



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

چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر تنش شوری بر بیان افتراقی ژن متالوتایینین، میزان کلروفیل، شاخص اکسیداسیون سلولی و برخی صفات مورفوЛОژیکی در گندم، آزمایشی به صورت کرت خردشده- فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در سال ۱۳۸۷-۸۸ 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 فلاٹ (حساس) بود. نمونه‌گیری تصادفی از برگ در سه مرحله رشدی صورت گرفت. صفات مورد مطالعه شامل وزن خشک اندام هواپی، 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 متالوتایینین بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری صفات مبین تأثیر معنی دار سطح شوری بر کلیه صفات به جز وزن ویژه برگ بود. میزان وزن خشک اندام هواپی 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 فروپاش سطح شاخص اکسیداسیون TBAR می‌گردد. این مسئله در مورد میزان رادیکال سوپراکسید به ویژه در مرحله ظهور سنبله صادق بود. بیان ژن متالوتایینین همبستگی بالایی با فراوانی رادیکال مزبور، به طور اخص در مرحله ظهور سنبله، نشان داد. این امر با توجه به نقش آنتی اکسیدانی ژن مزبور قابل انتظار بود و مؤید تحریک پذیری آغازگر ژن مزبور توسط رادیکال سوپراکسید می‌باشد.

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

منفی، با تحمل به شوری مطرح نموده‌اند (۲۰، ۱۶). 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 (۳۵، ۲۴). ژن متالوتایینین از جمله ژن‌های دفاعی با نقش آنتی اکسیدانی است که تحت تأثیر بسیاری از تنش‌های زنده و غیرزنده افزایش بیان نشان داده است (۲۲، ۲۱، ۵). 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 در تحقیقات محدودی مورد نظر قرار گرفته است (۳۹، ۳۷). چنین به نظر می‌رسد که ترکیبی از روش‌ها و شاخص‌های مورد اشاره بتواند ارزیابی جامع‌تری در تحلیل ساز و کار تحمل و در پی آن معرفی ژنوتیپ‌های متتحمل عرضه نماید. تنش شوری تنها بر یک مرحله نمو تأثیر نمی‌گذارد. به طور 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.*

مقدمه گندم^۱، به عنوان 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 دارد (۱۰). از بین تنش‌های غیرزنده، شوری یکی از بزرگ‌ترین محدود کننده‌های تولید محصولات زراعی است (۲۹). شوری بر اغلب فرآیندهای مهم متابولیکی گیاه نظیر فتوسنتز، تنفس، بیان ژن‌ها و بسیاری از چرخه‌های فعل 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 هواپی را به عنوان شاخص‌های مناسب در تحمل به شوری معرفی کرده‌اند (۱۱، ۸). محققان دیگر ارتباط خصوصیاتی چون میزان کلروفیل و شاخص سطح اکسیداسیون سلولی را، به ترتیب با همبستگی مثبت و

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 (پنج‌هزار، ساقده‌ی و ظهور سنبله)، برای اندازه‌گیری صفات، وزن خشک اندام هوایی، سطح برگ تک بوته، وزن ویژه برگ^۱ و سرعت رشد^۲، از هر واحد آزمایشی پنج بوته برداشت گردید.

برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن متالوتایینین در سه مرحله رشد ذکر شده، سه گرم برگ از تیمارهای مختلف برداشت شد و در نیتروژن 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 الکتروفوروز 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 اسپکتروفوتومتر (Uvikon-Kontron) استفاده گردید. مقدار جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد و درصد خلوص RNA استخراج شده محاسبه گردید. نسبت به دست 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 متالوتایینین از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبر بیوبارس استفاده شد. این دستگاه قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد و در هر چرخه از فعالیت مقدار محصول واکنش پلیمراز را نشان دهد. به منظور 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 متالوتایینین استفاده شد. آغازگرهای مذبور 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 متالوتایینین به ترتیب شامل:

ACTGCAAGTGCAACCCCTGC-3
5-GCATAGCGGAGAGCGAGCA-3
ارزیابی میزان بیان ژن توسط نرم‌افزار REST و با استفاده از آزمون تصادفی^۴ 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 افزایشی از جمله حساس‌ترین دوره‌ها به تنفس شوری هستند (۲). البته این مسئله همواره ثابت نبوده و بسته به ژنتیک و اثر متقابل ژنتیک × محیط (سطح تنفس شوری) می‌تواند متغیر باشد (۲۷).

