ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحه ۱۳۵ - ۱۲۷

مطالعه برخی از پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی ارقام جو در مرحله گیاهچه‌ای تحت تنش شوری

Study of some biochemical and molecular responses of barley variety at seedling stage under salinity stress

زینب حمزه کهنوجی[۱]، آسا ابراهیمی*[۱]، غلامرضا شریفی سیرچی[۲]، اسلام مجیدی هروان[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، استاد، گروه بیوتکنولوژی اصلاح نباتات و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، ایران

Hamzeh-Kahnoji Z[1], Ebrahimi A[*1], Sharifi-Sirchi Gh[2], Majidi-Hervan E[1]

1- PhD Student, Assistant Prpfessor, Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Horticulture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: asaebrahimi@srbiau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

چکیده

شوری خاک یکی از بزرگ‌ترین مشکلات کشاورزی محسوب می‌شود که باعث کاهش رشد و عملکرد محصولات زراعی می‌شود. با اینکه جو متحمل‌ترین گیاه نسبت به تنش شوری در بین غلات است اما مرحله گیاهچه‌ای جو، یکی از حساس‌ترین مراحل رشدی به تنش شوری می‌باشد. از این‌رو، به‌منظور بررسی اثر تنش شوری بر صفات بیوشیمیایی نظیر شاخص پراکسیداسیون سلولی (TBARM)، فعالیت کاتالاز و محتوی پرولین در ریشه و اندام‌هایی ارقام جو در مرحله گیاهچه‌ای، طرح فاکتوریل با پایه کامل تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل دو سطح شوری (هدایت الکتریکی آب برابر با ۰ و ۲۲ دسی‌زیمنس بر متر) و دو رقم جو (رقم حساس (فجر) و مقاوم (افضل)) بود. همچنین، بیان نسبی سه ژن (*NHX3*، *CAT1* و *TIP2;3*) در ریشه و اندام هوایی در مرحله گیاهچه‌ای تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ANOVA نشان داد که اثرمتقابل بین شوری و رقم بر روی همه صفات فوق ($p < ۰/۰۱$) معنی‌دار است. تحت تنش شوری، TBARM، فعالیت کاتالاز و پرولین در ریشه و اندام هوایی هر دو رقم در مرحله گیاهچه‌ای افزایش یافت اما بالاترین محتوای پرولین و فعالیت کاتالاز، و پایین‌ترین میزان TBARM در رقم متحمل (افضل) مشاهده شد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که رقم متحمل به‌ترتیب با تنش‌های اکسیداتیو و اسمزی ناشی از تنش شوری از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و املاح سازگار مقابله می‌نماید. الگوی بیانی ژن‌های *NHX3*، *CAT1* و *TIP2;3* در رقم متحمل تحت تنش شوری نشان داد که این ژن‌ها در بالا بردن تحمل به شوری در جو نقش دارند. در نتیجه، ژن‌های فوق می‌توانند به‌عنوان نامزدهای امیدبخش در برنامه‌های اصلاح نژادی برای افزایش تحمل به شوری در محصولات زراعی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
جو
صفات بیوشیمیایی و شوری

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-19]

