Razi University

Cereal Biotechnology and Biochemistry

Online ISSN: 2783-5170

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Cereal Biotechnology and Biochemistry

Investigating the effect of salt stress on the expression level of the SAPK2 gene from the protein kinase gene group in two tolerant and sensitive rice cultivars

Somayeh Kamrava [1], Nadali Babaeian Jellodar [2] ✉ & Nadali Bagheri [3]

[1] PhD student in Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. E-mail: kamrav.somaieh@yahoo.com

[2] ✉ Professor, Department of Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. E-mail: n.babaiean@yahoo.com

[1] Associate Professor, Department of Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. E-mail: nadalibagheri@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: Salinity is one of the unfavorable environmental factors for plants that affects their growth and fertility. Rice, as the second grain in the world after wheat, is a relatively sensitive plant to salt stress. Protein kinases are an important group of kinase enzymes that amino acids They phosphorylate a certain part in the protein structure. These enzymes play an important role in cell communication and inducing growth and proliferation messages. Therefore, the identification and evaluation of the function of protein kinase gene family genes in rice will help our understanding of the molecular mechanism of stress resistance.

Materials and methods: Examining the expression pattern of SAPK2 gene in two rice varieties tolerant and sensitive to salinity in 1400 in the research greenhouse of the Faculty of Agriculture of Lorestan University was carried out as a factorial experiment in the form of a completely randomized design in three replications. Decisions per meter and time factor were investigated at three levels (6, 12 and 24 hours after applying stress). Sampling of plant leaves at the seedling stage (5-6 leaves) was done to check the expression of SAPK2 gene and internal control gene 18srRNA. took.

Results: The results of the analysis of the gene expression pattern using Real Time PCR showed that there is no difference between the tolerant and sensitive cultivars at the salinity level of 3 ds/m and under no stress conditions, but at the levels of 6 and 9 ds/m with increasing time after applying the stress, the expression level The SAPK2 gene increases and the maximum expression of the gene was at the salinity level of 9 ds/m 24 hours after applying the stress. The level of gene expression at the salinity level of 9 in the tolerant variety was very significant compared to the sensitive variety. 12 and 24 hours after the application of stress, the gene expression in the tolerant variety was about 4 times more than the sensitive variety and 9 times more than the non-stressed condition. Also, the examination of the melting curve of SAPK2 gene in both tolerant and sensitive cultivars showed that the melting temperature is about 81 degrees Celsius.

Conclusion: With increasing salinity level, the expression level of SAPK1 gene increases in rice plants. Also, investigating the effect of time after applying stress on the level of SAPK1 gene expression showed that in the early hours after applying stress, the level of gene expression was insignificant, but with increasing time up to 24 hours, gene expression increased.

Keywords: Rice, Gene expression, Salt, Kinase.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 11/11/2022, Revised: 13/12/2022, Accepted: 24/12/2022, Published online: 26/12/2022

Cite this article: Kamrava, S., Babaeian Jellodar, N., & Bagheri, N. (2022). Investigating the effect of salt stress on the expression level of the SAPK2 gene from the protein kinase gene group in two tolerant and sensitive rice cultivars. Cereal Biotechnology and Biochemistry. 1 (4). 446-462. DOI: 10.22126/cbb.2023.8557.1025

© The Author(s).

Publisher: Razi University

10.22126/cbb.2023.8557.1025

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

بررسی اثر تنش شوری بر میزان بیان ژن SAPK2 از گروه ژنی پروتئین کیناز در دو رقم متحمل و حساس برنج

سمیه کامروا [۱]، نادعلی بابائیان جلودار [۲] ✉ و نادعلی باقری [۳]

[۱] دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ساری، ایران. رایانامه: kamrav.somaieh@yahoo.com

[۲] ✉ دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ساری، ایران. رایانامه: n.babaiean@yahoo.com

[۱] دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ساری، ایران. رایانامه: nadalibagheri@yahoo.com

چکیده

مقدمه: شوری یکی از فاکتورهای نامطلوب محیطی برای گیاهان است که رشد و باروری آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برنج به‌عنوان دومین غله جهان بعد از گندم، گیاهی نسبتاً حساس به تنش شوری است. پروتئین کینازها گروه مهمی از آنزیم‌های کیناز هستند که آمینواسیدهای مشخصی را در ساختار پروتئین فسفریله می‌کنند. این آنزیم‌ها در ارتباطات سلولی و القای پیام رشد و تکثیر نقش مهمی ایفا می‌کنند. بنابراین شناسایی و ارزیابی عملکرد ژن‌های خانواده ژنی پروتئین کیناز در برنج به درک ما درباره مکانیسم مولکولی مقاومت به تنش کمک خواهد کرد.

مواد و روش‌ها: بررسی الگوی بیان ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس به شوری برنج در سال ۱۴۰۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تنش شوری در چهار سطح شاهد، ۳، ۶ و ۹ دسی‌زیمنس بر متر و فاکتور زمان در سه سطح (۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش) بررسی شد. نمونه‌برداری از برگ گیاه در مرحله گیاهچه (۶-۵ برگی) جهت بررسی بیان ژن SAPK2 و ژن کنترل داخلی 18srRNA صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج بررسی الگوی بیان ژن نشان داد که در سطح شوری سه دسی‌زیمنس بر متر و شرایط بدون تنش، بین رقم متحمل و حساس تفاوتی وجود ندارد، اما در سطوح شش و نه دسی‌زیمنس بر متر، با افزایش زمان بعد از اعمال تنش، میزان بیان ژن SAPK2 افزایش نشان داد. حداکثر بیان ژن در سطح شوری نه دسی‌زیمنس بر متر و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش بود. همچنین بررسی منحنی ذوب ژن SAPK2 در هر دو رقم متحمل و حساس نشان داد دمای ذوب حدود ۸۱ درجه سانتی‌گراد است.