نتایج مطالعات زیادی نشان داد که تنفس شوری همانند اغلب تنفس‌های محیطی منجر به افزایش فراینده 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 تنفس کمک می‌نماید. همچنین، عوامل مذبور به عنوان 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، ۳۱، ۲۵). در این راستا، استفاده از سنجش تیوبار بیتوفریک^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 به منظور بررسی الگوی افتراقی بیان ژن متالوتایینین در واکنش به سطح تنفس شوری، و ارزیابی تغییرات هم زمان صفات مهم زراعی، میزان کلروفیل و سطح اکسیداسیون سلولی در شرایط تنفس شوری تنظیم شده است.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت طرح کرت خرد شده فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در سال ۱۳۸۷-۸۸ در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا گردید. عامل اصلی شامل سه مرحله رشد (پنج‌هزار، ساقده‌ی 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 فلاٹ (حساس) بود. کشت در ظروف کشت با ابعاد ۳۰×۳۵×۳۵ سانتی‌متر حاوی محیط پرلیت کوکوپیت به نسبت ۲ به ۱ انجام گرفت و مواد غذایی مورد نیاز گیاه توسط محلول هوگلن تأمین

1- Active Oxygen Species (AOS)

2- Measurement of Thiobarbituric Acid Reactive Material (TBARM)

3- Crop Growth Rate (CGR)

2- Signaling Molecules

4- Special Leaf Weight (SLW)

6- Randomization test

۱۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ 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 بر حسب 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 مذبور مشاهده شد (جدول ۱).

میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ 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 استنتر و هیوپل (۹) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد. یک گرم نمونه برگ یخ زده به طور 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 سانتریفیوژ 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 سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن، مقدار معادل حجم محلول اتیل‌اتر اضافه شد و با دور

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

منابع تغییر	آزادی	وزن	کلوفیل	کارکرد	تعداد	وزن	عملکرد	+
بلوک	۳	۰/۰۴۹ ^{ns}	۴/۱۰ ^{ns}	۰/۰۴۹ ^{ns}	۰/۰۴۹ ^{ns}	۰/۰۴۹ ^{ns}	۰/۰۰۷	+
مرحله نمو	۲	۰/۱۳۰ ^{**}	۷۰/۵۶ ^{ns}	۰/۱۳۰ ^{**}	۰/۱۳۰ ^{**}	۰/۱۳۰ ^{**}	-	+
خطای I	۶	۰/۱۱	۷/۱۳	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱	-	+
رقم	۱	۰/۰۱۰ ^{ns}	۳۰/۱۰ ^{**}	۰/۰۱۰ ^{ns}	۰/۰۱۰ ^{ns}	۰/۰۱۰ ^{ns}	۰/۰۳**	+
شوری	۳	۰/۰۱۱ ^{**}	۱۳۳/۱ ^{ns}	۰/۰۱۱ ^{**}	۰/۰۱۱ ^{**}	۰/۰۱۱ ^{**}	۰/۰۲۸**	+
مرحله×رقم	۲	۰/۰۱۰ ^{ns}	۲۷/۸ ^{ns}	۰/۰۱۰ ^{ns}	۰/۰۱۰ ^{ns}	۰/۰۱۰ ^{ns}	۰/۱۲۶ ^{**}	+
مرحله×شوری	۶	۰/۱۷۰ ^{**}	۱۶۰/۸۰ ^{ns}	۰/۱۷۰ ^{**}	۰/۱۷۰ ^{**}	۰/۱۷۰ ^{**}	۰/۱۱۹۵*	+
رقم×شوری	۳	۰/۰۲۳ ^{**}	۳۰/۱۰ ^{ns}	۰/۰۲۳ ^{**}	۰/۰۲۳ ^{**}	۰/۰۲۳ ^{**}	۰/۰۰۳ ^{ns}	+
رقم×شوری×مرحله	۶	۰/۰۰۶ ^{ns}	۱۸/۲۷ ^{ns}	۰/۰۰۶ ^{ns}	۰/۰۰۶ ^{ns}	۰/۰۰۶ ^{ns}	-	+
خطای II	۶۳	۰/۰۰۵	۱۷/۷۹	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶ ^{ns}	+

