بررسی بیان ژن‌های *Hv TIP2;3* و *Hv TIP4;1* در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل جو تحت تنش شوری

رباب سلامی[۱،*]، سید ابوالقاسم محمدی[۲]، سارا غفاریان[۳] و محمد مقدم[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۲- استاد، گروه به نژادی و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۰/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۱۲/۱۷)

چکیده

جو متحمل‌ترین غله در بین غلات نسبت به تنش شوری است و در گستره وسیعی از شرایط آب و هوایی کشت می‌شود. برای بهبود تحمل گیاهان به تنش شوری، بررسی بیان ژن‌های دخیل می‌تواند در شناسایی و تولید ژنوتیپ‌های متحمل موثر باشد. در این مطالعه، برای بررسی تأثیر شوری بر بیان ژن‌های *Hv TIP2;3* و *Hv TIP4;1*، (رمزکننده کانال‌های پروتئینی در طول غشاها) در ریشه جو، سه ژنوتیپ Clipper (حساس به شوری)، Sahara 3771 (متحمل به شوری) و لاین امیدبخش حاصل از تلاقی ارقام کویر و صحرا (متحمل به شوری)، در سطوح صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl کشت شدند. برای تعیین میزان تغییر بیان این ژن‌ها در سه زمان ۲٤ ساعت، سه روز و سه هفته بعد از اعمال تنش، RNA از نمونه‌های ریشه استخراج و cDNA سنتز شد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که از نظر بیان ژن‌های *Hv TIP2;3* و *Hv TIP4;1* بین ارقام، سطوح شوری و زمان‌های نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) وجود نداشت؛ ولی اثر متقابل ژنوتیپ × تنش شوری برای ژن *HvTIP2;3* و اثر متقابل ژنوتیپ × زمان نمونه‌برداری برای هر دو ژن مورد مطالعه تفاوت معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۱$) به‌دست آمد. میزان بیان ژن *Hv TIP2;3* در سطح شوری ۱۰۰میلی‌مولار NaCl، در ژنوتیپ حساس به شوری Clipper افزایش و در ژنوتیپ‌های متحمل کاهش بیان نسبت به شاهد (عدم تنش شوری) نشان داد. مقایسه میانگین ترکیب‌های تیماری ژنوتیپ و زمان نمونه‌برداری برای ژن *Hv TIP4;1* در میانگین سطوح شوری نشان داد که میزان بیان این ژن در سه هفته بعد از اعمال تنش شوری، در ژنوتیپ‌های Sahara 3771 و لاین امیدبخش افزایش بیان ولی در ژنوتیپ Clipper کاهش بیان داشت. نتایج این مطالعه ضمن تأیید تاثیرپذیری این ژن‌ها در شرایط تنش شوری، تلاش در جهت استفاده کارآمد از این ژن‌ها در گیاه جو در راستای افزایش تحمل به شوری موثر ارزیابی می‌شود.

واژگان کلیدی: آکوپورین‌ها، الگوی بیان، پروتئین‌های درونی تونوپلاست، جو، ژن‌های *Hv TIP2;3* و *Hv TIP4;1*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **r.salami1990@gmail.com**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

مقدمه

جو پس از گندم، برنج و ذرت چهارمین غله مهم دنیا است که به علت سازگاری و تحمل شرایط نامساعد محیطی در بسیاری از نقاط جهان کشت می‌شود (FAO, 2013). جو یکی از متحمل‌ترین گونه‌های گیاهی در برابر شوری است (Jiang *et al.*, 2006) و به همین علت در احیاء اراضی شور در برنامه‌های تناوبی قرار می‌گیرد.

عملکرد گیاهان تحت تأثیر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی دچار نوسان شده و در برخی موارد تا ۵۰٪ کاهش می‌یابد ولی تأثیر همه تنش‌ها در این کاهش یکسان نیست (Vij and Tyagi, 2007). تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که سطح وسیعی از اراضی کره زمین (بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار) (Witzel *et al.*, 2009) و ایران (حدود ۱۵ میلیون هکتار و معادل ۱۰ درصد مساحت کشور) را تحت تاثیر قرار می‌دهد (FAO, 2007). با توجه به رشد سریع جمعیت جهان، محدود بودن منابع طبیعی از جمله آب و خاک و افزایش تنش‌های زیستی و غیرزیستی، تولید گیاهان متحمل به انواع تنش‌ها از جمله تنش شوری را برای تأمین امنیت غذای جهان ضروری ساخته است (Witzel *et al.*, 2009).

شوری باعث ایجاد تنش اسمزی و تنش یونی می‌شود. تنش اسمزی ناشی از افزایش نمک در خاک می‌باشد که مانع رشد گیاه می‌گردد و تنش یونی نتیجه تجمع بیش از اندازه نمک در سلول‌ها است (Lefévre *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2003). این امر کاهش جذب آب از خاک به خصوص در مناطق خشک و نیمه خشک را به دنبال دارد، در نتیجه سرعت طویل شدن سلول‌ها و تورژسانس کاهش یافته و دیواره سلول‌ها سخت و ضخیم می‌گردد، مقدار نسبی آب برگ کاهش می‌یابد و رشد گیاهان به طور قابل توجهی کم می‌شود (Zaghdoud *et al.*, 2013; Mosaddek *et al.*, 2013). شوری همچنین سبب کاهش وزن خشک گیاهچه، غلظت CO_2 داخلی، کارآیی دریافت نور توسط فتوسیستم II، فتوسنتز خالص و هدایت روزنه‌ای می‌شود (Jiang *et al.*, 2006).

شوری باعث اختلالات فیزیولوژیکی و متابولیکی در گیاهان شده و رشد و نمو، عملکرد و کیفیت محصول را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Knight and Knight, 2001). تحمل به شوری یک ویژگی ترکیبی متشکل از سازوکارهای مختلف است که تعیین کننده توانایی گیاه برای بقا در شرایط تنش شوری و تکمیل چرخه‌های رویشی و زایشی می‌باشد (Ekiz and Yilmaz, 2003). پمپ‌های یونی نقش برجسته‌ای در تجمع نمک در واکوئل‌ها به عهده دارند. در واقع تفاوت در قابلیت نسبی گیاهان برای انتقال و جابجایی یون‌ها از غشاهای سلولی به ویژه غشای واکوئل‌ها اساس اختلاف گیاهان در تحمل به شوری را تشکیل می‌دهد. در واقع گیاهان متحمل به شوری، از خسارت تنش شوری به واسطه بیرون راندن یون‌ها از برگ‌ها و یا تجمع یون‌ها در واکوئل‌ها و دور نگه داشتن آن‌ها از سیستم سوخت و ساز سلولی، از تأثیرات سوء شوری در امان می‌مانند (Shannon *et al.*, 1985).