مقدمه

تنش‌های محیطی روی رشد و نمو گیاهان اثرات منفی دارند که در نهایت منجر به کاهش تولید و عملکرد آن‌ها می‌شود (Yadav et al. 2015). شوری یکی از مخرب‌ترین تنش‌های غیرزیستی محسوب می‌شود که به‌ترتیب بیش از ۸۰۰ و ۳۲ میلیون هکتار از اراضی آبی و دیمی دنیا تحت تأثیر شوری قرار گرفته است (Wani et al. 2020) و پیش‌بینی شده است که تا سال ۲۰۵۰ حدود ۵۰ درصد از زمین‌های زراعی در اثر افزایش شوری خاک از دست بروند (Wang et al. 2003). علاوه بر آن در نتیجه آبیاری مزارع با آب‌های بی‌کیفیت و کاهش بارندگی، اراضی با خاک‌های شور در جهان رو به افزایش است (Mishra and Tanna 2017). تنش شوری از طریق کاهش جوانه زنی بذور و محدود سازی رشد و نمو گیاهان باعث کاهش عملکرد کشاورزی می‌شود (Cheeseman 2015). تنش شوری با القای تنش‌های اسمزی و اکسیداتیو، مسمومیت یونی، ایجاد محدودیت در جذب مواد معدنی ضروری و عدم تعادل تغذیه‌ای باعث کاهش رشد گیاهان می‌شود (Wani et al. 2020). گیاهان در سطوح مختلف نظیر سطح مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی به تنش‌های غیرزیستی پاسخ می‌دهند (Polash et al. 2019). در سطح مورفولوژیکی صفاتی نظیر درصد جوانه‌زنی، طول و وزن تازه ریشه و برگ، ارتفاع گیاه و سطح فیزیولوژیکی صفاتی نظیر محتوای کلروفیل و محتوای نسبی آب در گیاهان کاهش می‌یابد (El-Esawi et al. 2018; Liaqat et al. 2020). در سطح بیوشیمیایی، گیاهان برای تنظیم اسمزی، اسمولیت‌هایی نظیر پرولین و قندها در پاسخ به تنش اسمزی ناشی از تنش شوری تولید می‌کنند (Banerjee et al. 2019). تجمع اسمولیت‌ها منجر به کاهش پتانسیل اسمزی و حفظ فشار تورژسانس سلول، حفظ یکپارچگی غشاء و جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین‌ها استفاده می‌شود (Bartels and Sunkar 2007). همچنین، گیاهان برای به حداقل رساندن تأثیر تنش اکسیداتیو ناشی از فعالیت گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تحت تنش شوری آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی خود را نیز افزایش می‌دهند (Paul and Lade 2014). تجمع پرولین و افزایش فعالیت‌های آنتی اکسیدانی تحت تنش شوری در جو، برنج و گندم در تحقیقات مختلف مشاهده شده است (El-Esawi et al. 2018; Mousavi et al. 2017; Nohtani and Mahdinezhad 2020). واکنش گیاهان به تنش غیر زیستی بسیار پیچیده است که شامل ژن‌ها و مکانیسم‌های بیوشیمیایی–مولکولی متعدد است. ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را می‌توان به سه دسته کلی طبقه‌بندی نمود. دسته اول شامل ژن‌هایی که در مسیر سیگنالینگ و کنترل رونویسی نقش دارند مانند MyC، MAP kinases و SOS kinase، فسفولیپازها و عوامل رونویسی نظیر خانواده‌های CBF/DREB و ABF/ABAE (Frank et al. 2000; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000). دسته دوم، آن‌هایی که مستقیماً در حفاظت از غشاها و پروتئین‌ها درگیر هستند مانند پروتئین‌های گرمازدگی[1]، چاپرون‌ها، حفاظت کننده‌های اسمزی[2] و پاک کننده‌های رادیکال آزاد (Bohnert and Sheveleva 1998; Vierling 1991). دسته سوم، آن‌هایی که در جذب و انتقال آب و یون‌ها دخیل هستند مانند آکواپورین‌ها و حمل کننده‌های یون‌ها[3] (Blumwald 2000; Maurel 1997). در گیاهان مدل، ژن‌هایی که در پاسخ به تنش شوری نقش دارند نظیر ژن‌های SOS[4]، MAPK[5] و CDPK[6] شناسایی شدند (Ludwig et al. 2004; Nakagami et al. 2005). علاوه بر آن‌ها، برخی از ژن‌ها که آنتی‌پورت‌ها مانند NHXها، کانال‌ها مانند TIP[7] و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز را در گیاهان رمزدهی می‌نمایند، شناسایی شده‌اند (Mishra and Tanna 2017; Roslyakova et al. 2009). در گیاهان، آنتی پورترهای Na^+/H^+، آنزیم‌های کاتالاز و TIPها به‌ترتیب در حفاظت از سیتوزول در برابر مقادیر بالای NaCl، جمع‌آوری کننده ROS و انتقال آب و مولکول‌های کوچک از خلال غشای سلولی نقش دارند (Fath et al. 2002; Kurowska 2020; Qiu et al. 2003). جو (*Hordeum vulgare* L.) به‌عنوان یک مدل گیاهی عالی برای مطالعات پاسخ گیاهان به تنش شوری در نظر گرفته شود (Munns and Tester 2008). با توجه به اینکه یکی از مشکلات بزرگ ایران، مسئله

[1] Heatshock proteins (Hsps)
[2] Osmoprotectants
[3] Ion transporters
[4] Salt Over Sensitive
[5] Mitogen Activated Protein Kinase
[6] Calcium-Dependent Protein Kinase
[7] Tonoplast Intrinsic Proteins

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-19]

