



بررسی بیان ژن NHX در گیاه گلرنگ تحت تنش شوری

علی سعیدپور^۱، حمید رضا کاوسی^{۲*}، قاسم محمدی نژاد^۳، سارا خسروی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

^۲ استادیار بخش بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان.

^۳ دانشیار بخش زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان.

^۴ دانشجوی کارشناسی ارشد بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۲۳

چکیده

گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) از خانواده آفتابگردان (*Asteraceae*) می‌باشد. به دلیل مقاومت بالای گلرنگ در مقابل تنش‌های محیطی، می‌توان از آن به عنوان گیاه مدل جهت مطالعه اساس مولکولی تحمل به تنش‌ها استفاده نمود. در گیاهان یک مکانیزم عمده در ترابری Na^+ سیتوسولی و کاهش اثرات سمی آن وجود دارد که باعث جایگذاری مقادیر اضافی یون‌های سدیم در واکوئل‌ها یا بافت‌هایی با حساسیت کمتر می‌شود که این کار توسط آنتی پورتر غشای واکوئلی (NHX) صورت می‌گیرد. در این تحقیق الگوی بیان ژن NHX در گیاه گلرنگ تحت تنش شوری با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور گیاهچه‌های ۱۴ روزه رقم نیمه مقاوم PBR-321 گلرنگ با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مورد تیمار قرار گرفتند. نمونه برداری از گیاهان شاهد و تیمار شده ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش صورت گرفت. نتایج حاصل از آنالیز مولکولی نشان داد که میزان بیان ژن NHX در تمام غلظت‌های بررسی شده در ساعات مختلف نمونه‌گیری در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاه شاهد افزایش قابل توجهی نشان داد. حداکثر میزان بیان ژن در ساعات مختلف در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده گردید. نتایج کلی نشان دهنده نقش ژن کدکننده آنتی پورتر غشاء واکوئلی در پاسخ گیاه گلرنگ نسبت به تنش شوری می‌باشد.

کلمات کلیدی: گلرنگ، آنتی پورتر واکوئلی، کلرید سدیم، RT-PCR نیمه کمی.

مکانیسم‌های پیچیده پاسخ دهنده گیاهان به تنش-ها را فراهم می‌کنند (Salekdeh & Komatsu, 2007).

تبادل غلظت‌های درون سلولی برای فیزیولوژی سلول‌های زنده فرایند اساسی می‌باشد و تنظیم به موقع جریان یونی برای پایین نگه داشتن غلظت یون‌های سمی و تراکم یون‌های ضروری در درون سلول‌ها ضروری است. گیاهان تحت تنش شوری، غلظت‌های بالای یون K^+ و غلظت‌های پایینی از Na^+ را در سیتوسول حفظ می‌نمایند. در واقع حفظ نسبت بالای K^+/Na^+ از عناصر اصلی تحمل به شوری در گیاهان محسوب می‌شود (Aharon et al., 2003). مقادیر اضافی یون‌های سدیم به دلیل اثرات مخرب آن بر روی فعالیت آنزیم‌ها، فتوسنتز و متابولیسم برای گیاهان مضر می‌باشد (Niu et al., 1995). در گیاهان یک مکانیزم عمده در ترابری Na^+ سیتوسولی و کاهش اثرات سمی آن وجود دارد که باعث جایگذاری مقادیر اضافی یون‌های سدیم در واکوئل‌ها یا بافت‌هایی با حساسیت کمتر می‌شود و این کار بوسیله فعالیت گروه آنتی-پورترهای Na^+/H^+ مربوط به زیر خانواده IC-NHE/NHX که در تونوپلاست قرار دارند، انجام می‌شود. ژن‌های NHX آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکوئلی را کد می‌کنند که ترابری Na^+ بواسطه H^+ از عرض غشای واکوئلی و تجمع Na^+ در واکوئل‌ها را کاتالیز می‌کنند (Nass et al., 1997). شیب الکتروشیمیایی H^+ تولید شده بوسیله دو پمپ H^+ : H^+ -pyrophosphatase و واکوئلی (-V-