تحمل بالای جو در مقابل تنش شوری به تجمع Na^+ در واکوئل‌های درون سلولی و ساخت محلول‌های سازگار جهت تنظیم پتانسیل اسمزی در سیتوپلاسم مربوط می‌شود (Widodo *et al.*, 2009). تجمع Na^+ و Cl^- باعث کاهش رشد گیاه می‌شود (Hassine *et al.*, 2008; Yousif *et al.*, 2010). عقیده بر این است که تراوایی غشاهای سلولی ریشه جو نسبت به پتاسیم بیش از سه برابر سدیم می‌باشد (Glenn *et al.*, 1997). سیستم جذب و انتقال انتخابی یون‌ها توسط کانال‌های غشا در غلات به علت دارا بودن کارایی مطلوب در تبادل سدیم موجب شده است که گاهی غلات به دلیل داشتن این ویژگی در زمره گونه‌های متحمل به شوری گروه‌بندی شوند (Poustini, 2000).

سازگاری به تنش شوری ویژگی پیچیده‌ای است که با تغییر بیان مولکولی، مانند فرآیندهای فیزیولوژیکی، طی تکامل گیاه کنترل می‌شود (Sadder *et al.*, 2013). مطالعات نشان داده که ژن‌های متعدد در پاسخ به شوری دخالت دارند (Gao *et al.*, 2013). گزارش شده است که تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری از طریق تغییر در بیان پروتئین‌ها،

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

هدایت آبی را کاهش می‌دهند (Tyerman *et al*.,2002). تحقیقات نشان داده است که تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش شوری که بر جذب و انتقال آب تأثیر دارد، بیان ژن-های تولید کننده پروتئین‌های درونی اصلی (Major Intrinsic Proteins; MIP) را به صورت متفاوت تنظیم می-کنند (Forrest and Bhave, 2008). پروتئین‌های MIP یا آکوپورین‌ها (Aquaporins) کانال‌های غشایی را ایجاد می-کنند که باعث تسهیل انتقال آب و مولکول‌های کوچک خنثی از طریق غشاهای زیستی می‌شوند و تقریباً در تمام اندام‌های زنده وجود دارند (Li *et al*., 2014). پروتئین‌های MIP در جو شامل پنج پروتئین درونی تونوپلاستی (Hv TIP1;1، HvTIP2;1، HvTIP2;2، Hv TIP2;3 و HvTIP4;1)، یک پروتئین مشابه NOD26 (HvNIP2;1) و پروتئین غشای پلاسمایی (Hv PIP2;1) هستند (Ligaba *et al*., 2011). پروتئین‌های TIP در غشای واکوئل قرار دارند و انتقال غشایی آب و سایر مولکول‌های کوچک را در طول غشای واکوئل تسهیل می‌کنند. این ژن‌ها با تحمل گیاه به برخی تنش‌های غیرزیستی مانند شوری زیاد و خشکی که باعث کمبود آب می‌شوند نیز در ارتباط می‌باشند (Wang *et al*., 2011). در جو تحت تنش شوری، بیان ژن-های خانواده *Hv TIP* موجب القاء پروتئین‌های غشایی مانند پروتئین غشای واکوئلی می‌شود. انتقال آب و املاح در طول غشاها از طریق این پروتئین‌ها صورت می‌گیرد و بدین ترتیب گیاه تحت تنش شوری، شرایط اسمزی، یون-های خود را با جذب و انتقال آب و محلول‌ها حفظ می‌کند (Ligaba *et al*., 2011).

یکی از اثرهای تنش شوری القای تنش اسمزی به گیاه و مختل شدن تعادل آبی گیاه است، بنابراین، مطالعه سازوکارهای مولکولی درگیر در توان تنظیم اسمزی جو به عنوان گیاه متحمل به شوری از طریق بررسی بیان ژن‌های *MIP* ضروری به نظر می‌رسد که در این مطالعه از فن Real Time-PCR برای این منظور استفاده شده است.

از این رو هدف این مطالعه، ارزیابی میزان بیان دو ژن از ژن‌های خانواده *Hv TIP* در ریشه ژنوتیپ‌های جو تحت تنش شوری بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی مورد استفاده شامل ارقام جو Sahara 3771، Clipper و لاین امید بخش متحمل به شوری حاصل از تلاقی ارقام صحرا (والد مادری) و کویر (والد پدری) بودند. ژنوتیپ Sahara3771 بومی الجزایر، زمستانه، شش ردیفه، پابلند و متحمل به شوری و ژنوتیپ Clipper بهاره، دو ردیفه، حساس به شوری و اصلاح شده در استرالیا است (Widodo *et al*., 2009). ارقام Sahara3771 و Clipper از دانشگاه استرالیای غربی و لاین متحمل به شوری از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در زمان و در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار در سه سطح شوری صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی-مولار NaCl و سه ژنوتیپ انجام شد. به علت شکل سیستم هیدروپونیک از طرح فاکتوریل استفاده شد. بنابراین به خاطر تکرار بیشتر، فاکتورهای فرعی (زمان نمونه برداری) با دقت بیشتری نسبت به و فاکتور اصلی (تنش شوری و ژنوتیپ برآورد شدند. جهت انجام آزمایش در شرایط هیدروپونیک، ابتدا بذرها در محلول هیپوکلرید سدیم۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیق ضدعفونی و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با آب کاملا شستشو داده شدند. سپس بذور با تراکم زیاد در سنگریزه‌های سیستم هیدروپونیک کشت شدند. روی لوله-ها تا زمان ظهور اولین برگ سبز به مدت ۷۲ – ٤٨ ساعت با نایلون پوشانیده شدند. در این مدت آب‌پاشی به صورت دستی انجام گرفت. بعد از جوانه زنی بذرها گیاهچه‌های اضافی حذف و آزمایش با تراکم لازم ادامه یافت. پس از سبز شدن گیاهچه‌ها ابتدا به مدت ۷۲ ساعت با محلول هوگلند نصف غلظت و سپس با محلول هوگلند کامل آبیاری شدند. پس از استقرار گیاهچه‌ها تنش شوری در مرحله سه برگچه‌ای اعمال شد. به این ترتیب که ابتدا گیاهچه‌ها

به مدت ٢٤ ساعت تحت تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار، سپس تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار و در نهایت ۲۰۰ میلی‌مولار

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

NaCl قرار گرفتند، در مطالعات متعدد مشاهده شده است که طی روزهای مختلف پس از اعمال تنش بیان ژن تغییر می‌کند و بررسی زمان سه هفته به منظور بررسی اثر تنش در دراز مدت می‌باشد نمونه‌برداری از ریشه‌ها برای استخراج RNA صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان (Real Time-PCR): استخراج RNA از نمونه‌های ریشه با استفاده از کیت استخراج RNX_PLUS (شرکت سیناژن) انجام شد. جهت حذف آلودگی‌های احتمالیDNA، نمونه‌های RNA استخراج شده با آنزیم DNase تیمار و کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA به ترتیب توسط اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. سنتز cDNA (در حجم ۲۰ میکرولیتر) بر اساس دستورالعمل کیت Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit در دو زمان انجام گردید. cDNA حاصل به عنوان الگو جهت تکثیر ژن‌های *Hv TIP2;3* و *Hv TIP4;1* براساس آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و تکنیک Real Time-PCR با رنگ آمیزی SYBR Green استفاده شد. واکنش Real Time-PCR با استفاده از کیت TAKARA در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام‌گرفت (جدول ۲).