خاک‌های شور است است و از سوی دیگر، جو در این کشور به‌طور گسترده کشت می‌شود، هدف از این مطالعه، مقایسه صفات بیوشیمیایی و همچنین بیان نسبی ژن‌های NHX3، TIP2;3 و Catalase1 در ریشه و اندام هوایی در رقم حساس و متحمل به تنش شوری است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور ارزیابی صفات بیوشیمیایی و بررسی الگوی بیان ژن‌های مورد نظر، بذور ارقام جو در قالب طرح طرح فاکتوریل $۲^۲$ با پایه کامل تصادفی در چهار تکرار کشت شدند. فاکتور اول (a)، تنش شوری (صفر و ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl به‌ترتیب معادل هدایت الکتریکی (EC) برابر با ۰ و ۲۲ دسی‌زیمنس بر متر) و فاکتور دوم (b)، ارقام جو (رقم افضل و فجر به‌ترتیب متحمل و حساس به تنش شوری (Sahafi et al. 2021)) در نظر گرفته شدند. در ابتدا، بذور با هیپوکریت سدیم (٪۵) استریل و با آب‌مقطر شستشو شدند. جوانه‌زنی بذور با استفاده از کاغذ صافی درون پتری دیش استریل در انکوباتور در تاریکی با دمای ۱±۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ روز صورت گرفت. سپس به‌منظور کشت گیاه، جعبه‌های پلاستیکی سیاه رنگ به ابعاد ۱۵ در ۲۰ سانتی‌متر با ارتفاع ۵ سانتی‌متر حاوی محلول هوگلند تهیه شد. روی جعبه‌ها، یونولیت منفذدار گذاشته شد تا گیاهچه‌ها روی جعبه‌ها مستقر شوند و ریشه گیاهچه‌ها به‌راحتی در محیط رشد قرار گیرند. زمانی‌که ریشه‌ها به‌طول ۲ الی ۳ سانتی‌متر رسیدند، گیاهچه‌های یکنواخت هر رقم به جعبه‌های کشت منتقل شدند. جعبه‌های کشت در شرایط ۱٦ ساعت روشنایی (شدت ۲٤۰۰ لوکس) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. هوادهی محیط کشت داخل جعبه‌ها توسط پمپ هوای آکواریومی در طول دوره رشد انجام شد و محیط کشت هر هفته تعویض و pH محیط با استفاده از KOH و HCL در محدوده ۵/۵-۵ تنظیم شد. پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۲ برگی (۱٤ روز بعد از کشت)، تنش شوری ($EC= 22\ ds/m^{-1}$) اعمال شد. نمونه‌برداری از ریشه و اندام هوایی از گیاهان شاهد ($EC= 0\ ds/m^{-1}$) و تحت تنش شوری پس از ۲٤ ساعت از اعمال تنش شوری به‌صورت رندوم از هر گلدان انجام گرفت و نمونه‌ها به‌سرعت توسط ازت مایع فریز شدند و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان سنجش صفات بیوشیمیایی و الگوی بیان ژن‌ها نگه‌داری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه و اندام هوایی گیاهان شاهد و تنش شوری مطابق با روش Sinha et al. (1972) صورت گرفت. برای این منظور، یک گرم از هر نمونه در ٤ میلی‌لیتر اتانول ۵۰% در هاون کوبیده و یکنواخت شد. پس از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه در دور ٤۰۰۰)، ۵۰۰ میکرولیتر مایع رویی با یک میلی‌لیتر محلول فسفات (M ۰/۰۱) و پراکسید هیدروژن (M ۰/۲) است، مخلوط شد. برای متوقف کردن واکنش‌ها، ۲ میلی‌لیتر مخلوط دی کرومات/استیک اسید (۵۰ میلی‌لیتر محلول آبی دی کرومات پتاسیم ۵ درصد و ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال) اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه گرم شدند. جذب در ٦۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و میزان تجزیه H_2O_2 در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین به‌عنوان یک واحد فعالیت کاتالاز در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری میزان پرولین با روش Bates et al. (1973) انجام شد. به این منظور، ۵۰۰ میلی‌گرم از ریشه و اندام هوایی هر رقم تحت شرایط کنترل و شوری با ۱۰ میلی‌لیتر ۳/۳ درصد اسید سولفوسالیسیلیک همگن و سانتریفیوژ (با ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر از هر مایع رویی به‌دست آمده با ۲ میلی‌لیتر از اسید استیک گلاسیال و اسید نایِن هیدرین (۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک، ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ٦ مولار و ۱/۲۵ گرم نایِن هیدرین) مخلوط شدند. هم‌زمان جهت ترسیم منحنی استاندارد، مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول‌های استاندارد صفر، ٤، ۸، ۱۲، ۱٦ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین را درون تیوب‌های جدید ریخته و ۲ میلی‌لیتر اسید نایِن هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن‌ها افزوده و سپس خوب مخلوط شد. همه نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام گرم نگهداری شدند. در آخر، ۵ میلی‌لیتر تولوئن به محلول‌ها اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. قرائت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵٤۰ نانومتر صورت گرفت و محتوای پرولین، از روی میزان

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-19]

جذب نمونه‌ها و مقایسه آن با منحنی استاندارد تعیین و برحسب میکرومول پرولین در گرم نمونه‌تر گیاهی بیان شدند.

سنجش شاخص سطح اکسیداسیون[1] (TBARM) بر اساس روش Hagege et al. (1990) برآورد شد. به این منظور، ۵۰۰ میلی‌گرم از ریشه و اندام هوایی هر رقم با یک میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (۱۵٪ w/v) مخلوط شد و سپس، ۱۰ میلی‌لیتر استون اضافه، مخلوط و سانتریفیوژ (۴۷۵۰ دور در دقیقه ، ۱۵ دقیقه) شدند. رسوب حاصل، مجددا با استون مخلوط و سانتریفیوژ شدند. سپس به آن، ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک (۱٪w/v) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباربیورتیک (۰/۶٪w/v) افزوده و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام گرم قرار گرفت. پس از خنک شدن واکنش‌ها روی یخ، واکنش‌ها با ۳ میلی‌لیتر بوتانول مخلوط و سانتریفیوژ شدند. جذب فازهای آبی جدا شده در ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر برای اندازه‌گیری ماندگاری لایه بوتانولیکی خوانش شد.

به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های *GAPDH*، *NHX3*، *TIP2;3* و *Catalase1*، در ابتدا توالی ژن‌های آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت و سپس، آغازگر اختصاصی رو به جلو و برگشتی برای این ژن‌ها جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (ROZEN 1998) طراحی شد (جدول ۱). به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌ها، استخراج RNA کل از بافت‌های ریشه و اندام‌های هوایی ارقام افضل و فجر تحت شرایط کنترل و شوری با استفاده از محلول ترایزول (شرکت Invitrogen) انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA توسط دستگاه نانودراپ و همچنین الکتروفورز ژلی بررسی شد. سپس، به‌منظور حذف آلودگی DNA در محلول استخراج RNA کل، از آنزیم DNase استفاده شد و ساخت cDNA مطابق با دستورالعمل کیت سنتز cDNA (شرکت Fermentas) صورت گرفت. الگوی بیانی ژن‌های مورد نظر در تحمل به تنش شوری در جو توسط PCR کمی[2] با استفاده از کیت SYBR Green SuperMix (شرکت Quanta) و دستگاه Real-time PCR (شرکت Bio-rad) مطالعه شد. ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی و میزان بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak 2008) با نرم‌افزار REST (Pfaffl et al. 2009) محاسبه شد. همچنین، میزان تغییرات بیان این ژن‌ها تحت تنش شوری نسبت به شاهدشان سنجیده شدند. در نهایت، تجزیه واریانس حاصل از اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (Ver 9.1) و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال یک درصد به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) صورت گرفت.

