

## بررسی تغییرات حجم واکوئل در سلول‌های مریستم نوک ریشه برنج (*Oryza sativa L.*) تحت تاثیر تنش شوری

Study of changes in volume of vacuole in meristem cells at root tip of  
rice (*Oryza sativa L.*) under saline conditions

سمیه قلیزاده<sup>۱</sup>، فواد مرادی<sup>۲</sup> و ایمان نعمتی<sup>۳</sup>

### چکیده

قلیزاده، س.، ف. مرادی و ا. نعمتی، بررسی تغییرات حجم واکوئل در سلول‌های مریستم نوک ریشه برنج (*Oryza sativa L.*) تحت تاثیر تنش شوری. مجله علوم زراعی ایران. ۱۳۸۸، ۱۱(۴): ۳۶۶-۳۵۳.

در این آزمایش تغییرات حجم واکوئل در سلول‌های منطقه مریستمی ریشه، سلول‌های کشت تعییقی و پرتوپلاست‌های سه رقم برنج شامل IR29 (رقم حساس به شوری) و اهلی طارم و IR651 (ارقام متحمل به شوری) تحت تاثیر تیمارهای مختلف شامل ۱/۰ مولار نمک کلرید سدیم، ۰/۰۰۰ مولار مانیتول، ۰/۰۰۰۰۰ مولار بافیلومایسین A1، ۰/۰۰۰۰۰۰ مولار کلرید سدیم همراه با ۰/۰۰۰۰۰۰ نانومولار بافیلومایسین A1 و آب مقطر (شاهد) قرار داده شدند. پس از ۳، ۸ و ۲۴ ساعت اعمال تیمارها، نمونه برداری انجام شد و تغییرات حجم واکوئل آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در ارقام متحمل به شوری افزایش در حجم واکوئل تنها در تیمار کلرید سدیم اتفاق افتاد. تیمار سلول‌ها با محلول مانیتول با اسماولاریته مشابه با ۰/۰۰۰۰۰ مولار کلرید سدیم نیز تغییرات مشخصی را در حجم واکوئل ایجاد نکرد. به نظر می‌رسد که افزایش حجم واکوئل ناشی از اثرات ویژه نمک می‌باشد. بعلاوه بافیلومایسین A1 از افزایش حجم واکوئلی که در اثر تیمار کلرید سدیم به وجود آمده بود، به طور کامل جلوگیری کرد که دلالت بر نقش اساسی-V ATPase در ایجاد انرژی برای فعالیت آنتی پورتر  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  و تسهیم واکوئلی سدیم در سلول‌های برنج دارد.

واژه‌های کلیدی: بافیلومایسین A1، برنج، پمپ V-ATPase، تنش شوری و مریستم نوک ریشه.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۵/۲۸

۱- مری دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرمشهر

۲- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج (مکاتبه کننده)

۳- مری دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرمشهر

## مقدمه

(Rubisco large subunit1) RbcL و dehydrogenase) افزایش و تعدادی دیگر مانند SOD [Cu-Zn] سیتوزولی (Rubisco large subunit) RuBisCo LS و کاهش (Salekdeh and Komatsu, 2007)، که خواهند یافت (Lacerda *et al.*, 2003; Munns, 2002). می‌گیرد (Munns *et al.*, 2006) تحمل مونس و همکاران (2006) تحمل به تنفس شوری در غلات را در چند سازوکار شامل محدود سازی ورود نمک، تحمل سازوکار (Tissue tolerance)، کده بنده بافت (Salt compartmentation) و دفع نمک (Salt execution)، تحمل به تنفس اکسیداتیو و تنظیم اسمزی طبقه نموده‌اند.

تنظیم اسمزی در گیاهان عالی به معنای حفظ فشار آماس به وسیله کاهش پتانسیل اسمزی، در اثر افزایش تجمع املاح خاص (قند های احیاء، آمینو اسید های آزاد، پروولین، مالات، سیترات، ترکیبات آمونیومی چهارتایی،  $K^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $Na^+$  و  $Cl^-$ ) در واکنش به کمبود آب می‌باشد. بعضی از گیاهان با کاهش پتانسیل اسمزی قادر به تحمل خشکی و شوری (خشکی Hasegawa *et al.* می‌باشند (2000; Serraj and Sinclair, 2002 مشخص شده است که سلول‌ها در طی تنظیم اسمزی، هم‌مان با سنتر و تجمع محلول‌های آلی سازگار در سیتوپلاسم، تمايل به تجمع یون‌های جذب شده، در واکوئل‌های خود دارند تا تعادل اسمزی بین این دو بخش (واکوئل و سیتوپلاسم) حفظ شود (Hasegawa *et al.*, 2000). در این صورت دو مزیت برای سلول تحت تنفس شوری به وجود می‌آید؛ از یک طرف سدیم و کلر به لحاظ انرژی مصرف شده، اسمولایت‌های مناسبی برای تنظیم اسمزی محسوب می‌شوند و از طرف دیگر، تسهیم واکوئلی این دو یون، سمیت ایجاد شده در سیتوپلاسم را به حداقل می‌رسانند (Blumwald *et al.*, 2000). غلظت بالای یون‌ها در