شوری خاک یکی از عمده‌ترین تنش‌های غیر زیستی کاهش‌دهنده تولیدات کشاورزی در جهان است. حدود یک‌سوم از زمین‌های کشاورزی جهان بطور قابل ملاحظه‌ای شور هستند. علاوه بر این، سالانه حدود ۲ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی جهان (حدود ۱٪) تبدیل به زمین‌هایی می‌شوند که فاقد کارایی برای تولید محصول هستند یا تولید محصول در آنها کاهش می‌یابد (Manchanda & Grag, 2008). اثرات شوری روی گیاهان پیچیده می‌باشد. نمک زیاد در خاک باعث کاهش پتانسیل آب می‌شود و در نتیجه جذب آب و مواد غذایی برای گیاه مشکل می‌شود. همچنین برهم خوردن توازن یونی ناشی از کاهش جذب یون‌های ضروری و انباشتگی یون‌های مضر و سمیت یونی در نهایت باعث کاهش رشد گیاه می‌شود (Mahajan & Tureja, 2005; Moons et al., 1995). مکانیسم‌های مولکولی دخیل در فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر تنش‌های مختلف پیچیده هستند. به علت مقاومت بالای گلرنگ به شرایط تنش‌زای محیطی، دانشمندان از آن به عنوان یک گیاه مدل جهت بررسی و درک مکانیسم‌های دفاعی و شناسایی آن‌ها و مسیرهای کلیدی دخیل در پاسخ به تنش‌های محیطی استفاده می‌کنند. از این رو جداسازی و شناسایی ژن‌های دخیل در ایجاد تحمل به تنش و بررسی الگوی بیان آن‌ها در کنار مطالعات پروتئومیکسی و فیزیولوژیکی امکان شناسایی بهتر

باغبانی دانشگاه شهید باهنر در شرایط طبیعی مقاومت خوبی از خود نشان داد. بذور گلرنگ با الکل اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه و متعاقباً به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی گردیده و ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور پس از ۲ ساعت سرمادهی مرطوب، درون پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی استریل کشت شدند. بذور جوانه‌زده به گلدان‌های به قطر ۱۵ سانتی‌متر حاوی شن شسته منتقل گردیدند. گلدان‌ها در گلخانه تحت شرایط دمایی 26 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/نور) با دوره آبیاری ۲ روز در میان قرار گرفتند و تغذیه با محلول هوگلند (شرکت زیتون طلایی) از سن ۷ روزگی شروع گردید. اعمال تنش شوری روی گیاهان در مرحله ۳ الی ۴ برگی (۱۴ روزگی) در صبح زود انجام شد. تیمارها در ۵ گروه در نظر گرفته شدند که این گروه‌ها شامل آب مقطر، محلول ۵۰ میلی-مولار کلریدسدیم، محلول ۱۰۰ میلی-مولار کلریدسدیم، محلول ۱۵۰ میلی-مولار کلریدسدیم و محلول ۲۰۰ میلی-مولار کلریدسدیم بودند. نمونه برداری از گیاهان تحت تنش در ۵ زمان شامل صفر (زمان اعمال تیمار)، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش صورت گرفت.

طراحی آغازگرهای رفت 5'- TAC CGA -3' و برگشت 5'- CCG AGA AGT TGC -3' که CAT AAG ACCAGC CCA CCA -3' قطعه‌ای به اندازه ۴۳۹ جفت‌باز را تکثیر می‌کند، بر اساس توالی ژن NHX گیاه گلرنگ در بانک

واکوئلی (V-ATpase)، H^+ -ATPase و (ppase) نیروی محرک لازم را برای جایگزینی یون‌ها و دیگر محلول‌ها را در واکوئل‌ها فراهم می‌نماید (Sze et al., 1992). جایگزینی Na^+ در واکوئل علاوه بر پایین آوردن غلظت این یون در سیتوسول، در تنظیم اسمزی برای حفظ جذب آب از محلول نمک نیز دخالت دارد. به دلیل انباشته کردن یون‌های سدیم در واکوئل‌ها، ژن-های NHX در گیاهان به طور عمده در تحمل به شوری دخالت دارند (Apse & Blumwald, 2002; Tester & Devenport, 2003).