تجزیه آماری: پس از انجام واکنش، داده‌های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. داده‌های خام حاصل با استفاده از فرمول پیشنهادی Livak and Schmittgen (2001) به شرح زیر تصحیح شد:

CT = (CT Target– CT *α-tubulin*) salinity x - (CT Target –CT *α-tubulin*) salinity 0

$2^{-\Delta\Delta}$

با بررسی منابع متعدد این روش به عنوان روش تصحیح داده‌ها انتخاب شد (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffle, 2001; Zhu *et al.*, 2005; Besse *et al.*, 2011 and Knipfer *et al.*, 2011). در این فرمول C_T و $C_{TTarget}$ *α-tubulin* به ترتیب داده‌های حاصل از دستگاه Real Time-PCR برای ژن هدف (شوری) و ژن مرجع (α-Tubulin)، در شوری صفر، ۱۰۰ یا ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl بود. تجزیه واریانس داده‌های تغییر بیان ژن‌ها، براساس مدل آماری فاکتوریل اسپلیت پلات در زمان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی توسط نرم افزار SAS انجام شد. قبل از تجزیه واریانس، فرض‌های نرمال بودن خطاها و همگنی واریانس خطاها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

بیان ژن‌های پاسخ دهنده به شوری: بررسی منحنی‌های تکثیر ژن‌های مورد مطالعه و ژن مرجع نشان دادند که تکثیر به خوبی و با عملکرد مناسب صورت گرفته است و روند تکثیر با افزایش چرخه‌های تکثیر، نشانگر عدم وجود تکثیر غیر اختصاصی بود. وجود C_T متفاوت برای ژن‌ها در تیمارهای مختلف شوری بیانگر وجود تفاوت در بیان ژن-های مورد مطالعه در سطوح مختلف شوری است.

منحنی ذوب ژن مرجع *α–tubulin* و ژن‌های مورد مطالعه *Hv TIP2;3* و*Hv TIP4;1* در ارقام جو Clipper، Sahara3771 و لاین امیدبخش تحت تنش شوری صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl در شکل ۱ آورده شده است. گفتنی است که در مقالات مختلف قابلیت ژن*tubulin* به عنوان ژن مرجع، جهت آنالیز بیان ژن ثابت شده است (*et al.*, 2011; Gimeno *et al.*, 2015 and Llanos *et al.*, 2015; Wan,) همان طور که از منحنی‌های ذوب مشخص است وجود فقط یک نقطه اوج بالاتر از آستانه برای ژن *α–tubulin* نشان دهنده تکثیر اختصاصی این ژن در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است. برای ژن‌های *Hv TIP2;3* و *HvTIP4;1*، علاوه بر نقطه اوج اصلی مربوط به تکثیر اختصاصی ژن، یک نقطه اوج کوچک نیز مشاهده شد. شایان ذکر است که وجود نقطه اوج کوچک علاوه بر نقطه اوج اصلی نمی‌تواند اریبی در برآورد میزان غلظت ژن هدف ایجاد کند (QIAGEN, 2005).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *Hv TIP2;3* و *Hv TIP4;1*

Table 1. Sequence of specific primers for *Hv TIP2;3* and *Hv TIP4;1* genes

ژن Gene	آغازگر (Primer)	
	برگشت (3′-5′) Reverse (3′-5′)	رفت (5′-3′) Forward (5′-3′)
Hv TIP2;3	GTGCCGAGGGATCCCTTC	CTACTGGGTTGCGCAGCTC
Hv TIP4;1	CGGTGCTGTACGTGGTGG	CACCGACAATAAGGCCGGT
α-tubulin	AGCATGAAGTGGATCCTTGG	AGTGTCCTGTCCACCCACTC

جدول ۲- ترکیب محلول واکنش Real Time-PCR

Table 2. Components of Real Time-PCR reaction

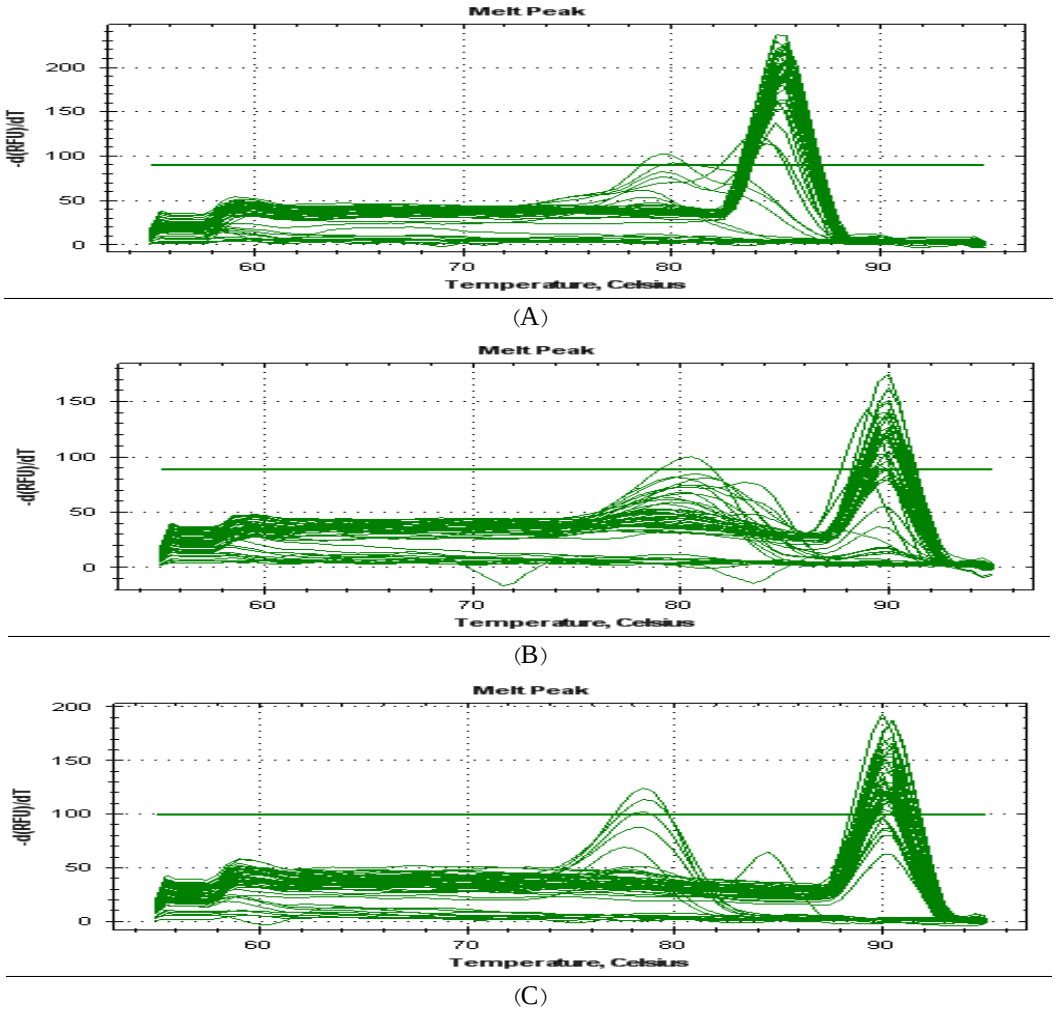
مواد Materials	حجم (میکرولیتر) Volume (µl)
مخلوط واکنش SYBR Green SYBR Green PCR master mix	4
آغازگر پیش‌رو و پس رو (۵ میکرومولار) Forward and reversed primer (5 µ.l)	0.75 + 0.75
cDNA (µ.l)	1
آب مقطر استریل Distilled water	5