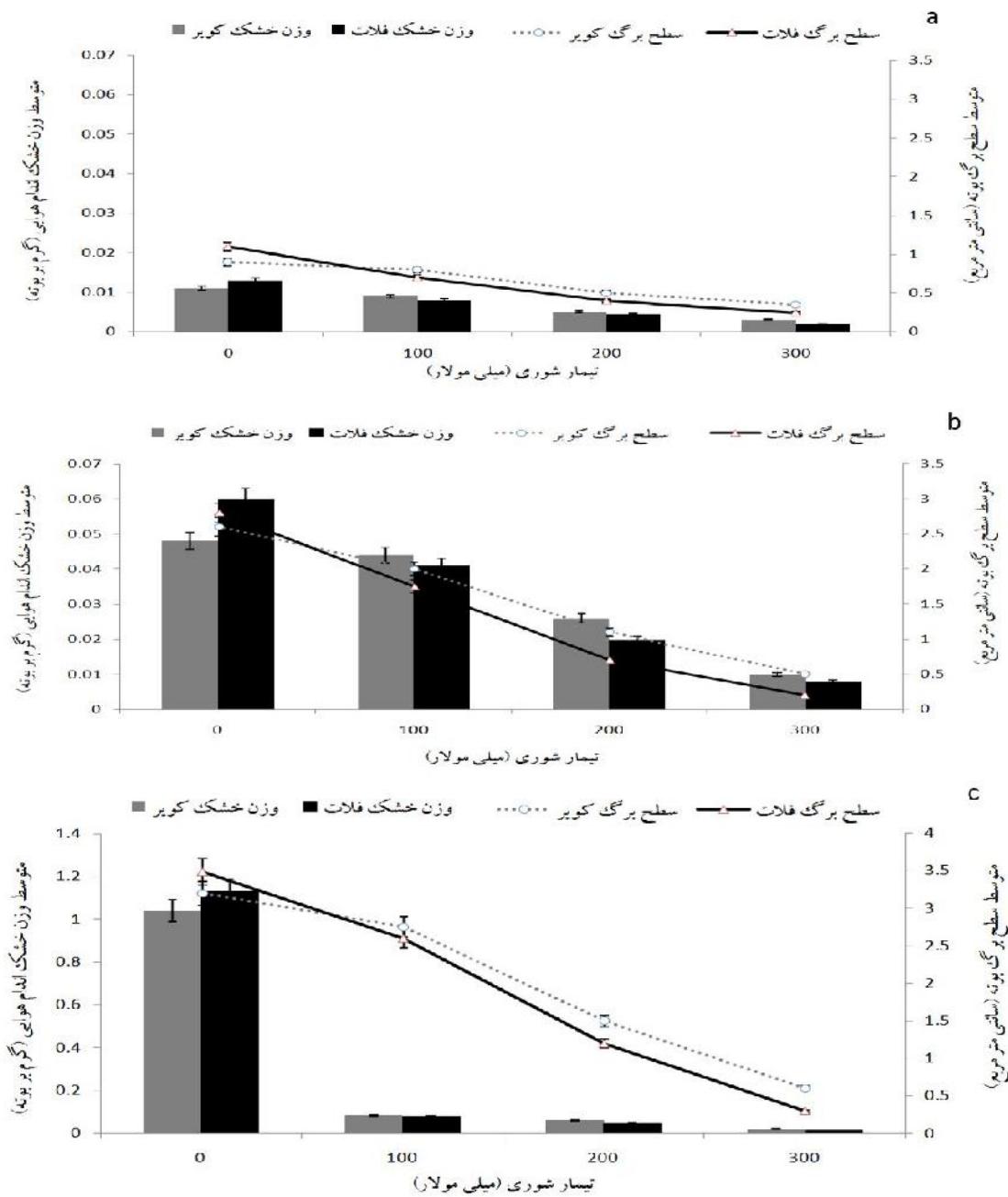
* و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد. + در مورد صفات مذبور با توجه به اندازه‌گیری در مرحله رسیدگی تجزیه آماری به صورت فاکتوریل (رقم و شوری) در قالب طرح بلوک انجام شد و درجه آزادی خطای مربوطه برابر ۲۱ است.

است. به طور کلی میزان سطح برگ با افزایش تنفس شوری کاهش نشان داد. میزان سطح برگ رقم حساس فلات علیرغم اینکه در تیمار شاهد نسبت به رقم کویر بالاتر بود، با فرونوی تنفس شوری با شبیه تندری کاهش یافت. این موضوع که در برخی مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۳۳، ۱۲) به عنوان یک ساز و کار گریز از تنفس محسوس می‌گردد. در واقع گیاه با کاهش سطح برگ میزان تعرق را تعديل نموده و در پی آن سطح متابولیت‌های محلول را در جهت افزایش نسبی تحمل به شوری تنظیم می‌نماید. از طرفی تنفس شوری موجب شکستگی پیوندهای پروتئینی گردیده و تداوم تنفس موجب کاهش رشد و وزن خشک گیاه می‌گردد (۱۲).

در مورد صفات وزن هزار دانه و عملکرد دانه، اثر متقابل رقم × شوری معنی‌دار نگردید. این مسئله به مفهوم استقلال عکس العمل ارقام مورد بررسی نسبت به سطوح شوری از نظر صفات مذبور 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 مربوطه موردنظر مطالعه طی مراحل رشد در (شکل ۱) نشان داده شده

مقایسه با رقم فلات کمتر بود. این مسئله در تمام سطوح تنفس شوری و در همه مراحل نمو (پنجه‌زنی (شکل-a) ساقه‌دهی (شکل-b) ظهر سنبله (شکل-1c)) ملاحظه شد. نکته جالب توجه اینکه میزان وزن خشک اندام هوایی رقم فلات در تیمار شاهد بیشتر از رقم کویر بود.