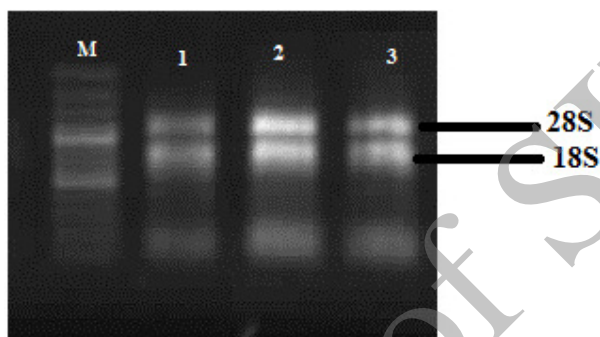
جهت بررسی الگوی بیان ژن‌ها در سطح mRNA روش‌های مختلفی وجود دارد که به طور کلی می‌توان آنها را به دو دسته روش‌های مبتنی بر PCR همانند RT-PCR نیمه کمی و تکنیک‌های مبتنی بر دورگ‌سازی همانند نوردن‌بلات، درشت آرایه و ریز آرایه تقسیم بندی نمود (Lorkowski & Cullen, 2003). در سال‌های اخیر با در اختیار داشتن روش‌های فوق، و به منظور درک روشنتری از نقش ژن‌های مختلف در پاسخ به تنش‌های مختلف توجه برخی از محققین به مقایسه الگوی بیان ژن‌ها در گیاهان متحمل و حساس به تنش‌های محیطی مختلف جلب شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از بذور گلرنگ رقم PBR-321، اهدایی توسط دکتر قاسم محمدی‌نژاد، بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید باهنر کرمان استفاده گردید. این رقم طی تحقیقات

آلودگی احتمالی به DNA ژنومی، از آنزیم DNase1 شرکت فرمتناز استفاده گردید. پس از تیمار RNA با آنزیم DNase1، یک میکروگرم RNA وارد فرآیند ساختن cDNA گردید و مراحل بر اساس دستورالعمل موجود در کیت Reverse Aid First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت فرمتناز انجام شد.

ژن NCBI و با استفاده از نرم افزار Primer Premier v.3.5 انجام شد. RNA کل با استفاده از کیت RNXTM plus شرکت سیناکلون از گیاهان تحت تنش و گیاهان شاهد استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانو دراپ تعیین گردید (شکل ۱). جهت حذف



شکل ۱ - الکتروفورز RNA استخراج شده از بافت برگ گیاه گلرنگ بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. M: نشانگر وزن مولکولی 100bp (Fermentas).

Figure 1- Electrophoresis of extracted RNA from safflower leaf tissue on 1% agarose gel. M: DNA ladder 100bp (Fermentas).

شد. پس از پایان واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری و تحت ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و عکس برداری از آن با استفاده از دستگاه ژل داک انجام شد. تصاویر ژل با استفاده از برنامه Total Lab v1.10 کمی شدند. بدین منظور شدت باندهای ژن کنترل داخلی (18S rRNA) و شدت ژن NHX نسبت به باند ۳۰۰۰ مارکر 100bp که معادل ۲۰ نانوگرم در لیتر بود، سنجیده شد. پس

واکنش های RT-PCR نیمه کمی در حجم ۲۵ میکرولیتر و با دو تکرار انجام شد. از آغازگرهای اختصاصی 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. اجزای مخلوط واکنش شامل مواد مشروح در جدول ۱ می باشد. سیکل دمایی استفاده شده در واکنش SQ-RT-PCR مربوط به ژن کنترل داخلی و ژن NHX دقیقاً مشابه و به صورت زیر بود. ۵ دقیقه در ۹۴°C و متعاقب آن ۴۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در ۶۶°C، ۱ دقیقه در ۷۲°C و تکثیر نهایی نیز به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°C انجام

از تقسیم عدد مربوط به باند ژن NHX بر باند مربوط به ژن کنترل داخلی، تمام نمونه‌ها نرمال شدند. نمودارهای مربوط به شدت بیان ژن NHX با استفاده از برنامه Excel رسم گردید.

جدول ۱- مقدار مواد مورد استفاده در هر PCR.

Table 1- The amount of material used in each PCR reaction.