تجزیه واریانس بیان ژن‌های *Hv TIP2;3* و *Hv TIP4;1*:
نتایج تجزیه واریانس تیمارهای شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl و شاهد بر بیان ژن‌های *Hv TIP2;3* و *HvTIP4;1*، در ارقام جو Clipper، Sahara3771 و لاین امیدبخش در سه زمان ۲٤ ساعت، سه روز و سه هفته بعد از اعمال تنش به صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در زمان در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی براساس داده‌های $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد که نتایج در جدول ۳ آورده شده است. بین تکرارها، ارقام، سطوح مختلف شوری و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری از نظر تغییر بیان هر دو ژن مورد بررسی، تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. اثر متقابل ژنوتیپ × تنش شوری برای ژن *HvTIP2;3*، و اثر متقابل دو جانبه ژنوتیپ × زمان نمونه‌برداری برای هر دو ژن مورد مطالعه معنی‌دار به دست آمد. اثر متقابل تنش × زمان نمونه‌برداری و اثر سه‌جانبه ژنوتیپ × تنش شوری × زمان نمونه‌برداری نیز برای ژن‌های مورد مطالعه معنی‌دار نبود. تنش شوری که با تأثیر بر جذب و انتقال آب دارای اثر متمایز بر بیان ژن‌های *MIP* از جمله ژن‌های *TIP* می‌باشد (Forrest and Bhave, 2008). گزارش شده است که پروتئین‌های TIP که در طول غشای واکوئل قرار دارند با تحمل گیاه به شوری در ارتباط هستند (Wang *et al*., 2011). میزان بیان ژن‌های *TIP* در ارقام مختلف گیاهی و نیز اندام‌های گیاهی مختلف متفاوت است (Tyerman *et al.*, 2002; Zhao andLigaba *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013). با بررسی بیان ژن‌های *MIP* در برنج طی مراحل مختلف رشدی و در بافت‌های مختلف گزارش شد که بیان این ژن‌ها در بافت‌ها و مراحل مختلف رشدی، متفاوت است (Sakurai *et al.*, 2005). همچنین با مطالعه چندین ژن پاسخ دهنده به شوری در جو مشاهده شد که ۹۲ ژن تحت تنش شوری تغییر بیان نشان می‌دهند (Ueda *et al.*, 2004). مطالعات نشان داده است که رونوشت همه ژن‌های MIP، در ریشه جو فراوان‌تر از اندام‌های هوایی است و *Hv TIP2;3* بیشترین و *Hv*

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

TIP2;1 کمترین تعداد رونوشت را در جو دارند (Ligaba*et al.*, 2011).

تغییربیان ژن *Hv TIP2;3* در ارقام Clipper، Sahara3771 و لاین امید بخش در تیمارهای شوری۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار NaCl) در شکل ۲ نشان داده شده است. در سطح شوری ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl، میزان بیان ژن در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری Sahara3771 و لاین امید بخش به طور معنی‌دار کمتر از ژنوتیپ حساس به شوری Clipper بود. در عین حال در تیمار شوری ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl، میزان بیان ژن *Hv TIP2;3* در ژنوتیپ حساس به شوری Clipper به طور معنی‌دار کاهش ولی در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری Sahara3771 و لاین امید بخش به طور معنی‌دار افزایش یافت و بیشترین بیان مربوط به لاین امید بخش بود. میزان تغییر بیان ژن *Hv TIP2;3* در سه ژنوتیپ در سطح شوری ۱۰۰میلی‌مولار NaCl نشان دهنده پاسخ مشابه ژنوتیپ‌های متحمل به شوری در مقایسه با ژنوتیپ حساس به شوری Clipper بوده و در ژنوتیپ‌های متحمل کاهش بیان نسبت به شاهد مشاهده شد. در حالی که در سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl، حالت عکس مشاهده شد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که کاهش بیان ژن *Hv TIP2;3* در ژنوتیپ‌های متحمل یک نوع سازوکار تحمل در برابر شوری ملایم است.

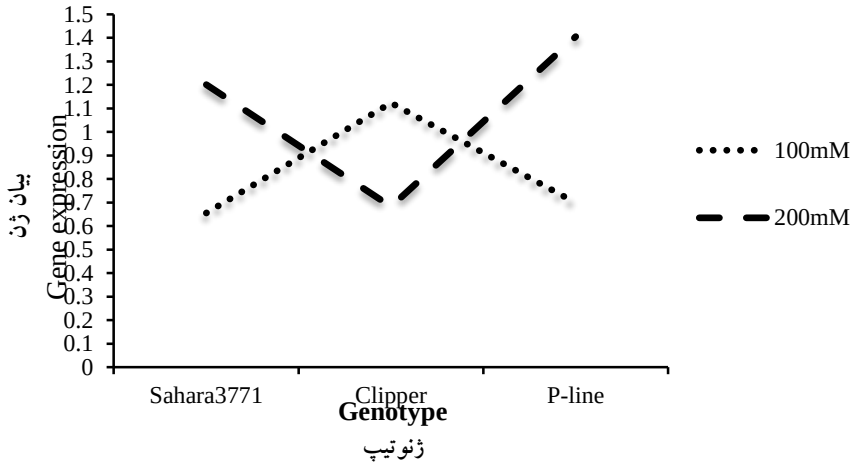


شکل ۱- منحنی ذوب محصولات ژن‌ها ی *α-tubulin*(A)، *Hv TIP2;3*(B)، *Hv TIP4;1*(C)در ارقام جو Clipper، Sahara3771 و لاین امید بخش تحت تنش شوری صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl.