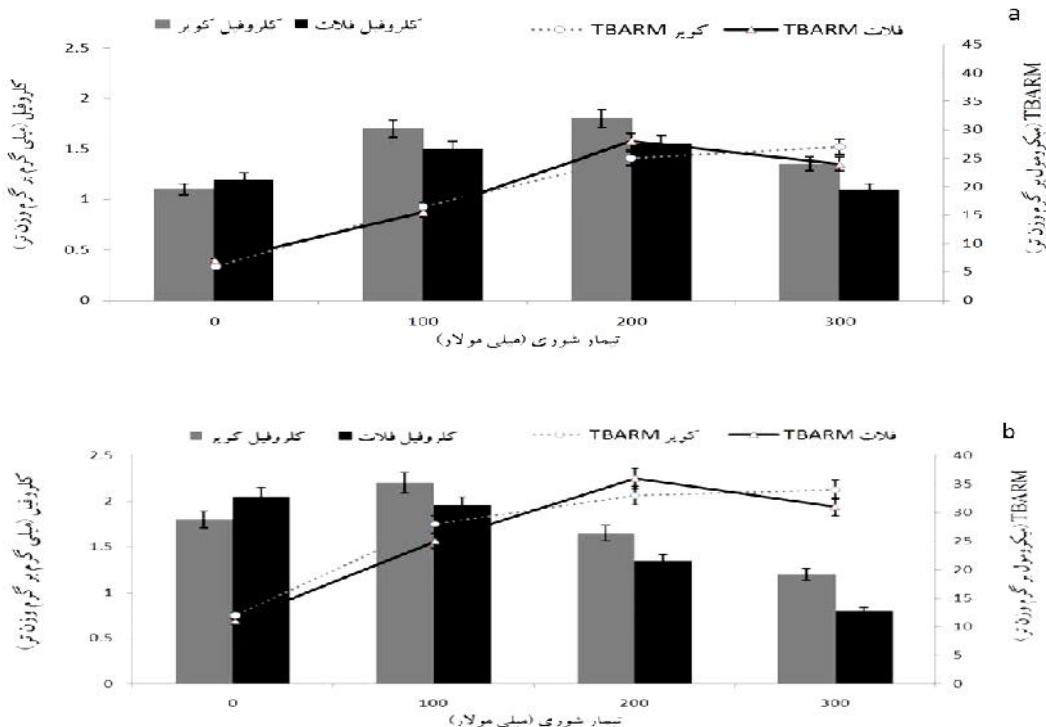
همچنین شوری با تأثیر سوء بر روند جذب یون‌ها و عناصر غذایی سبب افت فعالیت آنزیم‌ها و کاهش ماده‌سازی می‌شود (۲۶). بر این اساس، پایداری وزن خشک به عنوان یکی از شاخص‌های مهم در تحمل به شوری معروفی شده است (۳۱). در این تحقیق نیز میزان کاهش، وزن خشک اندام هوایی، رقم مقاوم که در



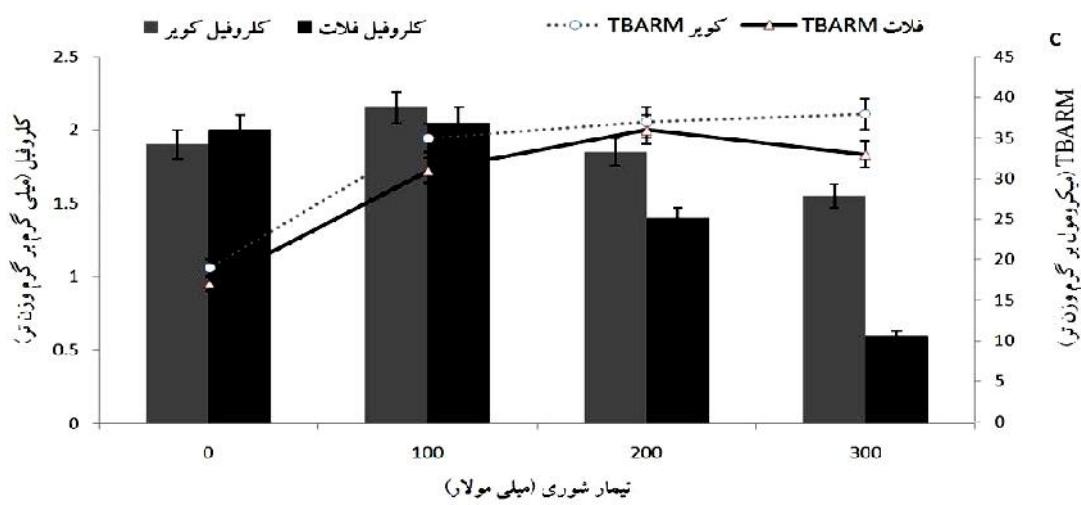
شکل ۱- تغییرات میزان متوسط وزن خشک اندام هوایی و سطح برگ ارقام کویر و فلات در شرایط تنفس شوری طی مراحل مختلف نمو: a- پنجه‌زنی b- ساقه‌دهی c- ظهر سنبله. مقدار خطای معیار ($n=4$) بهمنظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.