نتیجه‌گیری: با افزایش سطح شوری میزان بیان ژن SAPK1 در گیاه برنج افزایش می‌یابد. همچنین بررسی اثر زمان بعد از اعمال تنش، بر میزان بیان ژن SAPK1 نشان داد در ساعات اولیه بعد از اعمال تنش، میزان بیان ژن ناچیز بود اما با افزایش زمان تا ۲۴ ساعت، بیان ژن افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: برنج، بیان ژن، شوری، کیناز

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۰ **اصلاح:** ۱۴۰۱/۰۹/۲۲ **پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۰/۰۳، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۱/۱۰/۰۵

استناد: کامروا، س.، بابائیان جلودار، ن. و باقری، ن. (۱۴۰۱). بررسی اثر تنش شوری بر میزان بیان ژن SAPK2 از گروه ژنی پروتئین کیناز در دو رقم متحمل و حساس برنج. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات. ۱ (۴). ۴۴۶-۴۶۲. DOI: 10.22126/cbb.2023.8557.1025

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

CC BY NC

مقدمه

تنش شوری از تنش‌های مهم غیرزیستی است که اثرات زیانباری بر عملکرد گیاه و کیفیت محصول دارد. خسارت شوری در گیاهان از طریق بروز تنش‌های یونی و اسمزی است که ضمن تأثیر منفی بر عملکرد و اجزای عملکرد، بسیاری از فرآیندهای دخیل در رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Turan *et al.*, 2009). برنج به‌عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی دنیا بعد از گندم جایگاه دوم را از نظر تولید سالانه به خود اختصاص داده و غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تشکیل می‌دهد (Manzoor *et al.*, 2006). این گیاه از نظر تولید و سطح زیر کشت جایگاه عمده‌ای در تغذیه بشر دارد (Thiyagarajan *et al.*, 2005). برنج با نام علمی *oryza sativa* و نام انگلیسی rice از خانواده گرامینه (Poaceae) گیاهی خودگشن، روزکوتاه، گرمادوست و حساس به تنش شوری است و تولید آن تحت تأثیر این تنش کاهش می‌یابد (Duning *et al.*, 2007). پروتئین کینازها یک گروه مهم از آنزیم‌های کیناز هستند که پروتئین‌ها را با افزودن گروه فسفات فسفریله می‌کنند. این آنزیم‌ها در ارتباطات سلولی و القای پیام رشد و تکثیر نقش مهمی ایفا می‌کنند. پروتئین کینازها از تنظیم کننده‌های کلیدی در فرآیندهای سلولی هستند و در تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (Azad *et al.*, 2014). کینازها یا فسفوترنسفرازها آنزیم‌هایی هستند که گروه فسفات پر انرژی را از مولکول‌هایی مانند آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) به سوبستراهای خود منتقل می‌کنند. سوبسستراهای کینازها می‌توانند پروتئین، کربوهیدرات یا چربی باشند. تغییر در بیان ژن‌ها تحت تنش از مهم‌ترین اتفاقاتی است که در سلول‌های گیاهی رخ می‌دهد و منجر به پاسخ‌های بیوشیمایی و فیزیولوژیکی در گیاه تحت تنش می‌شود. بررسی بیان و نحوه تنظیم ژن‌ها یکی از ابزارهای مهم جهت اصلاح برای مقاومت به تنش در گیاهان می‌باشد (Yousfi *et al.*, 2016). برای بررسی بیان ژن‌ها تحت تنش‌های غیرزیستی، روش‌های مختلفی وجود دارد اما ابداع روش Real time PCR انقلابی را در حوزه بررسی بیان ژن در موجودات زنده به وجود آورد. در این روش، جمع‌آوری اطلاعات همزمان با پروسه PCR انجام می‌شود. بنابراین مراحل تشخیص و تکثیر در یک مرحله خلاصه می‌شود (Wang *et al.*, 2013). شناسایی و ارزیابی عملکرد ژن‌های خانواده ژنی پروتئین کیناز در برنج به درک ما درباره مکانیسم مولکولی مقاومت به تنش کمک خواهد کرد. بنابراین هدف این تحقیق، بررسی الگوی بیان ژن SAPK2 در گیاه برنج تحت تنش شوری در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دو رقم شصتک محمدی (به‌عنوان رقم متحمل) و رقم IR29 (به‌عنوان رقم حساس) در سال ۱۴۰۰ در گلخانه

تحقیقاتی دانشگاه لرستان در گلدان به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کاشته شدند. محلول شوری توسط نمک NaCl و آب مقطر با استفاده از دستگاه EC سنج تهیه و در مرحله گیاهچه (۶-۵ برگی)، تنش شوری در سه سطح ۳، ۶ و ۹ دسی‌زیمنس بر متر و شرایط کنترل (بدون تنش شوری) اعمال شد. در سه زمان مختلف (۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد ازاعمال تنش) نمونه‌برداری از برگ گیاه جهت بررسی بیان ژن صورت گرفت. از ژن‌های گروه ژنی پروتئین کیناز ژن SAPK2 که کدکننده پروتئین کیناز سرین ترئونین است، جهت بررسی الگوی بیان آن تحت تنش شوری انتخاب گردید. از ژن 18SrRNA نیز به‌عنوان ژن کنترل داخلی در این تحقیق استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر برای ژن SAPK2 با کد LOC4343944 در پایگاه داده NCBI انجام شد. بدین صورت که توالی CDS ژن به صورت FASTA را از پایگاه داده NCBI ثبت و در پایگاه داده Primer 3 کپی می‌گردد تا پرایمرهای مناسب برای ژن مورد بررسی به دست آید. بعد از بررسی تک تک توالی‌های Forward و Revers برای هر پرایمر از نظر سایز، درصد GC، دمای Tm و ... شماره اگزون‌ها از پایگاه داده ensemble به دست می‌آید. هر پرایمری که توالی Forward و Revers آن در دو اگزون متفاوت و سایز آن بین ۱۵۰ bp تا ۲۵۰ bp باشد، بهترین پرایمر برای ژن مورد نظر است. سنتز پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت تکاپوزیست تهران انجام شد (جدول ۱).

استخراج RNA

برگ انتهایی گیاهان کنترل و تحت تنش، پس از نمونه-برداری با استفاده از ازت مایع پودر و تا هنگام استخراج RNA در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس استخراج RNA از اندام‌های هوایی با استفاده از کیت استخراج RNA ستونی (Column RNA Isolation Kit) شرکت دنا زیست بر اساس پروتکل شرکت سازنده، صورت گرفت. برای بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، به ترتیب از دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. برای انجام الکتروفورز و تهیه ژل از بافر TAE 1X استفاده شد. به‌منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از RNAهای استخراجی، تیمار نمونه‌های RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI انجام گردید. جهت تأیید کیفیت RNA بعد از استخراج آن، الکتروفورز ژل آگارز یک درصد صورت گرفت. پنج میکرولیتر از RNA استخراج شده همراه با پنج میکرولیتر رنگ loading bufer در چاهک‌های ژل تزریق و به مدت حدود یک ساعت Run کردن ژل توسط دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد زمانی که به طور کامل باندها تفکیک شدند، با استفاده از دستگاه ژل داک، عکس‌برداری از ژل صورت گرفت. جهت بررسی کمیت RNA استخراج شده، غلظت نمونه‌های RNA در دستگاه نانودراپ بررسی شد. همچنین نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و طول موج ۲۶۰ به ۲۳۰ توسط دستگاه محاسبه گردید. این نسبت‌ها هر چه به ۲ نزدیک‌تر باشند،

نشان‌دهنده عدم آلودگی RNA استخراج شده به DNA، پروتئین و ... می‌باشد. پس از اندازه‌گیری غلظت RNA، از تمام نمونه‌ها غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر تهیه و از این نمونه‌های هم غلظت شده، جهت سنتز CDNA استفاده شد.