در حدود ۴۰ درصد از زمین‌های کشاورزی در سرتاسر جهان با مشکل شوری مواجه است (Gorham, 1992). در حالی که انتظار می‌رود، جمعیت زمین‌های دنیا یعنی حدود ۲۰۲۵ به ۸/۵ میلیارد نفر برسد، افزایش سریع تقاضا برای تولید مواد غذایی امری اجتناب ناپذیر می‌باشد (Ghassemi *et al.*, 1995). شوری ۷ درصد از زمین‌های دنیا یعنی حدود ۹۳۰ میلیون هکتار را تحت تاثیر قرار داده و روز به روز این مناطق شور در حال گسترش می‌باشند. مطالعات جهانی نشان داده که بهره برداری از اراضی کشاورزی در طی ۴۵ سال گذشته باعث شور شدن ۶ درصد از آنها شده است. بر اساس آمارهای موجود، ایران پس از هند چین و پاکستان بیشترین درصد اراضی شور را در سطح جهانی دارد (Kafi, 2008). از این رو، نیاز به تولید ژنوتیپ‌های متحمل به شوری در گیاهان الزامی است تا از طریق به زیر کشت بردن اراضی شور و افزایش تولید در این مناطق بتوان تقاضای رو به گسترش مواد غذایی را برآورده نمود. دستیابی به این هدف از طریق اصلاح نباتات، نیازمند شناخت صحیح صفات فیزیولوژیک موثر در تحمل به شوری است تا بر اساس شناسایی به نقش این صفات در تحمل به شوری به ژنوتیپ‌های جدید تولید شوند.

در اکثر خاک‌های شور، سدیم و کلر یون‌های غالب بوده که معمولاً مقدار آنها بیش از نیاز گیاه می‌باشد. مقدار بیش از حد نمک‌های محلول در محیط اطراف ریشه موجب تنفس اسمزی می‌شود که ممکن است باعث اختلال در روابط آبی گیاه، اختلال در جذب و مصرف عناصر ضروری و همچنین تجمع یون‌های سمی شود. در نتیجه چنین تغییراتی، پروتئین‌هایی مانند ADF4 (Actin depolymerizing factor 4) که در حالت عادی در گیاه دیده نمی‌شوند، ظاهر خواهند یافت، در حالیکه بیان تعدادی دیگر مانند (IMP RP-10, Superoxide dismutase) SOD [Mn]

روابط آبی درون سلول نیز کمک نموده است. V-ATPase به دسته منحصر بفردی از پمپ‌های پروتونی تعلق دارد که روی غشای چندین اندامک اسیدی در سلول‌های یوکاریوتی، غشای واکوئلی گیاهان عالی، قارچها و محمرها یافت می‌شود (Barkla *et al.*, 1995). بافیلومایسین A1، کونکانامایسین C (Concanamycin C) و نیترات به عنوان بازدارنده‌های اختصاصی V-ATPase مورد استفاده قرار می‌گیرند (Maeshima, 2001). افزایش در فعالیت  $H^+$ -ATPase تونوپلاست در پاسخ به کلرید Matsomoto and Chung (1988)، Reuveni *et al.* (1988)، کشت تعليق سلولی توتوون (Nakamora *et al.*, 1992)، ریشه‌های نوعی لوبيا (Barkla *et al.*, 1995)، ریشه‌های گل یخ (Ballesteros *et al.*, 1996) و دیگر گیاهان (Mimura *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001) شده است.