نشان داد. تحقیقات صالحی و همکاران (۲۸) نشان می‌دهد کاهش میزان کلروفیل در اثر تنفس شوری در مراحل پایانی رشد سرعت می‌یابد. این امر بدلیل کاهش بیوسنتر 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 تنفس‌های محیطی اعم از زنده و غیرزنده تلقی می‌گردد (۳۶). با توجه به سرعت بالای تبدیل عوامل اکسیژن واکنش‌گر و پیچیدگی فعل و انفعالات ببوشیمیایی، استفاده از سنجش تیوباربیتوريک دقت عمل قابل قبولی دارد (۲۵، ۷). نتایج این مطالعه نیز میان افزایش سطح شاخص TBARM طی مراحل نمو بود، به گونه‌ای که بیشترین میزان در مرحله ظهور سنبله حاصل گردید. ضمناً با افزایش تنفس شوری نیز سطح شاخص مذبور افزایش نشان داد. افت ناگهانی میزان TBARM در رقم حساس فلات در سطح ۳۰۰ میلی‌مولاً تنفس شوری در هر سه مرحله رشد ملاحظه شد (پنجه‌زنی (شکل a-۱) ساقده‌ی (شکل b-۱) ظهور سنبله (شکل c-۱)). دلیل احتمالی این مسئله می‌تواند بروز مرگ سلولی ناشی از شدت تخریب در تیمار مذبور باشد (۲۱).

تغییرات کلروفیل و شاخص سطح اکسیداسیونی
میزان کلروفیل در رقم مقاوم کویر در تمام مراحل رشد با افزایش شوری تا سطح ۱۰۰ میلی‌مولاً افزایش نشان داد (شکل ۲). اختلاف میزان کلروفیل در سطوح شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولاً در مرحله پنجه‌زنی (شکل ۲-a) غیرمعنی دار بود. نتایج مطالعه وانگ و همکاران (۳۶) نیز مؤید این موضوع است. کاهش چشمگیر میزان کلروفیل در تنفس ۳۰۰ میلی‌مولاً می‌تواند بدلیل تخریب ساختار پروتئینی ناشی از شدت تنفس رخ دهد (۲۸). اصولاً واکنش تغییرات میزان کلروفیل در شرایط تنفس شوری همواره ثابت نیست. بطوری که ارقام حساس در مواجه با تنفس ضمن کاهش سطح برگ مقدار بیشتری از کلروفیل در واحد سطح برگ را احرار 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 تنفس شوری نشان داد. شاخص پایداری بالا به مفهوم تأثیر محدودتر تنفس برگیاه 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 شبکی کاهشی شدیدی را با افزایش سطح شوری



شکل ۲- میزان کلروفیل و سطح اکسیداسیون سلولی (TBARM) ارقام کویر و فلات در شرایط تنفس شوری طی مراحل مختلف نمو:
- پنجه‌زنی - ساقده‌ی - ظهور سنبله. مقدار خطای معیار ($n=4$) به منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.