سنتز CDNA

سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز CDNA دو رشته‌ای شرکت سیناکلون بر اساس پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت و سپس کیفیت CDNA سنتز شده بررسی شد. جهت بررسی کیفیت CDNAهای سنتز شده از نمونه‌های CDNA سنتز شده، PCR با استفاده از پرایمر ژن کنترل داخلی 18S RNA و مسترمیکس PCR (Tq 2x Master Mix RED) صورت گرفت (جدول ۲). برنامه دمایی دستگاه PCR بر اساس جدول ۳ بود و محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز با استفاده از بافر TAE 1X بررسی شد. وجود باند مورد نظر روی ژل نشان‌دهنده تأیید کیفیت CDNAهای سنتز شده بود. بعد از تأیید کیفیت CDN های سنتز شده، غلظت آن‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. سپس همه نمونه‌ها جهت انجام واکنش Real Time PCR هم غلظت شدند. جهت تهیه استانداردهای واکنش Real Time PCR از یکی از تیمارها برای ژن SAPK1 واکنش PCR با استفاده از مسترمیکس PCR و پرایمرهای مربوط به ژن انجام شد (جدول ۲). برنامه دمایی دستگاه PCR بر اساس جدول ۳ بود. بعد از بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و تأیید باند مربوط به ژن، از این محصول PCR چهار استاندارد در رقت‌های (۱۰۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ نانوگرم بر میکرولیتر) تهیه شد.

انجام واکنش Real Time PCR

جهت انجام واکنش Real Time PCR نیز از مسترمیکس Real Q Plus 2x Master Mix Green و پرایمر مربوط به ژن و پرایمر ژن کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۴). برنامه دمایی دستگاه Real Time PCR نیز بر اساس جدول ۵ بود. آنالیز نتایج واکنش Real Time PCR با استفاده از روش لیواک توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ صورت گرفت.

جدول۱- پرایمر طراحی شده برای ژن مورد بررسی و ژن کنترل داخلی.

Table 1. Primer designed for the studied gene and the internal control gene.

نام ژن Gene Name	پرایمر Primer	توالی sequence	دمای ذوب Tm	سایز پرایمر Size Primer
SAPK2	Forward	GACCCTGACGAACCAAGAAA	58	194
	Reverse	CGCTCATCTGGTACTCGTCA	57.9	
18SrRNA	Forward	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA	60	86
	Reverse	ACACTTCACCGGACCATTCAA	59.9	

جدول ۲- میزان بهینه اجزاء واکنش PCR.

Table 2. The optimal amount of PCR reaction components.

اجزاء **components**	میزان **amount**
مسترمیکس PCR 2x Taq Master Mix PCR	12 میکرولیتر
پرایمر فوروارد Forward Primer	1 میکرولیتر(ازغلظت ۱۰ پیکومول)
پرایمر ریورس Forward Primer	1 میکرولیتر(از غلظت ۱۰ پیکومول)
نمونه CDNA CDNA Template	1 میکرولیتر(از غلظت ۲۰ نانوگرم برمیکرولیتر)
اب فاقد نوکلئاز Nuclease free water	10 میکرولیتر
مجموع Total	25 میکرولیتر

جدول ۳- برنامه دمایی دستگاه PCR.

Table 3. Temperature program of the PCR machine.

اجزاء **Components**	دما (درجه سانتی گراد) Temperature (°C)	زمان Time	تعداد سیکل Cycle count
دناتوره سازی اولیه Initial denaturing	94	5 min	1
دناتوره یا واسرشته شدن Denaturing	94	30 sec	35
اتصال Annealing	58	30 sec	35
تکثیر Extension	72	30 sec	35
تکثیر نهایی Final extension	72	10 min	1

جدول ۴- میزان بهینه اجزاء واکنش Real Time PCR.

Table 4. The optimal amount of Real-Time PCR reaction components.

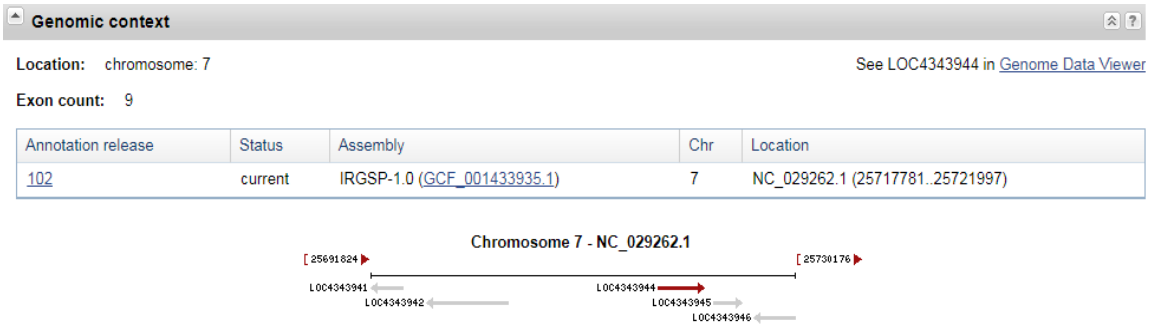
اجزاء **Components**	میزان **amount**
مسترمیکس ریل تایم Real Q Plus 2x Master Mix Green	12.5 میکرولیتر
پرایمر فوروارد Forward Primer	1 میکرولیتر(از غلظت ۱۰ پیکومول)
پرایمر ریورس Forward Primer	1 میکرولیتر(از غلظت ۱۰ پیکومول)
نمونه CDNA CDNA Template	5 میکرولیتر(از غلظت ۱۰ نانوگرم برمیکرولیتر)
اب فاقد نوکلئاز Nuclease free water	5.5 میکرولیتر
مجموع Total	25 میکرولیتر

جدول ۵- برنامه دمایی دستگاه Real Time PCR.

Table 5. Temperature program of Real Time PCR machine.