Figure 1. The melting curve. A: *α- tubulin*; B: *Hv TIP2;3*; C: *Hv TIP4;1* genes in barley genotypes under salinity levels of 0, 100 and 200 mM NaCl

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

مطالعات نشان داده است که بیان ژن *Hv TIP2;3* در شرایط عادی بیشتر از تنش شوری است. به طوری که کاهش معنی‌داری در بیان این ژن در ریشه رقم Haruna-Nijo جو تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl به مدت ۲٤ ساعت نسبت به شرایط فاقد تنش مشاهده شد (Besse*et al.*, 2011; Ligaba*et al.*, 2011).



شکل ۲- تغییر بیان ژن *Hv TIP2;3* در سطوح تنش ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار NaCl) در ارقام جو Clipper، Sahara3771 و لاین امیدبخش (P-line) در میانگین زمان‌های نمونه‌برداری

Figure 2. Changes in *Hv TIP2; 3* expressions in expose to 100 and 200 mM NaCl compared to control (mM NaCl) in Clipper, Sahara3771 and Omid-bakhsh line barley genotypes (P-line) at average samplings stage

جدول ۳- تجزیه واریانس بیان ژن‌های *Hv TIP2;3* و *Hv TIP4;1*، در ژنوتیپ‌های جو تحت سطوح شوری صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl در زمان‌های نمونه برداری۲٤ ساعت، سه روز و سه هفته بعد از اعمال تنش

Table 3. Analysis of variance for the expression of *Hv TIP2;3* and *Hv TIP4;1* genes in barley genotypes under 0, 100 and 200 mM NaCl in 24 h, 3 day and 3 weeks after salt treatment

میانگین مربعات (MS)		درجه آزادی	SOV	منابع تغییر
HvTIP4;1#	*HvTIP2;3*	DF		
0.238ns	0.0003ns	1	Replication	تکرار
1.255ns	0/076ns	2	Genotype	ژنوتیپ
0.149ns	0.654ns	2	Stress	تنش
1.006ns	1.157*	2	Genotype × stress	ژنوتیپ × تنش
0.573	0.137	5	Error 1	خطای۱
0.531ns	0.163ns	2	Sampling time	زمان نمونه برداری
1.348*	1.106**	4	Genotype × sampling time	ژنوتیپ × زمان نمونه برداری
0.406ns	0.041ns	2	Stress × sampling time	تنش × زمان نمونه برداری
0.870ns	0.148ns	4	Genotype × stress × sampling time	ژنوتیپ × تنش × زمان نمونه برداری
0.276	0.059	12	Error 2	خطای ۲

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: Not significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

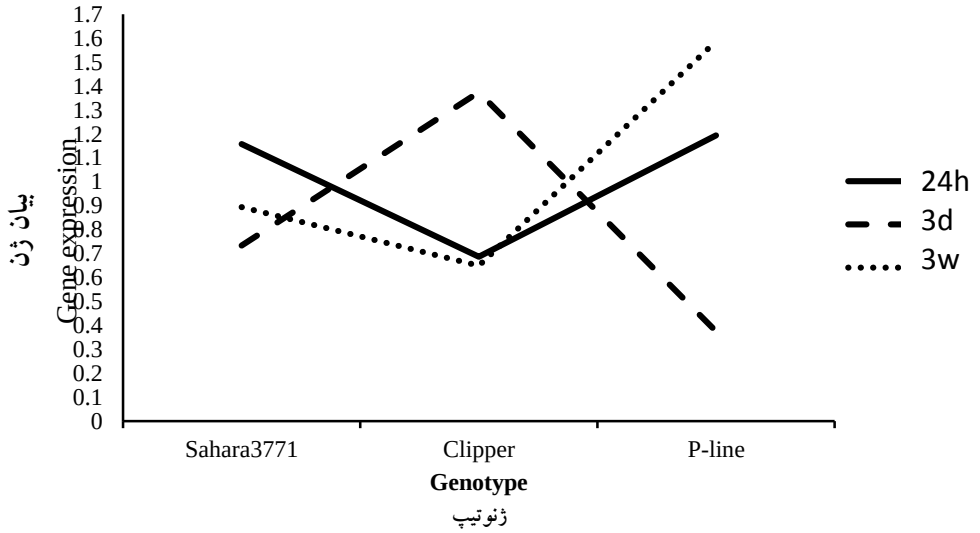
گزارش شده است که تنش شوری بالا (200 mM NaCl) به طور معنی‌داری هدایت هیدرولیکی ریشه جو را کاهش داده و در مقابل تنش شوری ملایم (100 mM NaCl) باعث کاهش اندک هدایت هیدرولیکی ریشه می‌شود ولی تفاوت معنی‌داری در سطح mRNAهای ژن *Hv TIP* مشاهده نشد (Horie *et al.*, 2011).