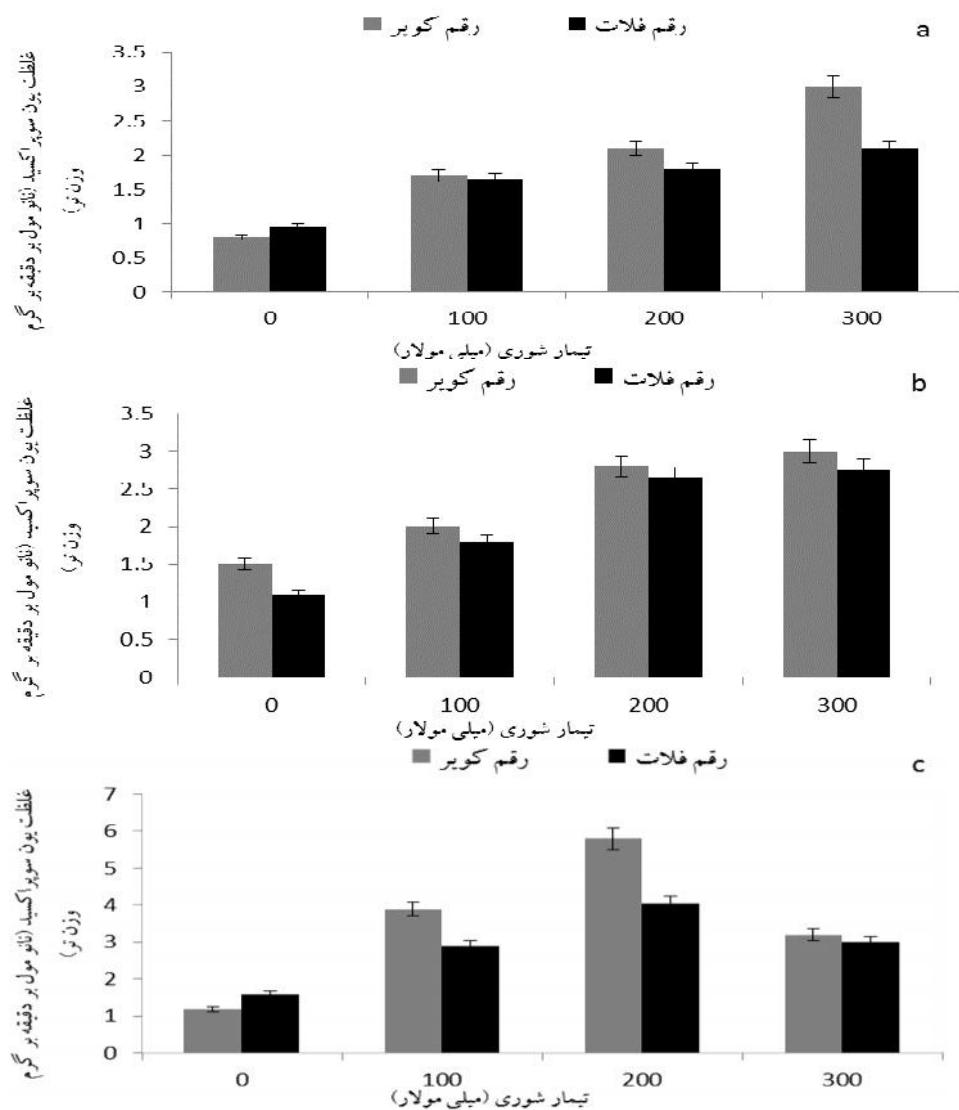


ادامه شکل ۲- میزان کلروفیل و سطح اکسیداسیون سلولی (TBARM) ارقام کویر و فلات در شرایط تنش شوری طی مراحل مختلف نمو: a- پنجه‌زنی b- ساقده‌یی c- ظهور سنبله. مقدار خطای معیار ($n=4$) بهمنظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.

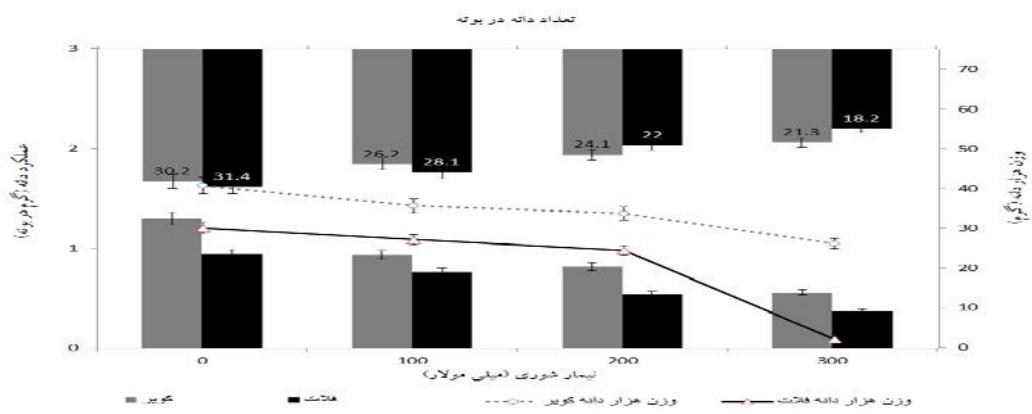
($P < 0.05$) را نسبت به رقم فلات نشان داد (جدول ۱). نتایج نشان داد که وزن هزار دانه در توجیه برتری عملکرد رقم کویر نقش مهم‌تری را در مقایسه با تعداد دانه ایفا نموده است. همچنین، میزان عملکرد این رقم ثبات نسبی بیشتری را در شرایط تنش شوری داشت (شکل ۴). در این ارتباط سهم نسبی تعداد دانه در مقایسه با وزن هزار دانه بیشتر بود. کافی و همکاران (۱۸) نیز بر اهمیت نقش تنظیمی تعداد دانه در شرایط تنش تأکید نموده‌اند. بهطورکلی نقش تبادلی 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 غیرمعنی دار گردید (جدول ۱).