اجزاء **Components**	دما (درجه سانتی گراد) Temperature (°C)	زمان Time	تعداد سیکل Cycle count
دناتوره سازی اولیه Initial denaturing	95	15 min	1
دناتوره یا واسرشته شدن Denaturing	95	30 sec	40
اتصال Annealing	58	30 sec	40
تکثیر Extension	72	30 sec	40
منحنی ذوب Melting curve	55-95	هر 5 ثانیه 0.5 درجه	1

با بررسی ژن SAPK2 با شناسه LOC4343944 در پایگاه داده NCBI، مشخص شد این ژن کد کننده پروتئین کیناز سرین ترئونین در برنج و روی کروموزوم شماره ۷ برنج قرار دارد و دارای ۹ اگزون می‌باشد (شکل ۱).

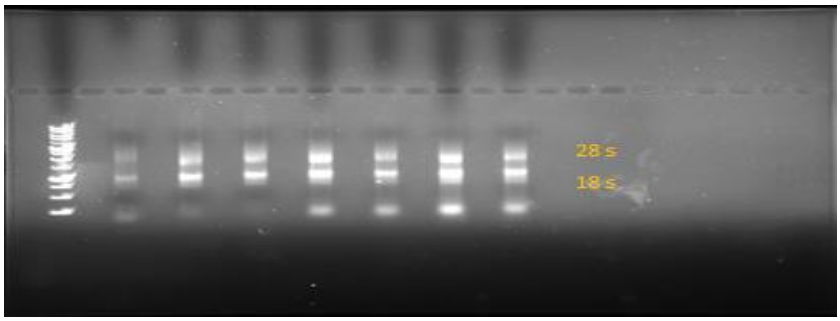


شکل ۱- موقعیت ژن SAPK2 درژنوم گیاه برنج.

Figure 1. SAPK2 gene location in the rice genom.

نتایج بررسی کیفیت RNA استخراج شده

وجود باندهای ۱۸s و ۲۸s نشان‌دهنده صحت استخراج RNA است (شکل ۲). از طریق دستگاه نانودراپ نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و همچنین طول موج ۲۶۰ به ۲۳۰ محاسبه شد. در تمام نمونه‌های استخراج شده، اکثراً این اعداد به ۲ بسیار نزدیک بود که نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج شده می‌باشد.

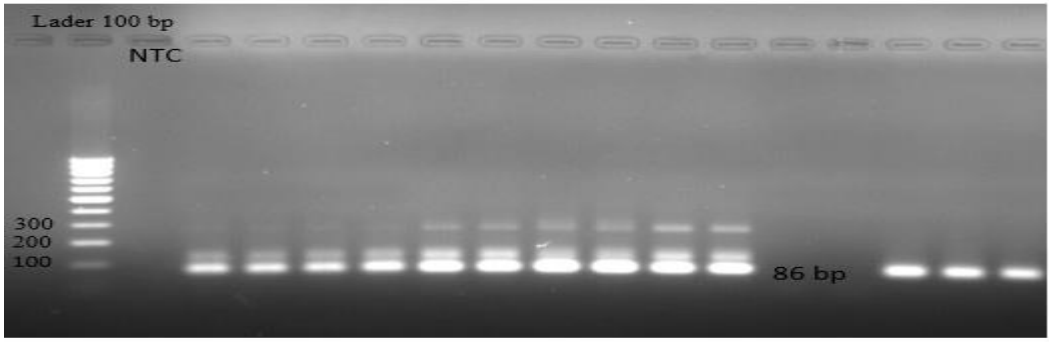


شکل ۲- نتایج الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز.

Figure 2. Results of RNA electrophoresis extracted on agarose gel.

نتایج بررسی کیفیت CDNA سنتز شده

طول پرایمر طراحی شده برای ژن 18S برابر ۸۶ bp بود و نتایج الکتروفورز ژل آگارز برای این محصول PCR وجود باند ۸۶ bp را برای ژن کنترل داخلی 18S نشان داد. این نتایج نشان‌دهنده کیفیت مناسب CDNA سنتز شده می‌باشد (شکل ۳).

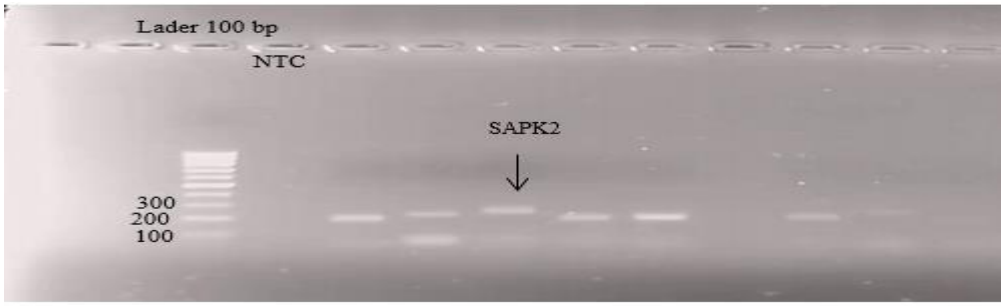


شکل ۳- نتایج الکتروفورز محصول PCR از cDNA سنتز شده با استفاده از پرایمر ژن کنترل داخلی 18srRNA.

Figure 3. The electrophoresis results of the PCR product of cDNA synthesized using the 18srRNA internal control gene primer.

نتایج بررسی پرایمرهای طراحی شده

وجود باند مشاهده شده مناسب برای ژن نشان‌دهنده سنتز درست پرایمر طراحی شده بود (شکل ۴). از این محصول PCR برای تهیه استانداردهای Real Time PCR در چهار رقت مختلف استفاده شد.



شکل ۴- نتایج الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمر ژن مورد بررسی.

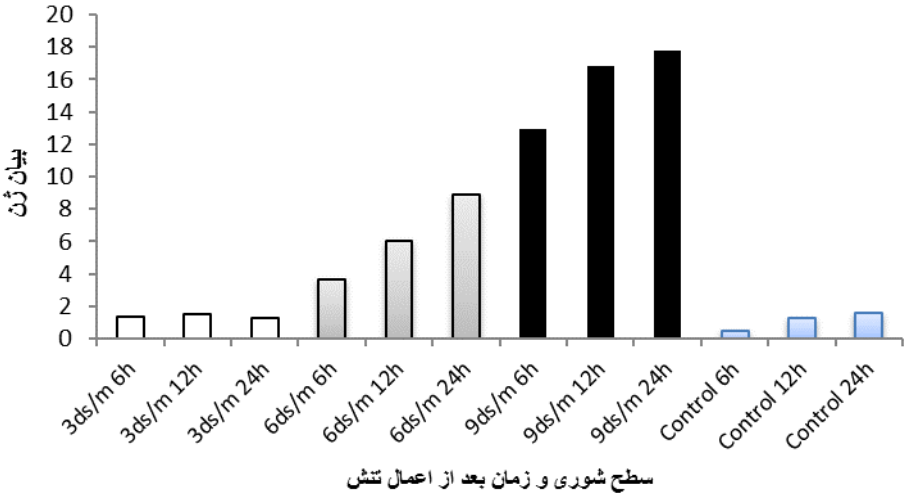
Figure 4. Results of PCR product electrophoresis using the investigated gene primer.