با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل دو جانبه ژنوتیپ × زمان نمونه‌برداری برای تغییر بیان ژن *Hv TIP2;3* در میانگین سطوح شوری، مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ژنوتیپ و زمان نمونه‌برداری (شکل ۳) نشان داد که ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش شوری، بیان ژن *Hv TIP2;3* در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری Sahara3771 و لاین امید بخش به طور معنی‌دار نسبت به ژنوتیپ حساس به شوری Clipper افزایش یافت. این امر بیان می‌کند که پاسخ اولیه به تنش شوری در ژنوتیپ‌های متحمل نسبت به حساس متفاوت است. در سه روز بعد از اعمال تنش شوری، بیان ژن *Hv TIP2;3* در ژنوتیپ‌های Sahara3771 و لاین امید بخش کاهش نشان داد که این میزان کاهش در لاین امید بخش نسبت به Sahara3771 بیشتر بود ولی در ژنوتیپClipper (حساس به شوری) افزایش معنی‌دار در بیان این ژن مشاهده شد. در نهایت در سه هفته بعد از اعمال تنش شوری، مجدداً افزایش بیان ژن در ژنوتیپ‌های Sahara3771 و لاین امید بخش، و کاهش بیان آن در ژنوتیپ Clipper مشاهده شد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً ژن *Hv TIP2;3* در پاسخ دیرهنگام به تنش شوری در ارقام متحمل دخالت دارد. ژاو و همکاران (Zhu *et al.*, 2005) بیان ژن‌های خانواده *MIP* را در ریشه ذرت، تحت تنش شوری مطالعه کردند و گزارش کردند که بعد از اعمال تیمار ۱۰۰میلی‌مولار NaCl، بیان هیچ کدام از ژن‌های *Zm TIP* تغییر نکرد. در مقابل، بعد از اعمال تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl، این پاسخ‌ها تغییر کرد و بعد از ۲٤ ساعت، از بیان ژن‌های *Zm TIP* ممانعت شد. اما پس از ٤۸ ساعت تغییرات کاهش و پایداری مشاهده شد. در تحقیقی توسط بورسیاک (Boursiac *et al.*, 2005) نیز تأثیر شوری بر هدایت هیدرولیکی ((Lp(r) در ریشه آرابیدوبسیس در زمان‌های کمتر از دو ساعت بعد از اعمال تنش و بین ۲٤ – ٦ ساعت بعد از اعمال تنش بررسی گردید. نتایج آنها نشان داد که جلوگیری از انتقال آب تحت تنش شوری در رابطه با پاسخ سریع گیاه است که این تغییرات همراه با تغییر در سطح بیان آکوپورین‌ها می‌باشد و تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl باعث کاهش ۷۰ درصد در Lp(r) شد. در ادامه، سطح بیان ژن‌های *TIP* در ریشه آرابیدوبسیس در شرایط رشد هیدروپونیک استاندارد بررسی شد و ملاحظه گردید که ژن‌های *Hv TIP2;2*، *Hv TIP2;3*، *Hv TIP1;2* و *Hv TIP1;1* بیان بالایی در ریشه دارند. بیان ژن‌های *TIP* و *PIP* در ریشه به جز *Hv TIP2;3* و *Hv PIP2;3* تا دو ساعت بعد اعمال تنش پایدار بود و در مقابل کاهش قابل ملاحظه‌ای در رونوشت آکوپورین‌ها بین ۲ تا ٤ ساعت بعد اعمال تنش مشاهده شد. بیشترین کاهش در بیان ژن در شش ساعت بعد اعمال تنش با ۳۵ درصد برای *Hv PIP1;2* و ٦۵ درصد برای *Hv PIP1;1* و *Hv TIP2;2* گزارش شد. بیان اکثر این ژن‌ها تا ۲٤ ساعت کاهش یافت. به طور کلی در رونوشت کلیه آکوپورین‌ها کاهش بیان ۲۵ تا ٦۰ درصد بعد از دو ساعت اعمال تنش شوری مشاهده شد (Boursiac *et al.*, 2005).

مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ژنوتیپ و زمان نمونه‌برداری ژن *Hv TIP4;1* در میانگین سطوح شوری نشان داد که میزان بیان این ژن ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش شوری در ژنوتیپ متحمل Sahara3771 افزایش معنی‌دار داشت و در ژنوتیپ Clipper و لاین امید بخش افزایش بیان تقریبا مشابهی دیده شد. در سه روز بعد از اعمال تنش شوری، میزان و روند افزایش بیان ژن در هر سه ژنوتیپ تقریبا ثابت و نسبت به ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش میزان بیان کاهش یافت. سه هفته بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن در ژنوتیپ حساس به شوری Clipper کاهش معنی‌دار نشان داد و در ژنوتیپ‌های متحمل مجددا افزایش بیان دیده شد (شکل ٤). مشاهده شده است که بین ژن‌های *TIP*، فراوانی رونوشت ژن *Hv TIP4;1* در شرایط بدون تنش بالا بوده اما تحت

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

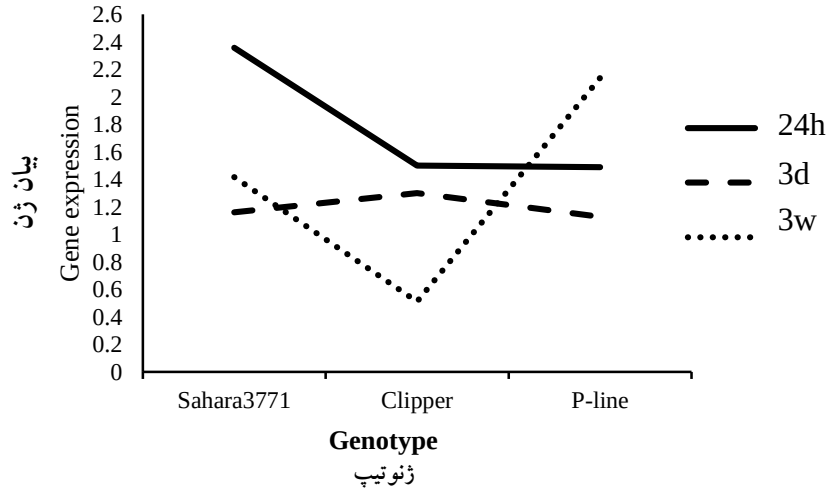
تنش شوری (FC -15.89) کاهش معنی‌داری نشان داد. همین موضوع باعث پیشنهاد وجود نقش حیاتی این ژن تحت تنش شوری می‌شود (Hove *et al.*, 2015). لی و همکاران (Li *et al.*, 2008) گزارش کردند که بیان ژن *Os TIP4;1* در برنج در شرایط نرمال (بدون تنش) به طورمعنی‌دار افزایش داشت و میزان بیان آن در اندام‌های هوایی بیشتر از ریشه بود. با اعمال تیمار شوری ۱۵۰میلی-مولار NaCl تغییر فنوتیپی در جوانه‌های برنج مشاهده نشد ولی بیان ژن *OsTIP4;1* در ریشه در دو ساعت بعد از اعمال تیمار شوری (مراحل اولیه اعمال تنش) کاهش و سپس به آرامی افزایش یافت و در هشت ساعت بعد از اعمال تنش به حداکثر میزان بیان رسید و مجددا در ۱۰ ساعت بعد اعمال تنش کاهش یافت. آن‌ها اظهار داشتند که احتمالا این ژن در انتقال آب فعالیت دارد. طی آزمایشی سطح بیان ژن‌های مختلف از جمله ژن *Os TIP4;1* در ۲۶ و ۵۶ روز بعد از جوانه زنی در ریشه، پهنای برگ و بساک برنج بررسی و مشاهده شد که این سه ژن در هر سه اندام بیان می‌شوند (Sakurai *et al.*, 2005). با بررسی بیان برخی ژن‌های *Hv TIP* گزارش شد که تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl برای ۲۴ ساعت میزان بیان ژن *Hv TIP4;1* نسبت به شرایط عادی افزایش بیان معنی‌دار نشان داد (Ligaba *et al.*, 2011). در پژوهش دیگری ثابت کردند که بین بیان ژن‌ها و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری در جو رابطه وجود دارد، به این صورت که با بررسی بیان تعدادی از ژن‌ها بعد از ۳، ۸ و ۲۷ ساعت بعد از اعمال تنش شوری مشاهده گردید که حداکثر تعداد ژن‌هایی که افزایش بیان داشتند، ۲۷ ساعت بعد از اعمال تنش بود. در مقابل، برخی ژن‌ها در زمان هشت ساعت کاهش بیان نشان دادند (Waliaet *al.*, 2006). بررسی بیان ژن‌های *MIP* در اندام‌های مختلف آرابیدوبسیس تحت تنش‌های مختلف از جمله شوری با استفاده از RT-PCR نشان داد که غالبا چندین آکوپورین در یک اندام بیان می‌شوند و بسیاری از آن‌ها تحت تنش‌های مختلف، کاهش یا افزایش بیان نشان دادند (Alexandersson *et al.*, 2005).