نتایج و بحث

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در رشد و نمو گیاه و همچنین در برهمکنش با تنش‌های محیطی نقش حیاتی دارند. ROSها به‌عنوان عناصر مهم تنظیمی و پیام‌رسانی در بسیاری از فرآیندهای سلولی نقش دارند. ROSها به‌طور مداوم در طول فرایند فتوسنتز و تنفس تولید می‌شود ولی هموستازی ردوکس[3] در سلول به‌طور سختگیرانه‌ای توسط مکانیسم‌های محافظتی کنترل می‌شود. اختلال در این مکانیسم‌های محافظتی می‌توانند منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی شود. اگرچه در شرایط رشد طبیعی، تولید ROS در سلول‌ها بسیار کم است اما تنش‌های زیستی و غیرزیستی باعث مختل شدن هموستاز سلولی می‌شوند و تولید ROS را تقویت می‌کنند. آسیب به مولکول‌های زیستی مانند DNA و پروتئین‌ها، تخریب غشای سلولی و اکسیداسیون لیپیدها تحت تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد و گیاهان با افزایش آنتی‌اکسیدان آنزیمی مانند کاتالاز و آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی مانند آسکوربات با این تنش مقابله می‌کنند (Abbas 2018).

در مطالعه حاضر، TBARM به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و کاتالاز به‌عنوان آنتی اکسیدان آنزیمی در مرحله گیاهچه‌ای جو تحت تنش شوری اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر فاکتور شوری (هدایت الکتریکی برابر با صفر و ۲۲ دسی‌زیمنس بر متر)، رقم (فجر و افضل) و اثر متقابل بین آن‌ها در سطح احتمال یک درصد بر روی فعالیت آنزیمی کاتالاز و TBARM معنی‌دار است (جدول ۲). همچنین،

[1] Thiobarbituric Acid Reactive Material (TBARM)
[2] Quantitative Polymerase Chain Reaction
[3] redox homeostasis

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-19]

نتایج نشان داد که سطح TBARM در ریشه و اندام هوایی رقم حساس (فجر) و متحمل (افضل) تحت تنش شوری (ds/m^{-1} EC= 22) به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است اما سطح آن در رقم حساس بیشتر از رقم متحمل بود. همچنین، میزان TBARM در ریشه در مقایسه با اندام هوایی ارقام بالاتر بود (شکل ۱–الف). مطابق با نتایج این تحقیق، مطالعات پیشین نشان داده است که TBARM در مرحله گیاهچه‌ای در ژنوتیپ‌های برنج تحت تنش شوری افزایش یافته است و مقدار TBARM در ژنوتیپ حساس به تنش شوری در مقایسه با ژنوتیپ متحمل در برنج بیشتر است (Bertazzini et al. 2018; Sarkar et al. 2013). همچنین، میزان TBARM در مرحله گیاهچه‌ای گندم رقم نیمه متحمل بیشتر از رقم متحمل تحت تنش شوری بود (Nouri et al. 2015).

تجزیه و تحلیل فعالیت کاتالاز نشان داد که تنش شوری موجب افزایش فعالیت کاتالاز در ریشه و اندام هوایی هر دو رقم شده است و رقم افضل در مقایسه با رقم فجر هم در شرایط کنترل و هم تحت تنش دارای فعالیت کاتالازی بیشتری در ریشه و اندام هوایی است (شکل ۱–ب). مطالعات پیش نیز نشان داده است که فعالیت کاتالاز در گیاهچه‌های جو تحت تنش شوری (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl) افزایش یافته و فعالیت کاتالار به‌طور قابل توجهی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری افزایش می‌یابد (Mariey et al. 2018; Oprica et al. 2020). بر اساس فعالیت بالای کاتالاز و پایین بودن شاخص اکسیداسیون (TBARM) در رقم افضل نسبت به رقم فجر تحت تنش شوری، به‌نظر می‌رسد که دفاع آنتی‌اکسیدانی در رقم متحمل در مقایسه با رقم حساس فعال‌تر بوده است تا سطح اکسیداسیون لیپیدهای غشایی نسبت به رقم حساس کمتر باشد و با توجه به این امر که ریشه اولین بافتی است که با تنش شوری مواجه می‌شود، این مکانیسم در ریشه نسبت به اندام هوایی فعال‌تر است. گیاهان تحت تنش شوری دچار تنش اسمزی می‌شوند و برای مقابله با آن، میزان محلول سازگار نظیر اسیدهای آمینه و قندها را به‌عنوان تنظیم کننده‌های اسمزی را افزایش می‌دهند تا اثرات منفی تنش اسمزی را کاهش دهد (Glenn 1997; Munns et al. 2006). پرولین از مهم‌ترین محلول سازگار در تنش غیر زیستی به‌شمار می‌آید که در تنظیم فشار اسمزی، پایداری ساختار غشاء و پروتئین‌ها، کاهش هدر رفت آب از سلول نقش دارد (Szabados and Savouré 2010). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فاکتور شوری (هدایت الکتریکی برابر با ۰ و ۲۲ دسی‌زیمنس بر متر)، رقم (فجر و افضل) و اثر متقابل بین آن‌ها در سطح احتمال یک درصد بر روی محتوی پرولین معنی‌دار است (جدول ۲).