نتایج واکنش Real Time PCR

بررسی منحنی تکثیر ژن SAPK2 و ژن کنترل داخلی 18SrRNA نشان داد تکثیر به خوبی و با عملکرد مناسب صورت گرفته است. روند تکثیر با افزایش چرخه‌های تکثیر، نشان‌دهنده عدم وجود تکثیر غیر اختصاصی بود (شکل ۱۱). هم‌چنین بررسی منحنی ذوب برای ژن SAPK2 و ژن کنترل داخلی 18SrRNA وجود یک نقطه اوج را بالاتر از آستانه نشان داد که بیانگر تکثیر اختصاصی آن‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است. دمای ذوب که در آن ۵۰ درصد دورشته‌ای‌ها، تک‌رشته‌ای می‌شوند، حدود ۸۱ درجه سانتی-گراد بود. هم‌چنین وجود یک پیک ذوب در این منحنی نشان‌دهنده طراحی درست پرایمر برای ژن و عدم آلودگی می‌باشد (شکل ۱۲). هم‌چنین بررسی منحنی استاندارد در هر دو رقم متحمل و حساس نشان داد تیمارها روی خط رگرسیون قرار دارند که نشان‌دهنده غلظت مناسب نمونه‌ها و تکثیر اختصاصی آن‌هاست (شکل -۱۳).

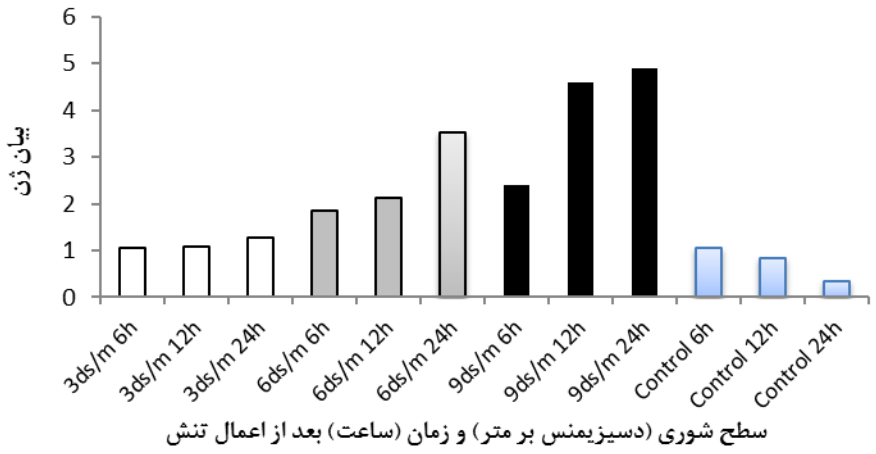
آنالیز نتایج واکنش Real Time PCR با استفاده از روش لیواک توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ جهت بررسی بیان ژن SAPK2 نشان داد که بیان ژن SAPK2 در رقم متحمل در سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر، در حداقل زمان بعد از اعمال تنش (شش ساعت) به سرعت افزایش معنی‌داری نشان داده است. دوازده ساعت بعد از اعمال تنش نیز بیان ژن نسبت به شش ساعت افزایش نشان داد. اما حداکثر بیان ژن SAPK2 ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش در سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر بود که نسبت به شرایط بدون تنش ۹ برابر بیشتر شد (شکل-۵). در رقم حساس نیز در سطح شوری ۹ دسیزیمنس بر متر، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش، حداکثر بیان ژن مشاهده شد. در این رقم فقط در سطح شوری ۹ دسیزیمنس بر متر در هر سه زمان مورد بررسی بعد از اعمال تنش شوری و هم‌چنین سطح شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش، افزایش بیان ژن مشاهده شد. در سایر سطوح و زمان‌ها بیان ژن بسیار ناچیز بود (شکل ۶). میزان بیان ژن در سطح شوری ۹

در رقم متحمل در مقایسه با رقم حساس بسیار معنی‌دار بود. در رقم متحمل در سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر، شش ساعت بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن نسبت به رقم حساس در این سطح و این زمان حدود شش برابر بیشتر و نسبت به شرایط بدون تنش ۱۲ برابر بیشتر شد. دوازده و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش نیز بیان ژن در رقم متحمل حدود چهار برابر بیشتر از رقم حساس و نه برابر بیشتر از شرایط بدون تنش بود (شکل ۹). بیان ژن SAPK2 در سطح شوری۶ دسیزیمنس بر متر و ۶ ساعت بعد از اعمال تنش بین رقم متحمل و حساس تفاوت زیادی وجود نداشت. اما ۱۲ساعت بعد از اعمال تنش در رقم متحمل نسبت به رقم حساس حدود سه برابر و نسبت به شرایط بدون تنش ۶ برابر بود. ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش نیز میزان بیان ژن در رقم متحمل نسبت به رقم حساس سه برابر و نسبت به شرایط بدون تنش چهار برابر شد (شکل- ۸). در سطح شوری سه دسیزیمنس بر متر و شرایط بدون تنش بین رقم متحمل و حساس تفاوتی مشاهده نشد (شکل‌های ۷ و ۱۰).



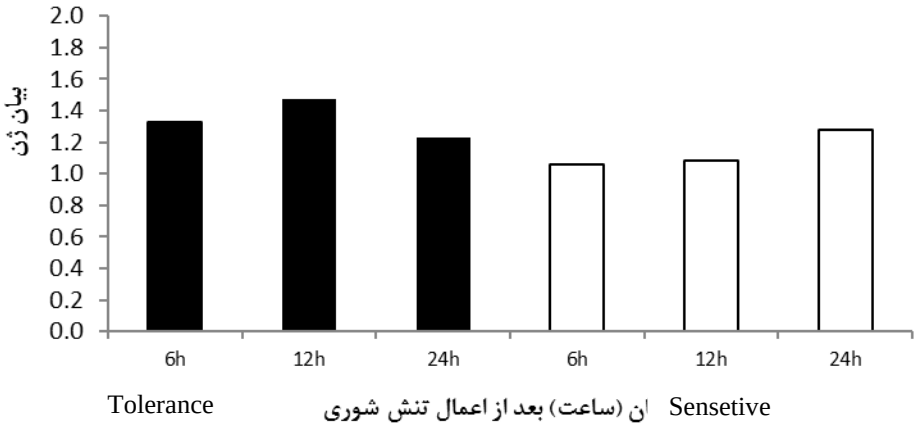
شکل ۵- میانگین میزان بیان ژن SAPK2 در رقم متحمل.

