L. Huang and Z. Kang. 2010. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. BMC Plant Biology, 10: 1-15.
54. Weretilnyk, E.A., D.D. Smith, G.A. Wilch and P.S. Summers. 1995. Enzymes of Cho synthesis in spinach: Response of P-base N-methyltransferase activities to light and salinity. Plant Physiology, 109: 1085-1091.
55. Xu, D., X. Duan, B. Wang, B. Hong, T. Ho and R. Wu. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiology, 110: 249-257.
56. Zheng, L., M.C. Shannon and S.M. Lesch. 2001. Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. Agricultural Water Management, 48: 191-206.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]

Identification of Up-regulated Transcripts in Salt Tolerant Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivar using the cDNA-AFLP Technique

Fatemeh Zare[1], Gholam Ali Ranjbar[2], Ali Reza Tarang[3] and Hamid Najafi Zarrini[4]

1- Ph.D. student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, (Corresponding author: fzfatemehzare@gmail.com)
2 and 4- Associated and Assistant Professors of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Professor of Agricultural Biotechnology Research and Institute Iran, Gilan branch, Agricultural Research, Training and Promotion Organization, Rasht, Iran
Received: April 23, 2016 Accepted: September 3, 2016

Abstract

Salt stress is one of the main abiotic stresses for rice that causes negative effects on its growth and productivity. In present study, effects of salt stress on differential gene expression of some genes which are responsible in salt stress were investigated in two rice tolerant and sensitive genotypes (FL478 and IR29) by applying cDNA-AFLP technique. Among the TDFs (Transcript Derived Fragments) were generated by 2 restriction enzymes and 18 primer combination that displayed up-regulation expression in tolerant line with respect to the control treatment and sensitive line in response to salt stress, 28 TDF were separated and 21 of them were cloned, sequenced and submitted in gene bank and finally they were analyzed by BLAST algorithm. All known TDFs in current study were belonged to different groups of genes related to metabolism, signal transduction, transcription factors, detoxification, transport system and other mechanism related to salt stress which suggests a lot of process to be involved in salt stress responses. Some genes were further selected for validation of cDNA-AFLP expression patterns using real-time PCR. The results of real-time PCR confirmed the expression patterns that were detected using the cDNA-AFLP technique. The results of this research show that cDNA-AFLP is a powerful technique for investigating the expression pattern of rice genes under salt stress. Moreover our finding will help either elucidation the molecular basis of salt stress effects on rice rice or identification those genes that could increase the salt tolerance of rice plant.

Keywords: CDNA-AFLP, Gene expression, *Oryza sativa*, Salt stress, Transcript

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-03]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.125]