جدول ۱– مشخصات آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار Oligo

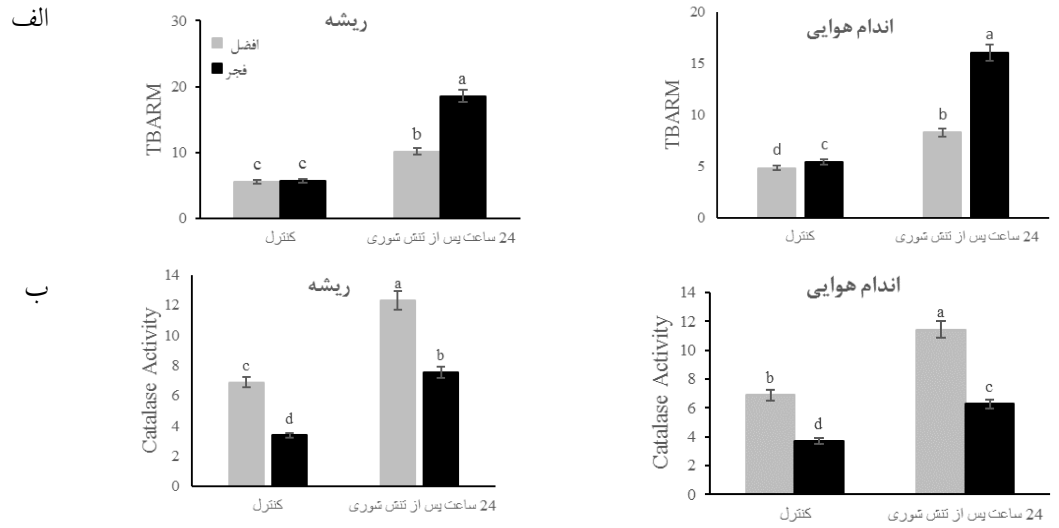
نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	دمای ذوب
GAPDH	AK359500.1	5'-GTTGGCAAGGTGCTCCCAGA-3' 5'-GCTCATAGGTGGCTGGCTTG-3'	62.70 61.10
NHX3	DQ372061.1	5'-TGGGAGGTATCTAGTGGGCT-3' 5'-TTGTGCCAGGTATAGTGCGA-3'	59.06 59.10
TIP2;3	EU872296.1	5'- CTACTGGGTTGCGCAGCTC-3' 5'- GTGCCGAGGGATCCCTTC- 3'	61.10 59.49
Catalase1	U20777.1	5'-TCTGGGTCTCATACTGGTCACA-3' 5'-TACCGCACACAACGACAGAT-3'	60.23 59.68

جدول ۲– تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی مورد مطالعه در ارقام جو تحت تنش شوری

		میانگین مربعات (MS)					
منابع تغییرات	درجه آزادی	کاتالاز ریشه	کاتالاز اندام هوایی	TBARM ریشه	TBARM اندام هوایی	پرولین ریشه	پرولین اندام هوایی
سطح شوری	۱	۹۲/٦٤**	٥٠/٧٦**	٢٤٨٨٥**	١٣٢٨٢**	٦٨٢٥١/٥٦**	٣٧٨٣٠/٢٥**
رقم	۱	٦٨/٤٧**	٦٩/٣٠**	٤٣٨٩**	٣٣/٣٥**	١٢٩٠٦٠/٥٦**	٤٣٦٨١**
سطح شوری × رقم	۱	١/٦٢**	٣/٩٠**	٤٣٨٩**	٢١/٣٩**	٥٠٩٦٣/٠٦**	٢٢٩٥٢**
خطا	۱۲	٠/١٠	٠/٠٩	٠/١٧	٠/٠٥	٣٣/٠٦	٦٤/٢٩

** در سطح یک درصد معنی‌دار است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-19]

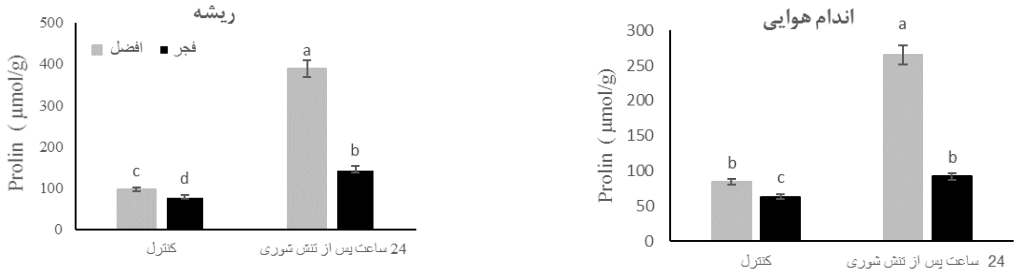


شکل ۱- میزان سطح شاخص اکسیداسیون (TBARM) و فعالیت آنزیمی کاتالاز تحت شرایط کنترل و ۲٤ ساعت پس از اعمال تنش شوری ($EC= 22\ ds/m^{-1}$) در ارقام حساس (فجر) و متحمل (افضل) جو. حروف متفاوت باهم اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد دارند.