Figure 5. SAPK2 gene expression level in tolerant variety.



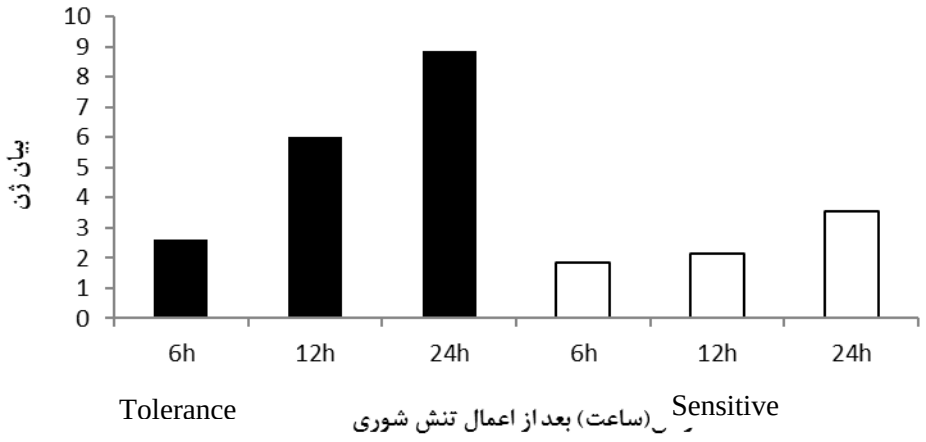
شکل ۶- میانگین میزان بیان ژن SAPK2 در رقم حساس

Figure 6. The level of SAPK2 gene expression in the sensitive variety.



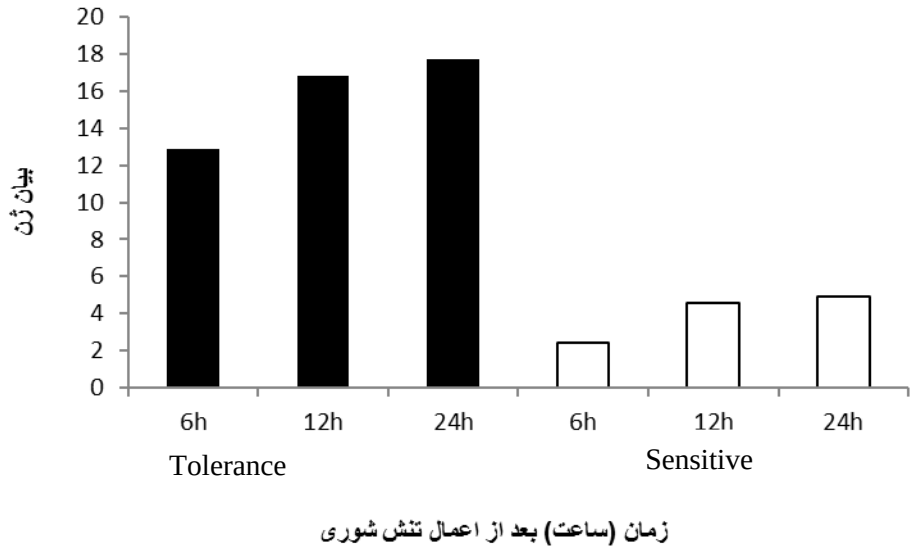
شکل ۷- میانگین میزان بیان ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس در دز شوری سه دسی‌زیمنس بر متر.

Figure 7. SAPK2 gene expression level in two tolerant and sensitive cultivars at a salinity dose of 3 ds/m.



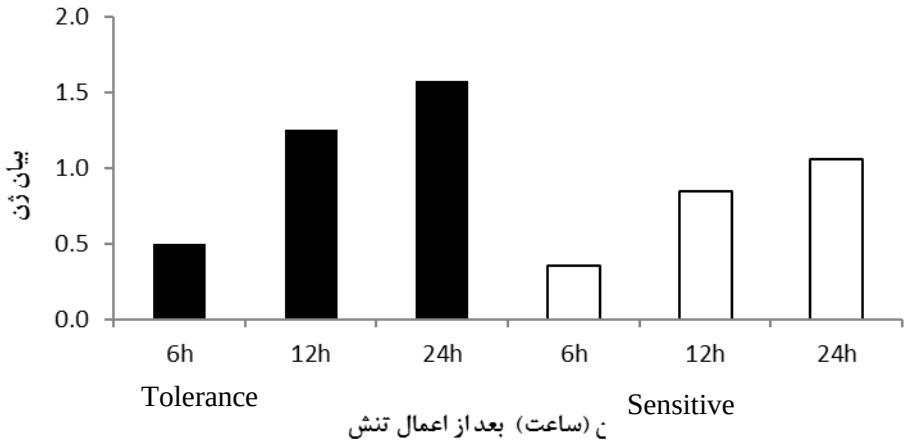
شکل ۸- میانگین میزان بیان ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس در دز شوری شش دسی‌زیمنس بر متر.

Figure 8. SAPK2 gene expression in two tolerant and sensitive cultivars at a salinity dose of 6 ds/m.



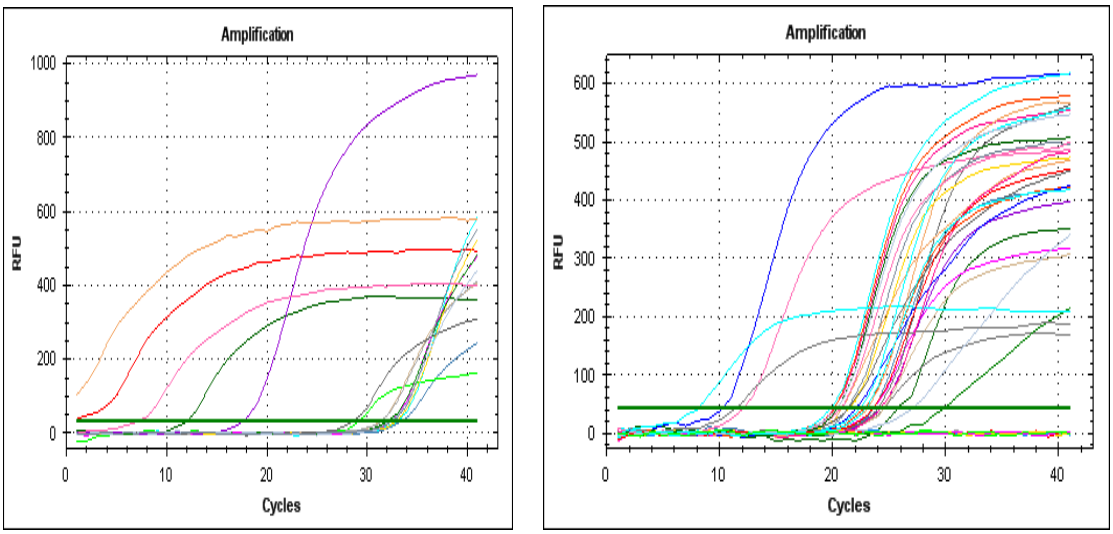
شکل ۹- میانگین میزان بیان ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس در دز شوری نه دسی‌زیمنس بر متر.