Amount مقدار	Substance نوع ماده
10 μ l	PCR Master mix (fermentase) 2x مسترمیکس
1 μ l	DNATemplate (100 ng μ l ⁻¹) DNA الگو
1 μ l	Forward primer (10 pmol μ l ⁻¹) آغازگرفت
1 μ l	Reverse primer (10pmol μ l ⁻¹) آغازگر برگشت
7 μ l	DEPC water آب مقطر
20 μ l	Total volume حجم نهایی

نتایج و بحث

(۱.۷۸ برابر) با افزایش میزان غلظت از ۱۵۰ به ۲۰۰ میلی مولار میزان بیان ژن کاهش نشان داد (شکل ۴) که نمودار رسم شده در Excel نیز همین روند را نشان داد (شکل ۲). ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش میزان بیان ژن در تمام غلظت-ها نسبت به گیاه شاهد افزایش بیان نشان دادند و بیشترین میزان بیان در گیاهان تحت تنش در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار مشاهده گردید (به ترتیب ۱/۷۳ و ۱/۹۹ برابر نسبت به گیاه شاهد). در اینجا نیز در غلظت ۲۰۰ میلی مولار میزان بیان ژن NHX نسبت به زمان ۱۲ ساعت کاهش یافت (شکل ۲ و ۳).

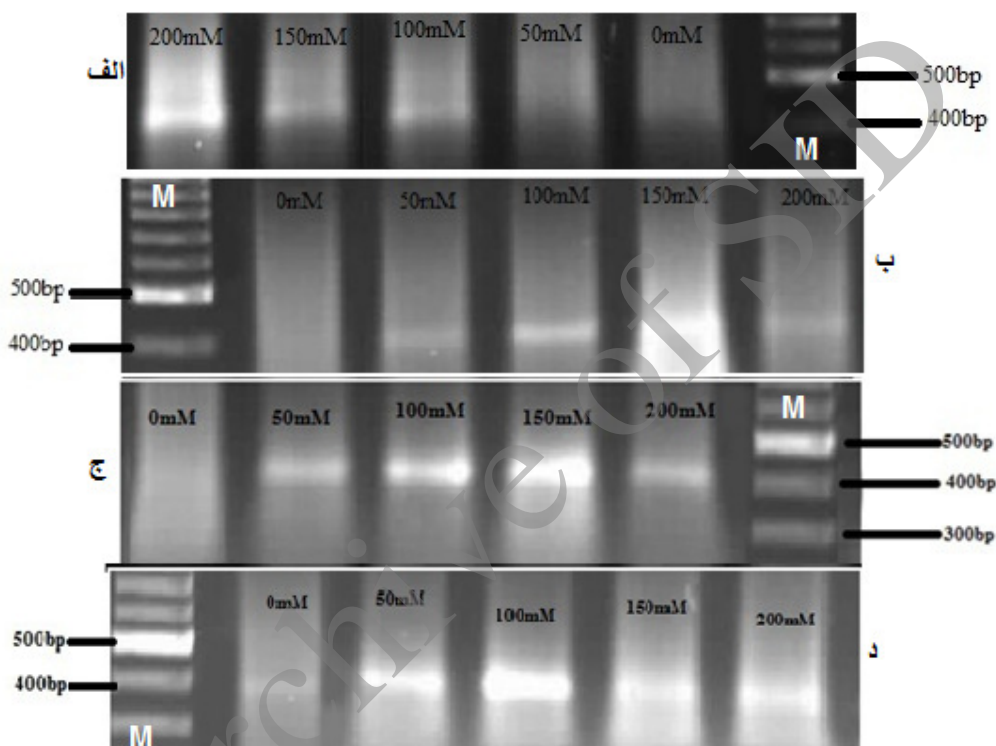
همچنین ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش، میزان بیان ژن NHX در تمام غلظت‌ها نسبت به گیاه شاهد افزایش چشمگیری داشتند. حداکثر میزان بیان در این زمان در غلظت ۱۰۰ میلی مولار

نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی نشان داد که میزان بیان ژن NHX، ۶ ساعت پس از اعمال تنش در تمام غلظت‌ها نسبت به گیاهان شاهد افزایش چشمگیری داشت و بیشترین میزان بیان (۲/۴۸ برابر) در غلظت ۲۰۰ میلی مولار مشاهده گردید (شکل ۲). نمودار رسم شده در Excel با استفاده از داده‌های بدست آمده از نرم-افزار Total lab نشان می‌دهد که میزان بیان با افزایش غلظت افزایش یافته و این روند صعودی را نشان می‌دهد (شکل ۲). نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی نشان داد که ۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش نیز میزان بیان ژن NHX در گیاه تحت تنش نسبت به گیاه شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌داد و بیشترین میزان بیان نیز در غلظت ۱۵۰ میلی مولار مشاهده گردید

است (Gaxiola et al., 1998; Hamada et al., 2001; Zahran et al., 2007). در تحقیق حاضر میزان بیان ژن NHX در گیاه گلرنگ ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش افزایش چشمگیری نسبت به گیاه شاهد نشان داد. همچنین در تمام زمانهای بررسی شده

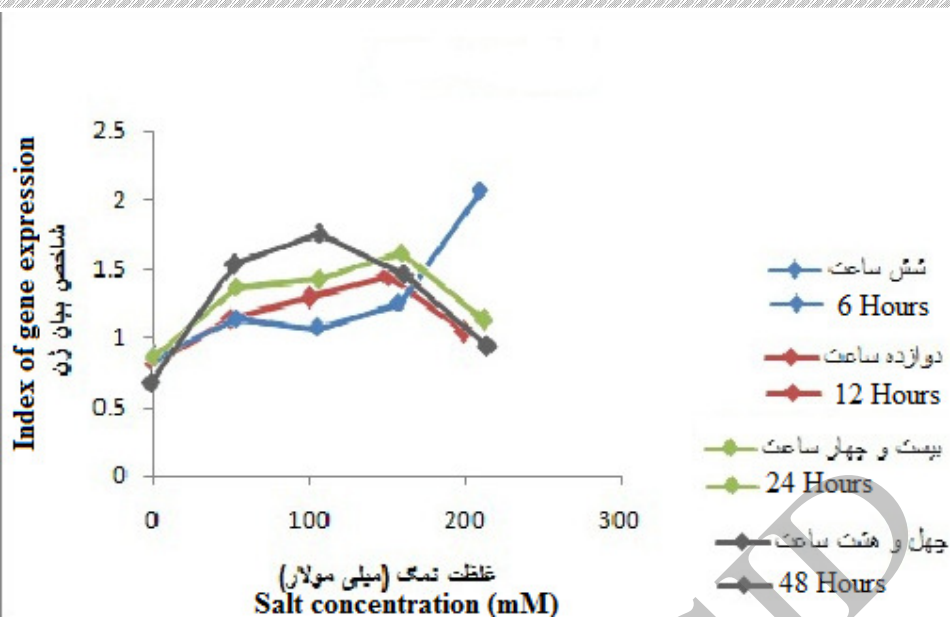
مشاهده گردید (۲/۴۸ برابر) و در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نسبت به ۲۴ ساعت میزان بیان ژن کاهش یافت (شکل ۲ و ۳).

در گیاهان آراییدوپسیس، برنج، *Atriplex*، *gmellini*، باقلا و گوجه نیز افزایش بیان ژن NHX پس از اعمال تنش شوری گزارش شده



شکل ۲- نتایج RT-PCR نیمه کمی ژن NHX در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم. M: نشانگر وزن مولکولی 100bp (Fermentas). (الف): ۶ ساعت پس از اعمال تنش. (ب): ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش. (ج): ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش. (د): ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش.

Figure 2- Semiquantitative RT-PCR results of NHX gene in different concentrations of sodium chloride. M: DNA ladder 100bp (Fermentas). (a) 6 hours after stress. (b) 12 hours after stress. (c) 24 hours after stress. (d) 48 hours after stress.



شکل ۳- فراوانی نسبی mRNA ژن NHX گلرنگ در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم.

Figure 3- Relative abundance mRNA of Safflower NHX gene in different concentrations of sodium chloride.

مذکور حاکی از افزایش بیان ژن کدکننده آنتی-پورتر غشاء واکوئلی در پاسخ به تنش شوری بود که نشان دهنده اهمیت این آنتی-پورتر در مکانیسم تحمل به نمک در گیاه گلرنگ می‌باشد.