شکل ۳- تغییر بیان ژن *Hv TIP2;3* در ارقام جو Clipper، Sahara3771 و لاین امید بخش (P-line) در زمان‌های ۲۴ ساعت، سه روز و سه هفته بعد از اعمال تنش در میانگین سطوح شوری

Figure 3. Changes in *Hv TIP2;3* expression in Clipper, Sahara3771 and Omid-bakhsh line barley genotypes (P-line) at 24 hours, three days and three weeks after applying the average salinity stress levels.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]



شکل ٤- تغییر بیان ژن *Hv TIP4;1* در ارقام جو Clipper، Sahara3771 و لاین امید بخش (P-line) در زمان‌های ٢٤ ساعت، سه روز و سه هفته بعد از اعمال تنش در میانگین سطوح شوری

Figure 4. Changes in gene expression of *Hv TIP4;1* in barley genotypes of Clipper, Sahara3771 and Omid-bakhsh line (P-line) at 24 hours, three days and three weeks after applying the average salinity stress levels

برای مقابله با اثرهای منفی تنش‌های محیطی، گیاهان از سازوکارهای متفاوتی مانند سازگاری‌های فیزیکی، فعل وانفعالات مولکولی و تغییرات سلولی استفاده می‌کنند. به دلیل پیچیده بودن ژنتیک تحمل به شوری از بررسی بیان و انتقال ژن در کنار سایر روش‌های معمول اصلاحی نیز به عنوان یکی از راهکارهای افزایش تحمل به شوری در گیاهان استفاده می‌شود. گزارش شده است که تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری از طریق تغییر در بیان پروتئین‌ها، هدایت آبی را کاهش می‌دهند. بنابراین، مطالعه بیان ژن‌های درگیر در تحمل شوری در بافت‌های مختلف گیاه، درک بهتری از پاسخ گیاه به تنش‌های غیرزیستی در سطح مولکولی ارائه و در نتیجه استفاده مؤثر از روش‌های مولکولی برای بهبود تحمل به شوری را فراهم خواهد کرد. طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه نیز مشاهده گردید که ژن‌های *Hv TIP2;3* و *Hv TIP4;1* در سطوح مختلف تنش شوری دچار تغییر بیان شدند. با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه با در نظر گرفتن چگونگی تغییر بیان این ژن‌ها هنگام مواجهه با شوری در ژنوتیپ مقاوم می‌توان در بهبود مقاومت به تنش شوری در ارقام حساس به شوری اقداماتی را صورت داد. از جمله می‌توان ژن‌هایی که تحت تنش شوری در ژنوتیپ‌های مقاوم، افزایش بیان داشتند را با روش‌های مهندسی ژنتیک، به گونه‌های حساس به شوری که عملکرد بالا دارند، انتقال داد.

References

Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjovall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johanson, U. and Kjellbom, P. (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*, **59**: 469-484.

Besse, M., Knipfer, T., Miller, A., Verdeil, L.J., Jahn, T. and Fricke, W. (2011). Developmental pattern of aquaporin expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 4127-4142.

Boursiac, Y., Chen, S., Luu, T.D., Sorieul, M., Van-den Dries, N. and Maurel, C. (2005). Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology*, **139**: 790-805.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

Ekiz, H. and Yilmaz, A. (2003). Determination of the salt tolerance of some barley genotypes and the characteristics affecting tolerance. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **27**: 253-260.

FAOSTAT. (2007). FAO STAT. www.faostat.Fao.org.

FAO .(2013). Biodiversity: Agricultural biodiversity in FAO. www.fao.org/giews/countrybrief/country.jsp code IRN.

Forrest, K.L. and Bhave, M. (2008). The PIP and TIPaquaporins in wheat form a large and diverse family with unique gene structures and functionally important features. *Functional and Integrative Genomics*, **8**: 115-33.

Gao, R., Duan, K., Guo, G., Du, Z., Chen, Z., Li, L., He, T., Lu, R. and Huang, J. (2013). Comparative transcriptional profiling of two contrasting barley genotype under salinity stress during the seedling stage. *International Journal of Genomics*, **PMC972852**: 1-19.

Glenn, E.P., Brown, J.J. and Khan, M.J. (1997). Mechanisms of salt tolerance in higher plants.In: Basra, A.S. and Basra, R.K. (Eds). Mechanisms of environmental stress resistance in plants. Harwood Academic Publishers, pp. 83-110.

Gimeno, J., Eattock, N., Deynze, A.V. and Blumwald., E. (2014). Selection and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis in Switchgrass (*Panicum virgatum*) Using Quantitative Real-Time RT-PCR. *PLoS One*, **9(3)**: e91474.

Hassine, A.B., Ghanem, M.E., Bouzid, S. and Lutts, S. (2008). An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. *The Journal of Experimental Botany*, **59**: 1315-1326.

Horie, T., Kaneko, T., Sugimoto, G., Sasano, S., Panda, S.K., Shibasaka, M. and Katsuhara, M. (2011). Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Plant Cell Physiology*, **52**: 663-675.

Hove, R.M., Ziemann, M. and Bhave, M. (2015). Identification and Expression Analysis of the Barley (*Hordeum vulgare* L.) Aquaporin Gene Family. *PLoS One*,**10(6)**: e0128025.

Jiang, Q., Roche, D., Monaco, T. and Durham, S. (2006). Gas exchange, chlorophyll fluorescence parameters and carbon isotope discrimination of 14 barley genetic lines in response to salinity. *Field Crops Research*, **96**: 269-278.

Knight. H. and Knight, M.R. (2001). Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, **6**: 262-267.

Knipfer, T., Besse, M., Verdeil, J.L. and Fricke, W. (2011). Aquaporin-facilitated water uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 4115-4126.

Lefévre, I., Gratia, E. and Lutts, S. (2001). Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). *Plant Science*, **161**: 943-952.

Li, G., Santoni, V. and Maurel, C. (2014). Plant aquaporins: roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1840**: 1574-1582.