Figure 9. SAPK2 gene expression in two tolerant and sensitive cultivars at a salinity dose of 9 ds/m.



شکل ۱۰- میانگین میزان بیان ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس در شرایط کنترل.

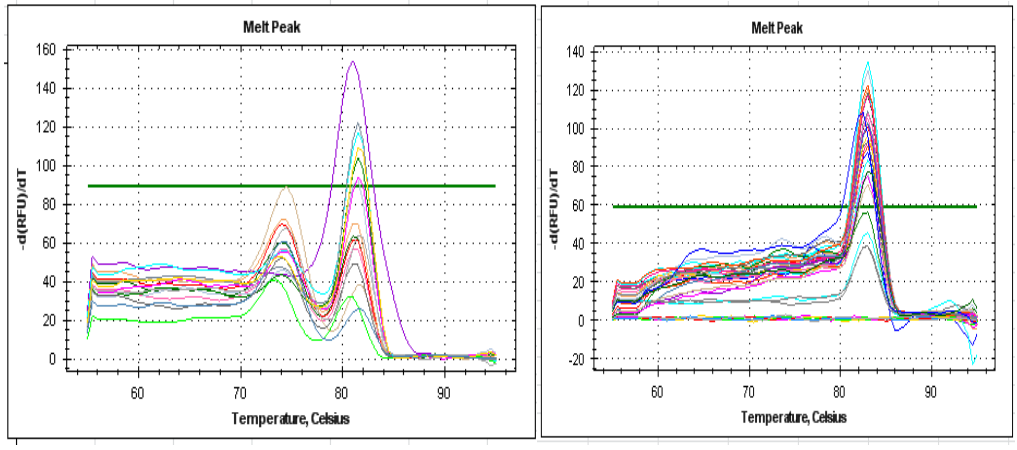
Figure 10. SAPK2 gene expression level in two tolerant and sensitive cultivars under control conditions.



رقم حساس رقم متحمل

شکل ۱۱- منحنی تکثیر ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس.

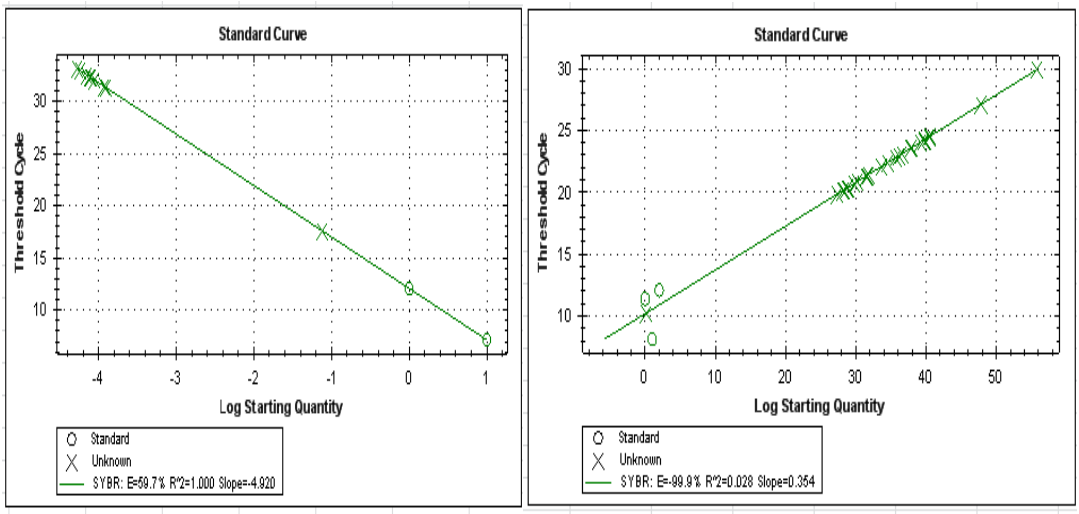
Figure 11. The amplification curve of SAPK2 gene in two tolerant and sensitive cultivars.



الف) رقم متحمل **ب) رقم حساس**

شکل ۱۲- منحنی ذوب ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس.

Figure 12. Melting curve of SAPK2 gene in two tolerant and sensitive cultivars.



الف) متحمل **ب) حساس**

شکل ۱۳- منحنی استاندارد ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس.

Figure 13. Standard curve of SAPK2 gene in two tolerant and sensitive cultivars.

نتایج تجزیه واریانس

تجزیه واریانس میزان بیان ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس برنج تحت تنش شوری نشان داد اثر شوری، اثر زمان و اثر متقابل آن‌ها در هر دو رقم متحمل و حساس در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است (جدول ۶). این نشان دهنده این است که میزان بیان ژن SAPK2 تحت تأثیر سطوح مختلف شوری و در زمان‌های مختلف تغییر معنی-داری پیدا خواهد کرد.

جدول ۶- تجزیه واریانس میزان بیان ژن SAPK2 در دو رقم متحمل و حساس برنج تحت تنش شوری.

Table 6. Variance analysis of SAPK2 gene expression in two tolerant and sensitive rice cultivars under salt stress.