حداکثر میزان بیان ژن در غلظت ۱۵۰mM بعد از این غلظت، با افزایش میزان نمک شدت بیان کاهش نشان داد، هر چند هنوز نسبت به گیاه شاهد افزایش بیان دیده می‌شد. بررسی الگوی بیان ژن NHX در گیاه گلرنگ با استفاده از روش

منابع

- Aharon GS, Apse MP, Duan SH, Hua X, Blumwald E (2003). Characterization of a family of vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* 00: 245–256.
- Apse MP, Blumwald E (2002). Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 146-150.
- Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD, Fink GR (1998). The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 4046–4050.
- Hamada A, Hibino T, Nakamura T, Takabe T (2001). Na⁺/H⁺ antiporter from *Synechocystis* species PCC 6803, homologous to SOS1, contains an aspartic residue and long C-terminal tail important for the carrier activity. *Physiologia plantarum* 125: 437–446.
- Lorkowski S, Cullen P (2003). Analysing gene expression. A hand book of methods possibilities and Pitfalls. Wiley-VCH Verlag, GmbH & Co., Kga, Weinheim, Germany, Vols. 1–2, pp. 950

- Mahajan S, Tuteja N (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444: 139-158.
- Manchanda G, Gerag N (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. Acta Physiologiae Plantarum 30: 595-618.
- Moons A, Bauw G, Montagu MV, Stratent VD (1995). Molecular and physiological salt tolerance of indica rice varieties. Physiologia plantarum 107: 177-186.
- Nass R, Cunningham KW, Rao R (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Journal of Biological Chemistry 272: 26145-26152.
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995). Ion Homeostasis in NaCl stress environments. Physiologia plantarum 109: 735-742.
- Salekdeh, GH, Komatsu S (2007). Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. Proteomics 7: 2976-2996.
- Sze H, Ward JM, Lai S (1992). Vacuolar-H⁺-ATPases from plants. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 24: 371-381.
- Tester M, Davenport R (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. Annals of botany 91: 503-527.
- Zahran HH, Marín-Manzano MC, Sánchez-Raya AJ, Bedmar EJ, Venema K, Rodríguez-Rosales MP (2007). Effect of salt stress on the expression of NHX-type ion transporters in *Medicago intertexta* and *Melilotus indicus* plants. Physiologia plantarum 131: 122-30.

Gene Expression Analysis of NHX to Salinity stress in Safflower (*CarthamustinctoriusL.*)

Saeedpour A.¹, Kavousi H.R.*², MohamadiNejad GH.³, Khosravi S.⁴

¹MSc student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, ShahidBahonar University of Kerman, Iran.

²Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, ShahidBahonar University of Kerman, Iran.

³Associate Professor, Department of agronomy and plant breeding, Faculty of Agriculture, ShahidBahonar University of Kerman, Iran.

⁴MSc student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, ShahidBahonar University of Kerman, Iran.

Abstract

Safflower (*Carthamustinctorius L.*) belongs to the Asteraceae family and its high resistance to environmental stresses, caused it can be used as a model plant for investigating the molecular basis of stress tolerance. There is a major mechanism in the plants to transfer cytosol Na⁺ reducing its toxic effects. In this mechanism the excess of Na⁺ was pumped in the vacuoles or tissues with less sensitive. This displacement was carried by vacuole antiporter (NHX). In this study, the pattern of NHX expression was studied in safflower under salt stress by using semiquantitative RT-PCR. In this experiment, 14-days-old plants of resistant variety of safflower, PBR-321, were subjected to NaCl treatment (with five concentrations of 50, 100, 150 and 200mM). Sampling of control and treated plants were performed at different time points (6, 12, 24 and 48 hours) after all four salt treatments. The results showed that expression rate of NHX gene increased in all concentrations at different times than control plant. Maximum expression levels at different times were observed in 150mM of Sodium chloride. Totally, NHX antiporter has important role in response to salt stress in safflower.

Key words: Safflower, Sodium chloride, Vacuole antiporter, Semiquantitative RT-PCR.

* Corresponding Author: Kavousi HR.

Tel:09155250093

Email:hrkavousi@yahoo.com