Li, G.W., Peng, Y.H., Yu, X., Zhang, M.H., Cai, W.M., Sun, W.N. and Su, W.A. (2008). Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporin's in response to various stresses in rice. *Journal of Plant Physiology*, **165**: 1879-1888.

Llanos, A., François, J.M. and Parrou, J.L. (2015). Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. *BMC Genomics*, **16**: 71-89.

Ligaba, A., Katsuhara, M., Shibasaka, M. and Gemechis, D. (2011). Abiotic stresses modulate expression of major intrinsic proteins in barley (*Hordeum vulgare*). *Comptes Rendus Biologies*, **334**: 127-139.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔct method. *Methods*, **25**: 402-408.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]

[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

Majnoon Hosseini, N. (2004). *Cereals Agronomy*. University of Tehran Press, Tehran, IR (In Persian).

Mosaddek, I., Dai, H., Zheng, W., Gao, F., Zhang, G. and Sun, D. (2013). Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, **63**: 49-60.

Pfaffle, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**: 1-45.

Poustini, K. (2000). Physiological responses of two varieties of wheat to salt stress. *Journal of Agricultural Sciences Iran*, **2**: 124-129.

QIAGEN. (2005). *Quantitative™ SYBR® Green PCR Handbook*. Health Research Institute Inc., New York, USA.

Sadder, M.T., Anwar, F. and Al-Doss, A.A. (2013). Gene expression and physiological analysis of Atriplex halimus (L.) under salt stress. *Australian Journal of Crop Science*, **7**:112-118.

Sakurai, J., Ishikawa, F., Yamaguchi, T., Uemura, M. and Maeshima, M. (2005). Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiology*, **46**: 1568-1577.

Shannon, M.C. (1985). Principles and strategies in breeding for higher salt tolerance. *Plant and Soil*, **89**: 227-241.

Tyerman, S.D., Niemietz, C.M. and Bramley, H. (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 171-173.

Ueda, A., Kanechi, M., Uno, Y. and Inagaki, N. (2003). Photosynthetic limitations of a halophyte sea aster (Aster tripolium L.) under water stress and NaCl stress. *Journal of Plant Research*, **116**: 65-70.

Ueda, A., Kathiresan, A., Inada, M., Narita, Y., Nakamura, T., Shi, W., Takabe, T. and Bennett, J. (2004). Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *Journal of Experimental Botany*, **55**: 2213-2218.

Vij, S. and Tyagi, A.K. (2007). Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal*, **5**: 361–380.

Walia, H., Wilson, C., Wahid, A., Condamine, P., Cui, X. and Close, T.J. (2006). Expression analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) during salinity stress. *Functional and Integrative Genomics*, **2**: 143-156.

Wan, H ., Yuan, W., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., Li, Z., Zhou, G., Yao, Z., Zhao, J., Liu, S. and Yang, Y. (2011). Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **416**: 24-30.

Wang, X., Li, Y., Ji, W., Bai, X., Cai, H., Zhu, D., Sun, X.L., Chen, L.J. and Zhu, Y.M. (2011). A novel Glycine soja tonoplast intrinsic protein gene responds to abiotic stress and depresses salt and dehydration tolerance in transgenic Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology*, **168**: 1241-8.

Widodo, J., Patterson, H., Newbigin, E., Tester, M., Basic, A. and Roessner, U. (2009). Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **6**: 4089-4103.

Witzel, K., Weidner, A., Surabhi, G.K., Born, A. and Mock, H.P. (2009). Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 3545-3557.

Yousif, B.S., Nguyen, N.T., Fukuda, Y., Hakata, H., Okamoto, Y., Masaoka, Y. and Saneoka, H. (2010). Effect of salinity on growth, mineral composition, photosynthesis and water relations of two vegetable crops: New Zealand spinach (*Tetragonia tetragonioides*) and water spinach (*Ipomoea aquatica*). *International Journal of Agriculture and Biology*, **12**: 211-216.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

Zaghdoud, C., Mota-Cadenas, C., Carvajal, M., Muries, B., Ferchichi, A. and Martinez-Ballesta. M.C. (2013). Elevated CO2 alleviates negative effects of salinity on broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica) plants by modulating water balance through aquaporin's abundance. *Environmental and Experimental Botany*, **95**: 15-24.

Zhao, F.G. andPie, Q. (2005). Protective effects of exogenous fatty acids on root tonoplast function against salt stress in barley seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, **53**: 215-223.

Zhu, C., Schraut, D., Hartung, W. and Schaffner, A.R. (2005). Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 2971-2981.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]

[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]

Expression Analysis of *Hv TIP2;3* and *Hv TIP4;1* in Sensitive and Tolerant Barley Genotypes Under Salinity Stress

Robab Salami[1,*], Seyed Abolghasem Mohammadi[2], Sara Ghafarian[3] and Mohammad Moghaddam[2]

1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
3- Assistant Professor, Department Biology, Faculty of Science, Shahid Madani Azarbijan University, Tabriz, Iran

(Received: January 15, 2016 – Accepted: March 07, 2016)

Abstract

Barley is the most salt tolerant cereal, and is grown in a wide range of climatic conditions. To improve the plant tolerance to salinity, expression analysis of genes involved in stress tolerance could be effective in identification and development of tolerant genotypes. In this study, for evaluation of salinity effect on expression of *Hv TIP2;3* and *Hv TIP4;1* genes (encoding channel proteins in the membrane) in roots of barley, three genotypes; Clipper (salt susceptible), Sahara3771 (salt tolerant) and advanced breeding line (a salt tolerant line derived from a cross between Kavir and Sahra cultivars) were planted under 0, 100 and 200 mM NaCl. To determine the expression differences of these genes, RNA was extracted from root samples harvested at 24 hours, 3 days and 3 weeks after applying salinity treatments and cDNA was generated. Analysis of variance revealed a significant difference among genotypes, salinity levels and sampling stages for *Hv TIP2;3* and *Hv TIP4;1* genes expression pattern, whereas genotype × salinity interaction for *Hv TIP2;3*and genotype × sampling stage interaction were significant for both of the studied genes. The expression of *TIP 2;3* gene in the 100 mM NaCl was increased in salt susceptible genotype Clipper and decreased in tolerant genotypes compared with control. Mean comparison of genotype and sampling combination showed that the expression level of *Hv TIP4;1* gene at 3 weeks after salinity stress was increased in Sahara and advanced breeding line and decreased in Clipper. According to the results, it was confirmed that these genes are affected by salinity stress, and effective utilization of this genes in the barley in order to increase salinity tolerance could lead to desirable results.

Keywords: Aquaporins, Expression pattern, Tonoplast intrinsic proteins, Barley, *Hv TIP2;3* and *Hv TIP4;1* genes

[*] **Corresponding Author, E-mail: r.salami1990@gmail.com**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.1.5]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.1]