منابع تغییر Sources of changes	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات رقم متحمل The mean square of the tolerance variety	میانگین مربعات رقم حساس The mean square of the sensitive variety
شوری salt	3	425.90*	19.05*
زمان time	2	28.67*	4.95*
زمان × شوری Salt * time	6	7.21 *	1.17*
خطا Error	24	0.010	0.023
ضریب تغییرات CV	-	3.45	2.21

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

تنش شوری با تغییر فرآیندهای متابولیکی و بیوشیمیایی در گیاه فعالیت آنزیم‌ها را تغییر می‌دهد و سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در گیاه می‌شود (Wang *et al*., 2013). رادیکال‌های آزاد اکسیژن در غلظت‌های بالا مولکول‌های حیاتی سلول مانند DNA، پروتئین و غشای لیپیدی را تخریب می‌کنند (Fotokian, 2015). تنش شوری با تجمع سدیم در سیتوزول باعث ایجاد سمیت سدیم در گیاه می‌شود. بیان ژن‌هایی با کارکردهای متفاوت مثل فعالیت ترانسپورتری، ژن‌های تنظیمی و انتقال سیگنال ترارسانی باعث ایجاد تحمل به تنش شوری در گیاه می‌شوند (Roy *et al*., 2014). پاسخ به شوری در گیاهان آوندی فرآیندی پس از رونویسی است و طی آن مسیر SOS (salt overlay signaling) شامل پروتئین کینازهای سرین-ترئونین و کلسیم باندینگ پروتئین‌ها فعال می‌شوند. فعالیت این مسیر در نهایت منجر به فعال شدن برخی ترانسپورترها خواهد شد (Lunde *et al*., 2007). پروتئین کینازها یک گروه مهم از آنزیم‌های کیناز هستند که پروتئین‌ها را با افزودن گروه فسفات فسفریله می‌کنند. این آنزیم‌ها در

ارتباطات سلولی و القای پیام رشد و تکثیر نقش مهمی ایفا می‌کنند. پروتئین کینازها از تنظیم کننده‌های کلیدی در فرآیندهای سلولی هستند و در تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (Azad *et al*., 2014). ویجایتا و همکاران (Vijayata *et al*., 2018) با بررسی بیان ژن‌های مختلف پاسخ‌دهنده به تنش شوری با روش Real Time PCR در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش شوری در برنج به این نتیجه رسیدند که ژن-های HKT2 و SOS1 در تنظیم هموئستازی یون‌های Na/K و تحمل به تنش شوری نقش دارند. اوبیدول‌اسلام و همکاران (Obaidul Islam *et al*., 2019) با شناسایی عملکرد ژن تراهلوز (osTRE1) برنج در پاسخ تحمل به شوری و تجزیه و تحلیل بیان این ژن با استفاده از تکنیک Real Time PCR در گیاهچه‌های جوان به این نتیجه رسیدند که این ژن توسط تنش شوری بیان می‌شود. هم-چنین تیمار ABA به طور موقت بیان این ژن را تنظیم می‌کند. کالیست دیهایو و همکاران (Calliste *et al*., 2014) بیان ژن SAPK4 از گروه ژنی پروتئین کیناز سرین ترئونین را در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش شوری با استفاده از تکنیک Real Time PCR بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد بیان ژن SAPK4 باعث تنظیم همئوستازی یونی، رشد و توسعه گیاه تحت تنش شوری خواهد شد. دنجی و همکاران (Dengji *et al*., 2018) بیان دو ژن SAPK1 و SAPK2 را در برنج تحت تنش شوری بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد بیان این دو ژن از طریق اثر بر متابولیت‌های فعال و اسمزی سبب افزایش رشد و توسعه گیاه و کاهش حساسیت به شوری خواهند شد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که با افزایش سطح شوری میزان بیان ژن SAPK2 در گیاه برنج افزایش می‌یابد. همچنین بررسی اثر زمان بعد از اعمال تنش بر میزان بیان ژن SAPK2 نشان داد با افزایش زمان تا ۲۴ ساعت، بیان ژن افزایش یافت. بررسی منحنی ذوب ژن SAPK2 در هر دو رقم متحمل و حساس نشان داد دمای ذوب حدود ۸۱ درجه سانتی‌گراد است و همچنین وجود یک پیک ذوب در این منحنی نشان‌دهنده طراحی درست پرایمر برای ژن و عدم آلودگی می‌باشد.

References

Azad, A., Kazemi Tabar, S. K., Alamzadeh, A., & Kazemini, A. 2014. Identification and statistical analysis of cis-acting elements of female serine/threonine protein kinase initiators in maize. The first international congress and the 13th Iranian genetics congress. Tehran, karaj.

Calliste, D., Olga, V., Karl-Josef, D., & Dortje, G. 2014. The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. Journal of BMC Plant Biology, 89, 24-30.

Dengji, L., Houping, V., & Diqiu. Y. 2018. The sucrose non-fermenting-1-related protein kinases SAPK1 and SAPK2 function collaboratively as positive regulators of salt stress tolerance in rice. BMC Plant Biology, 18, 203-221.

Duning, X., Lix, Y., Song, D., & Yang, G. 2007. Temporal And Spatial Dynamical Simulation Of Groundwater Characteristics In Minqin Oasis. Science China Ser D-Earth Science, 2, 261-273.

Fotokian, M. 2015. QTL analysis of genes related to salinity tolerance and grain quality in rice. Ph.D. Dissertation, University Of Tehran.

Lunde, C., Drew, P. D., Jacobs, A. K., & Tester, M. 2007. Exclusion of Na via sodium atpase (ppena) ensures normal growth of physcomitrella patens under moderate salt stress. Plant Physiology, 144, 1786–1796.

Manzoor, Z., Ali, R. I., Awan, T. H., Khalid, N., & Ahmad, M. 2006. Appropriate time of nitrogen application to fine rice (Oryza sativa L.). Journal of Agricultural Research, 44, 261-269.

Obaidul Islam, M., Hideki, K., Shuhei, SH., Daisuke, T., Hirokazu, M., & Ryozo, I. 2019. Functional identification of a rice trehalase gene involved in salt stress tolerance. Gene, 685, 42–49

Roy, S. J., Negrao, S., & Tester, M. 2014. Salt resistant crop plants. Current Opinion in Biotechnology, 26, 115-24.

Thiyagarajan, K., Manonmani, S., Pushpam, R., Malarvizhi, D., & Deepa Shankar, P. 2005. Per se and heterotic performance of private and public bred rice hybrids. Madras Agriculture Journal, 92, 532-535.

Turan, M. A., Elkiram, A. H. A., Taban, N., & Tban, S. 2009. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations in maize plant. African Journal of Agricultural Research, 4 (9), 893-897.

Vijayata, S., Ajit Pal, S., Jyoti, B., Jitender, G., Jogendra, S., Vineeth, T.V., & Sharma, P.C. 2018. Differential expression of salt-responsive genes to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive rice (Oryza sativa L.) at seedling stage. Crossmark, 255, 1667–1681.

Wang, W. X., Vinocur, B., & Altman, A. 2013. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218, 1-10.

Yousfi, S., Márquez, A. J., Betti, M., Araus, J. L., & Serret, M. D. 2016. Gene expression and physiological responses to salinity and water stress of contrasting durum wheat genotypes. Journal of Integrative Plant Biology, 58, 48-66.