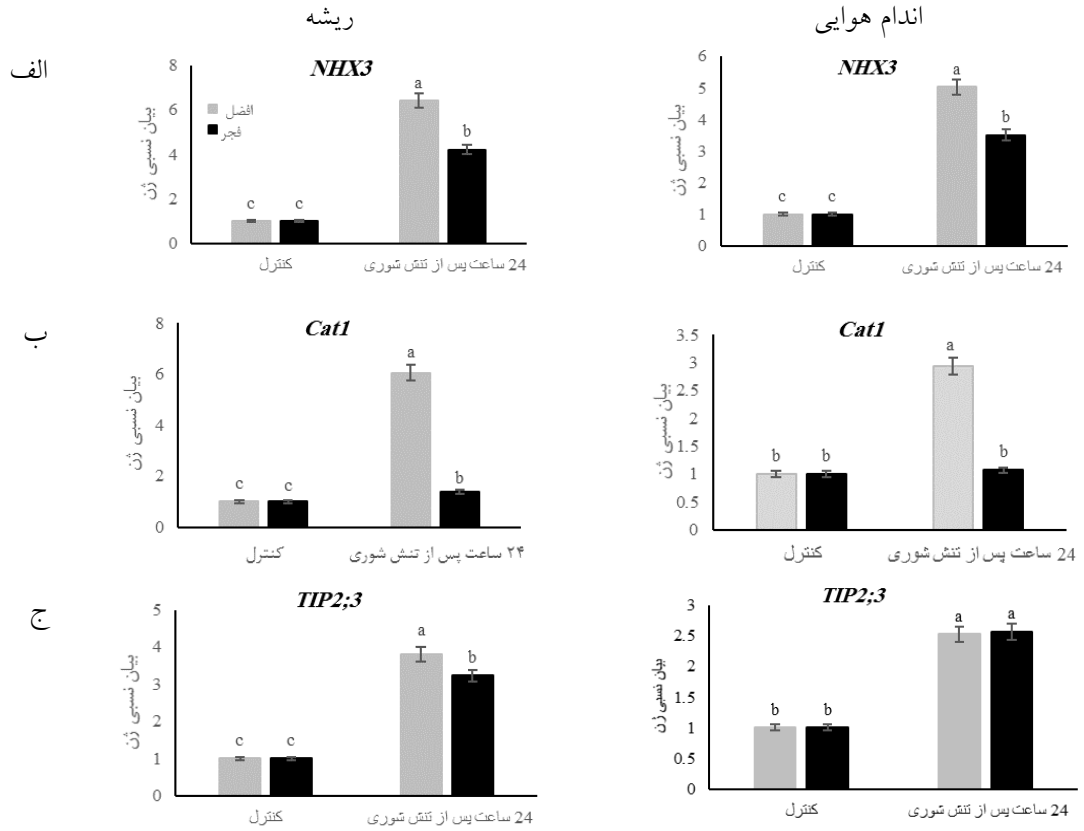
میزان محتوای پرولین در ریشه و اندام هوایی در مرحله گیاهچه‌ای در ارقام تحت تنش شوری افزایش یافته اما محتوای پرولین در رقم متحمل به تنش شوری به میزان قابل توجهی افزایش یافته است (شکل ۲). مطالعات پیشین نیز نشان داده است که میزان پرولین تحت تنش شوری در جو افزایش می‌یابد و مقدار آن در ارقام محتمل بیشتری از ژنوتیپ‌های حساس است (Liaqat et al. 2020; Mariey et al. 2018; Unal et al. 2014). به‌نظر می‌رسد رقم محتمل از سازوکار تجمع محلول‌های سازگار در مقابله با تنش شوری نیز بهره می‌برد.

بررسی بیان نسبی ژن‌های *NHX3*، *TIP2;3* و *Catalase1* (*Cat1*) در پاسخ به تنش شوری رقم حساس و متحمل مورد مطالعه قرار گرفت. در گیاهان، آنتی پورترهای Na^+/H^+ غشای پلاسمایی و Na^+/H^+ واکوئولی در حفاظت از سیتوزول در برابر مقادیر بالای NaCl نقش دارند (Apse et al. 1999; Qiu et al. 2003). بین بیان ژن رمزکننده آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ و تحمل به شوری در گیاهان همبستگی مثبت مشاهده شده است (Saqib et al. 2005; Wu et al. 2004). NHX3، یک آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکوئولی است که تحت تنش شوری فعال شده و در ریشه و برگ گیاهچه‌های جو بیان می‌شود (Roslyakova et al. 2009) و *NHX3* در ریشه نسبت به اندام هوایی تحت تنش شوری، بیشتر بیان شده است (Ligaba and Katsuhara 2010). الگوی نسبی بیان ژن *NHX3* نشان داد که بیان این ژن در اندام هوایی و ریشه در مرحله گیاهچه‌ای در هر دو رقم تحت تنش شوری ($EC= 22\ ds/m^{-1}$) افزایش می‌یابد اما میزان افزایش در رقم متحمل (افضل) به مراتب بیشتر از رقم حساس (فجر) بود (شکل ۳-الف). همچنین، این ژن در ریشه به نسبت اندام‌های هوایی بیشتر بیان شده است. بر اساس الگوی بیان *NHX3*، به‌نظر می‌رسد که تجمع Na^+ در واکوئل‌های رقم متحمل خصوصا در ریشه بیشتر از رقم حساس بوده که منجر به تحمل به تنش شوری در رقم افضل شده است. ژن‌های *CAT* آنزیم‌های کاتالاز را رمزگذاری می‌کنند که این آنزیم‌ها به‌عنوان عوامل جمع‌آوری کننده ROS تحت تنش‌های محیطی ایفای نقش می‌کنند (Fath et al. 2002). فعالیت *CAT1* در ریشه و اندام هوای گیاهچه‌های جو و برنج تحت تنش شوری افزایش می‌یابد (Khan and Hemalatha 2016; Kim et al. 2005). الگوی بیان ژن *CAT1* در افضل نشان داد که بیان این ژن تحت تنش شوری در ریشه و اندام‌های آن به شدت افزایش می‌یابد در حالی‌که میزان تغییرات بیان این ژن در ریشه رقم فجر ناچیز بوده و تفاوت معنی‌داری در اندام‌های گیاهچه‌های تیمار نشده با گیاهچه‌های تیمار شده با NaCl مشاهده نشد (شکل ۳-ب).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-19]



شکل۲- محتوای پرولین تحت شرایط کنترل و ۲٤ ساعت پس از اعمال تنش شوری (EC= 22 ds/m^{-1}) در رقم حساس (فجر) و متحمل (افضل) جو. حروف متفاوت باهم اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد دارند.