با توجه به این که، چندین ژن ناقل  $Na^+/H^+$  در برنج گزارش شده است (Fukuda *et al.*, 2004)، هدف از آزمایش حاضر شناسایی فعالیت احتمالی پمپ پروتونی V-ATPase و تجمع واکوئلی سدیم تحت تاثیر تنش کلرید سدیم در سلول‌های مریستمی ریشه، کشت تعليق سلولی و پروتوبلاست‌های برنج از طریق بررسی تغییرات حجم واکوئل و کاربرد بافیلومایسین A1 به عنوان بازدارنده اختصاصی این آنزیم بوده است.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

آزمایش حاضر با استفاده از سه رقم برنج شامل اهلی طارم و IR651 (متحمل به شوری) و IR29 (حساس به شوری) در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی صورت گرفت. بنور رسیده رقم ایرانی اهلی طارم از موسسه تحقیقات برنج رشت و IR29 و IR651 از موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI) تهیه

واکوئل باعث کاهش پتانسیل اسمزی در این اندامک می‌شود که در نتیجه آن آب از محیط اطراف واکوئل به درون آن انتقال می‌یابد. در پی این عمل افزایش حجم واکوئل در طی رشد سلول صورت می‌گیرد. از آنجایی که رشد سلول گیاهی در ابتدا، به علت انبساط مستقیم با افزایش در حجم واکوئل رخ می‌دهد، تسهیم  $Na^+$  و  $Cl^-$  تنظیم اسمزی را تسهیل می‌کند که برای نمو سلول ضروری می‌باشد (Yokoi *et al.*, 2002). سلول‌های گیاهی تیمار شده با شوری بالا می‌باشد نسبت بالاتری  $K^+/Na^+$  را در سیتوپلاسم حفظ کرده و از طریق تجمع یون سدیم در واکوئل‌ها، تعادل اسمزی خود را با محیط اطراف کنترل نمایند. تصور می‌شود که ناقل واکوئلی  $Na^+/H^+$  که در تونوپلاست قرار دارد، نقش مهمی را در این فرآیندها ایفا نماید. گیاهان آراییدوپسیس و گوجه‌فرنگی تاریخته که ژن *AtNHx1* را به شدت بیان می‌کنند، مقادیر فراوانی از این ناقل را در تونوپلاست (غشای واکوئل) سلول‌های خود اباشته کرده و تحمل به شوری بسیار بالایی را نشان می‌دهند (Zhang and Blumwald, 2001). توانایی انتقال  $Na^+/H^+$  سیتوپلاسم به داخل واکوئل از طریق ناقل تونوپلاست وابسته به فعالیت  $H^+$ -ATPase و واکوئلی (V-ATPase, EC 3.6.1.3) و پیروفسفاتاز معدنی  $H^+$ -واکوئلی (V-PPase, EC 3.6.1.1) می‌باشد، زیرا فعالیت این دو با انتقال پروتون به طرف غشاء، شبکه‌کتروشیمیایی لازم را ایجاد می‌کنند (Fricke, 2004). فریک (Binzel and Ratajczak, 2001) گزارش کرد، هنگامی که گیاه متحمل جو را در معرض کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار قرار داد، پس از ۲۴ ساعت تنها ۳۸ و ۴۹ میلی مولار سدیم به ترتیب در سلول‌های مزووفیلی و اپیدرمی در حال رشد جو دیده شد که این میزان سدیم نیز تاثیری معنی داری بر رشد این سلول‌ها نداشت. وی همچنین افزود که سدیم جذب شده در درون واکوئل‌های در حال توسعه کده بندی شده و علاوه بر کمک به تنظیم اسمزی درون سلولی، به تعادل

۳۵ درصد فیتاژل و  $pH=5/8$  همانند رقم ایرانی صورت گرفت.

#### تهیه و نگهداری کشت تعلیق سلولی

۵۰۰ میلی گرم از کالوس‌های جنین‌زای ارقام اهلمنی طارم و IR29 به داخل فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری محتوی ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع R2 به ترتیب حاوی ۲ و  $2/5$  میلی گرم بر لیتر ۲,4-D منتقل شدند. فلاسک‌ها بر روی تکان دهنده با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. واکشت‌ها هر دو روز یک بار در هفته اول و واکشت‌های بعدی هر هفته یک بار انجام شد. در این مرحله، توده سلولی کوچکی که به صورت خوش‌های با لبه‌های گرد و صاف که سلول‌های آن غنی از سیتوپلاسم بود، بدست آمد. این توده‌ها به محیط کشت تازه انتقال داده شد. به منظور نگهداری کشت تعلیقی، واکشت‌ها به طور مرتب هفت‌های یکبار انجام شد. تهیه و نگهداری کشت تعلیق سلولی در رقم IR651، در محیط پایه AA همراه با ۳ میلی گرم بر لیتر ۲,4-D (AA3) و همانند روش بالا انجام شد.