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

تغییرات میزان رادیکال سوپر اکسید
با توجه به اهمیت میزان یون سوپر اکسید به عنوان یک عامل انتقال پیام در تحریک آغازگر ژن متالوتایینین (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 ساقده‌یی با افزایش میزان تنش شوری مقدار یون سوپر اکسید در هر دو رقم افزایش نشان داد. در مرحله ظهور سنبله میزان افزایش نسبی رادیکال سوپر اکسید تا مرز ۲۰۰ میلی مولار شدت بیشتری نسبت به مراحل رشد پنجه‌زنی و ساقده‌یی 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 سوپر اکسید به ویژه در مورد رقم مقاوم کویر خصوصاً در مرحله ظهور سنبله القای قابل ملاحظه‌ای را در تحریک آغازگر ژن متالوتایینین ایجاد نمود. این مسئله در برخی مطالعات انجام شده گزارش شده است (۲۱). میزان عملکرد دانه در رقم مقاوم کویر برتری معنی داری



شکل ۳- تغییرات میزان یون سوپر اکسید در برگ ارقام کویر و فلات در شرایط تنفس شوری طی مراحل رشدی:
a- پنجه‌زنی
b- ساقه‌دهی
c- ظهرور سنبله. مقدار خطای معیار ($n=4$) به منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.

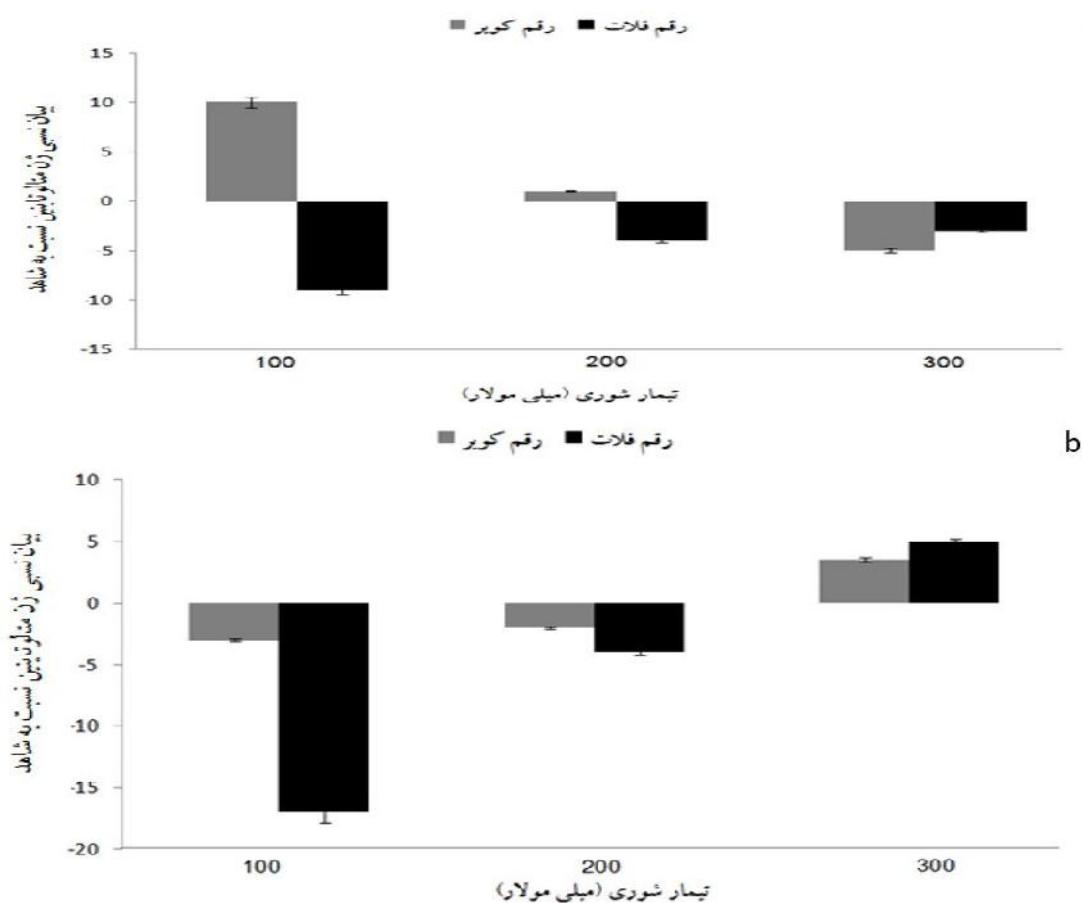


شکل ۴- تغییرات میزان عملکرد دانه، تعداد دانه و وزن هزار دانه در ارقام کویر و فلات تحت شرایط تنفس خشکی. مقدار خطای معیار ($n=4$) به منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.* اعداد روی ستون‌ها تعداد دانه را نشان می‌دهد.