شکل ۳- بررسی بیان نسبی ژن‌های *NHX3*، *TIP2;3* و *Cat1* تحت تنش شوری (EC= 22 ds/m^{-1}) در رقم متحمل (افضل) و حساس (فجر). حروف متفاوت باهم اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد دارند.

بر اساس بیان بالای ژن *CAT1* و فعالیت آنزیمی آن (شکل ۱ و ۳- ب) در رقم متحمل، به‌نظر می‌رسد که ROS تولیده شده در تنش شوری در رقم متحمل به سرعت و شدت بیشتری سم‌زدایی می‌شود.

TIPها یکی از زیر خانواده آکواپورین‌ها هستند که انتقال آب و مولکول‌های کوچک را در غشای سلولی تنظیم می‌کنند و بیان آن‌ها تحت تنش‌های خشکی و شوری تغییر می‌کند (Brown 2020 ;Kurowska 2017). نتایج نشان داد که بیان *TIP2;3* در ریشه و اندام هوایی هر دو رقم تحت تنش شوری به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و میزان تغییرات در ریشه‌های آن‌ها نسبت به اندام‌های هوایی بالاتر بود. همچنین، تفاوت معنی‌داری از لحاظ بیانی در اندام‌های هوایی ارقام در مقایسه باهم مشاهده نشد اما بیان این ژن در ریشه در رقم متحمل بالاتر بود (شکل-۳ ج). Salami et al. (2017) نیز گزارش کردند که بیان ژن *TIP2;3*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-19]

در ریشه رقم متحمل بیشتر از رقم حساس تحت تنش شوری بود. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که رقم متحمل با با افزایش بیان *HvTIP2* تحمل به تنش شوری را بهبود می‌بخشید.

نتیجه‌گیری کلی

تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار میزان TBARM، فعالیت آنزیم کاتالاز و محتوی پرولین در مرحله گیاهچه ارقام جو شد و میزان این تغییرات در بافت ریشه به‌دلیل درک زودتر تنش شوری در مقایسه با اندام هوایی بیشتر بود. با توجه به این امر که کمترین سطح TBARM و بالاترین میزان کاتالاز و پرولین در رقم افضل (محتمل) تحت تنش شوری مشاهده شد، به‌نظر می‌رسد که سطح اکسیداسیون لیپیدهای غشایی آن نسبت به رقم حساس (فجر) کمتر است و رقم محتمل از سازوکار تجمع محلول‌های سازگار و دفاع آنتی‌اکسیدانی در مقابله با تنش شوری بهره می‌برد. همچنین الگوی بیان ژن در رقم متحمل تحت تنش شوری نشان داد که *NHX3*، *CAT1* و *TIP2;3* در تحمل جو به تنش شوری نقش دارند و به‌نظر می‌رسد که رقم متحمل با با افزایش بیان این ژن‌ها تحت تنش شوری، تحمل به تنش شوری در گیاه را بهبود می‌بخشید.

منابع

Abbas ZK (2018) Sodium nitroprusside improves performance of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. Biosciences Biotechnology Research Asia 15:603-610.

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na+/H+ antiport in Arabidopsis. Science, 285:1256-1258.

Banerjee A, Ghosh P, Roychoudhury A (2019) Salt acclimation differentially regulates the metabolites commonly involved in stress tolerance and aroma synthesis in indica rice cultivars. Plant Growth Regulation, 88:87-97.

Bartels D, Sunkar R (2007) Drought and Salt Tolerance in Plants 17:52-57.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil: 39:205-207.

Bertazzini M, Sacchi G A, Forlani G (2018) A differential tolerance to mild salt stress conditions among six Italian rice genotypes does not rely on Na+ exclusion from shoots. Journal of Plant Physiology 226:145-153.

Blumwald E (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. In Current Opinion in Cell Biology 12:431-434.

Bohnert HJ, Sheveleva E (1998) Plant stress adaptations--making metabolism move. Current Opinion in Plant Biology 1:26-274.

Brown D (2017) The discovery of water channels (aquaporins). Annals of Nutrition and Metabolism 70:37-42.

Cheeseman JM (2015) The evolution of halophytes, glycophytes and crops, and its implications for food security under saline conditions. New Phytologist 206:557-570.

El-Esawi MA, Alaraidh IA, Alsahli AA, Ali HM, Alayafi AA, Witczak J, Ahmad M (2018) Genetic variation and alleviation of salinity stress in barley (Hordeum vulgare L.). Molecules: 23:2488.

Fath A, Bethke P, Beligni V, Jones R 2002. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. Journal of Experimental Botany 53:1273-1282.

Frank W, Munnik T, Kerkmann K, Salamini F, Bartels D (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant Craterostigma plantagineum. Plant Cell 12:111-123.

Glenn EP (1997) Mechanisms of salt tolerance in higher plants. Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants.

Hagege D, Nouvelot A, Boucaud J, Gaspar T (1990) Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. Phytochemical Analysis 1:86-89.

Khan MS, Hemalatha S (2016) Biochemical and molecular changes induced by salinity stress in Oryza sativa L. Acta Physiologiae Plantarum 38:1-9.

Kim SY, Lim JH, Park MR, Kim YJ, Park TI, Seo YW, Choi KG, Yun SJ (2005) Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. BMB Reports 38:218-224.

Kurowska MM (2020). TIP Aquaporins in Plants: Role in Abiotic Stress Tolerance. Abiotic Stress in Plants.

Liaqat S, Umar S, Saffeullah P, Iqbal N, Siddiqi TO, Khan MIR (2020) Protective Effect of 24-Epibrassinolide on Barley Plants Growing Under Combined Stress of Salinity and Potassium Deficiency. Journal of Plant Growth Regulation 39:1543-1558.

Ligaba A, Katsuhara M (2010) Insights into the salt tolerance mechanism in barley (Hordeum vulgare) from comparisons of cultivars that differ in salt sensitivity. Journal of Plant Research 123:105-118.

Ludwig AA, Romeis T, Jones JDG (2004) CDPK- mediated signalling pathways: specificity and cross- talk. Journal of Experimental Botany 55:181-188.

Mariey SA, Mohamed AM, Ali HG (2018) Effect of salinity stress on physiological and biochemical traits of barley cultivars. Int. J. Environ 7:65-77.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-19]

Maurel C (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. Annual Review of Plant Biology 48:399-429.
Mishra A, Tanna B (2017) Halophytes: potential resources for salt stress tolerance genes and promoters. Frontiers in Plant Science 8:829.
Munns R, James RA, Läuchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. Journal of Experimental Botany 57:1025-1043.
Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59:651-681.
Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. Trends in Plant Science 10:339-346.
Nohtani H, Mahdinezhad N (2020). Evaluation of salinity stress tolerance based on biochemical and morphophysiological characteristics of some wheat cultivars. Iranian Journal of Seed Sciences and Research 7:55-67.
Nouri H, Navabpour S, Yamchi A, Zeyaee F (2015) Differential response of parent and advanced mutant lines of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Tabasi) genotypes in antioxidant activity to salinity stress at seedling stage. International Journal of Biosciences 6:133-147.
Oprica L, Grigore MN, Caraciuc I, Gherghel D, Mihai CT, Vochita G (2020) Impact of Proton Beam Irradiation on the Growth and Biochemical Indexes of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings Grown under Salt Stress. Plants 9:1234.
Paul D, Lade H (2014) Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. Agronomy for Sustainable Development 34:737-752.
Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2009) REST 2009 Software User Guide: For gene expression analysis using real-time Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. December 1-28.
Polash MAS, Sakil MA, Hossain MA (2019) Plants responses and their physiological and biochemical defense mechanisms against salinity: A review. Trop. Plant Res 6:250-274.
Qiu QS, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Zhu JK, Schumaker KS (2003) Na+/H+ exchange activity in the plasma membrane of Arabidopsis. Plant Physiology 132:1041-1052.
Roslyakova TV, Lazareva EM, Kononenko NV, Babakov AV (2009) New isoform HvNHX3 of vacuolar Na+/H+-antiporter in barley: Expression and immunolocalization. Biochemistry (Moscow) 74:549-556.
Rozen S (1998) Primer3. Bioinformatics methods and protocols 365-386.
Sahafi SS, Moussavi Nik SM, Tabatabaee SA, Sabbagh SK, Ghanbari SA (2021) Evaluation of sensitive and tolerant cultivars of barley to salt stress using tolerance indices in central regions of Iran. Journal of Crop Production 14:103-122. (In Fasi).
Salami R, Mohammadi SA, Ghaffariyan S, Moghaddam M (2017) Evaluating the expression of Hv TIP2; 3 and Hv TIP4; 1 in barley genotypes under different levels of salinity stress. Indian J. Genet 77:524-530.
Saqib M, Zörb C, Rengel Z, Schubert S (2005) The expression of the endogenous vacuolar Na+/H+ antiporters in roots and shoots correlates positively with the salt resistance of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Science 169:959-965.
Sarkar RK, Mahata KR, Singh DP (2013) Differential responses of antioxidant system and photosynthetic characteristics in four rice cultivars differing in sensitivity to sodium chloride stress. Acta Physiologiae Plantarum 35:2915-2926.
Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols 3:1101-1108.
Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology 3:217-223.
Sinha AK (1972) Colorimetric assay of catalase. Analytical Biochemistry 47:389-394.
Szabados L, Savouré A (2010). Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science 15:89-97.
Unal BT, Aktas LY, Guven A (2014) Effects of salinity on antioxidant enzymes and proline in leaves of barley seedlings in different growth stages. Bulg. J. Agric. Sci 20:883-887.
Vierling E (1991) The roles of heat shock proteins in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42:579-620.
Wang W, Vinocur B, Planta AA (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Springer 218:1–14.
Wani SH, Kumar V, Khare T, Guddimalli R, Parveda M, Solymosi K, Suprasanna P, Kishor PBK (2020) Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. Planta 251:1-29.
Wu CA, Yang GD, Meng QW, Zheng CC (2004) The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na+/H+ antiporter plays an important role in salt stress. Plant and Cell Physiology 45:600-607.
Yadav SS, Hunter D, Redden B, Nang M, Yadava DK, Habibi AB (2015) Impact of climate change on agriculture production, food, and nutritional security. Crop Wild Relatives and Climate Change 1-23.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-19]