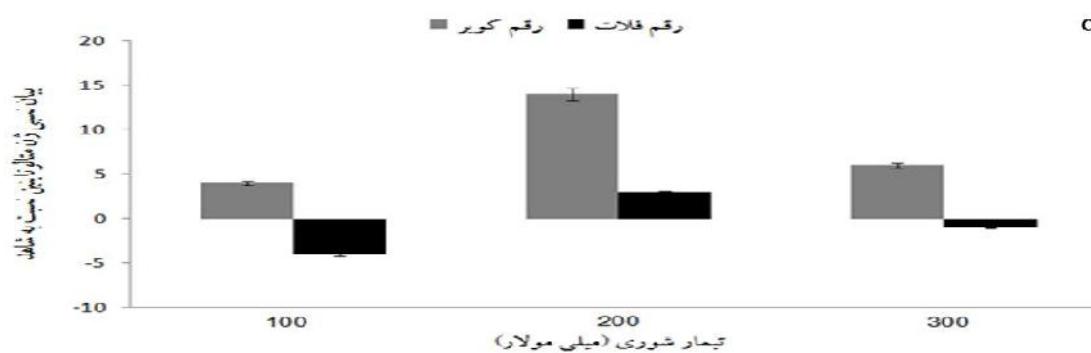
ظهور سنبله افزایش نشان داد (شکل ۵-۳). افزایش قابل توجه بیان ژن متالوتایینین در مرحله ظهور سنبله با میزان تجمع رادیکال سوپراکسید (شکل ۳) هم خوانی زیادی داشت. نقش این رادیکال در تحیرک آغازگر ژن مزبور در برخی مطالعات گزارش شده است (۲۱). بر اساس نتایج تحقیق حاضر چنین به نظر می‌رسد بیان این ژن در القای تحمل 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 زاگزارش شده است (۲۲،۵). نتایج مشابهی در افزایش نسبی بیان این ژن تحت تأثیر تیمارهای تنش زاگزارش 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.

ارزیابی الگوی بیان ژن متالوتایینین

پروتئین رمز شده ژن متالوتایینین واجد وزن مولکولی پائین با محتوای بالای اسید آمینه سیستئین (حدود ۳۰ درصد) است که ظرفیت بالایی برای پیوندهای فلزی را دارد (۲۲). با توجه به گستردگی ایزوژن‌های متالوتایینین، الگوی بیان این ژن در اندام‌های مختلف گیاهی تنوع زیادی دارد (۶). نقش اصلی این ژن درسم 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 ۱-a) ساقده‌ی (شکل ۱-b) ظهور سنبله (شکل ۱-c)). عکس العمل بیان این ژن نسبت به سطوح شوری در مراحل پنجه‌زنی و ساقده‌ی ثبات چندانی نداشت. با توجه به اینکه ژن مزبور از ژن‌های وابسته به مرحله پیری است (۴)، این موضوع چندان غیر قابل انتظار نبود به ویژه اینکه بیان این ژن در مرحله



شکل ۵- تغییرات بیان ژن متالوتایینین در ارقام مورد مطالعه تحت شرایط تنش شوری طی مراحل نمو: a- پنجه‌زنی b- ساقده‌ی c- ظهور سنبله. مقدار خطای معیار (n=۴) به منظور انجام مقایسه آماری نشان داده شده است.



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

بیشتری را در میزان کلروفیل تحت شرایط تنفس نشان داد. با توجه به این مسئله و بر اساس نتایج سایر تحقیقات ثبات کلروفیل به عنوان شاخص پایداری مطرح می‌باشد. بر خلاف کلروفیل، مقدار شاخص اکسیداسیون سلولی (TBARM) با تشدید تنفس شوری افزایش نشان داد. در این راسته، اندازه‌گیری میزان یون سوپراکسید به عنوان عامل انتقال پیام در تحریک آغازگر ژن دفاعی متالوتایینین 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 مذبور طی مرحله پرشدن دانه به ویژه در رقم متحمل کوبیر را اثبات می‌نماید.

تفاوت بسیار معنی‌داری بین ارقام (کوبیر 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 میان استقلال عکس العمل ارقام مورد بررسی نسبت به سطوح شوری از نظر صفات مذبور بود. میزان سطح برگ با افزایش تنفس شوری کاهش قابل توجهی به ویژه در رقم حساس فلات نشان داد. از طرفی تنفس 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 ماده سازی دور از انتظار نیست. میزان کلروفیل با افزایش سطح شوری طی مراحل رشد روند کاهشی داشت. با این حال، رقم مقاوم کوبیر 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 Journal of 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 Journal of 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. Dat, J., E. Vandebaele, 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 of 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 Meibodi. 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 hypogaea* 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 H_2O_2 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 *triticum 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. Abroud. 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