#### تعیین الگوی رشد کشت تعلیق سلولی

به منظور تعیین الگوی رشدی کشت تعلیق سلولی و زمان مناسب واکشت‌ها، هر یک روز در میان، نسبت وزن ترسلول به وزن خشک سلول اندازه گیری شد. برای تعیین وزن ترسلول‌ها، ۵ میلی لیتر از محیط کشت تعلیق سلولی روی یک کاغذ صافی ریخته و تحت شرایط خلا قرار داده شده و بلا فاصله پس از آن توزیین شد. برای تعیین وزن خشک سلول‌ها، توده سلولی در دمای ۶۵-۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت خشکانیده شده و سپس توزیین شد.

#### خلاصه سازی پروتوبلاست

به منظور تولید پروتوبلاست، یک گرم از کالوس‌های جنین‌زای کشت‌های تعلیقی ۴ ماهه به داخل ۲۰ میلی لیتر از محلول آنزیمی (یک درصد سلولاز RS، ۱۰ درصد پکتولیاز ۲۳-Y)

شدند. بذر ارقام مختلف برنج، پس از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه و شستشو با آب مقطر قرارداده شدند. سپس به منظور جوانه زنی در داخل ظروف پتروی روی کاغذ صافی مربوط (واتمن شماره ۲) قرارداده شده و در دمای ۳۰/۲۵ درجه سانتیگراد (شب / روز)، طول روشنایی ۱۲ ساعت و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در ژرمیناتور جوانه دار شدند.

#### تهیه نمونه از سلول‌های مویستمی نوک ریشه

ابتدا سلول‌های منطقه کلاهک نوک ریشه در زیر لوپ قطع و حذف شد. سپس ریشه‌ها به مدت (۲۰-۳۰) دقیقه در محلول ۱/۰۱ درصد رنگ قرمز خنثی قرار داده شدند. منطقه مویستم نوک ریشه به طول ۳-۵ میلی‌متر قطع و قطعه حاصل پس از اعمال تیمار آنزیمی شامل سلولاز ۱۰-R دو درصد، ماسروزا ۱۰-R دو درصد و پکتولیاز ۲۳-Y (یک درصد) به مدت ۲۰ دقیقه، بر روی لام شیشه‌ای قرار داده شد و سپس با قرار دادن لام بر روی آن و با فشار ملایم انگشت شست، به آرامی اسکواش شده و لایه سلولی نازکی بدست آمد.

#### تولید کالوس

پس از ضد عفونی بذرها با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد همراه با دو قطره توین ۲۰ به مدت ۴۵-۶۰ دقیقه در شرایط خلاء، بذر رقم اهلمنی طارم در ظروف پتروی (۱۵×۱۰۰ میلی‌متری) محتوی محیط کشت پایه N6 همراه با ۲ میلی گرم بر لیتر ۴,2-D و  $0/2$  میلی گرم بر لیتر BAP، ۳ درصد ساکارز، ۰/۳۵ درصد فیتاژل و  $pH=5/8$  کشت و در اتاق‌ک تاریک در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از ۴-۳ هفته کالوس‌های جنین‌زا در همین محیط واکشت شدند و واکشت‌های بعدی به منظور نگهداری کالوس‌ها، هر دو هفته یکبار صورت گرفت. تولید کالوس در ارقام IR29 و IR651 در محیط MS به ترتیب در تیمار شامل ۲/۵ و  $3/5$  میلی گرم بر لیتر ۲,4-D، ۳ درصد ساکارز،

پروتوبلاست‌ها بالافاصله پس از استخراج آن، اعمال شده و طی زمان‌های ۳، ۸ و ۲۴ ساعت بعد، نمونه‌گیری‌ها با ۴ تکرار انجام شد. از سلول‌های مریستمی به روش ذکر شده در بالا نمونه تهیه شد و تغییرات اندازه واکوئل در آنها با استفاده از عدسی ۴۰ میکروسکوپ نوری (Nikon, Tokyo Japan) مشاهده شد. همچنین تغییرات حجم واکوئل در سلول‌های منفرد کشت تعليقی و پروتوبلاست‌ها پس از رنگ‌آمیزی با محلول قرمز خشی ۰/۰۱ درصد، با استفاده از عدسی ۴۰ میکروسکوپ معکوس (Nikon, Tokyo Japan)، مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات اندازه واکوئل با استفاده از دوربین (PCM2000، Nikon, Tokyo Japan) که بر روی میکروسکوپ نصب شده بود و با کمک نرم افزار Act1، مشاهده و عکس‌برداری شد. پس از اندازه‌گیری قطر واکوئل‌ها با استفاده از نرم افزار Micro measure (۵۰ واکوئل به ازای هر تکرار)، حجم واکوئل بر اساس میانگین قطرها در چهار تکرار توسط نرم افزار Excel برآورد شد. نتایج حاصل به صورت SE ± میانگین ارائه شد.

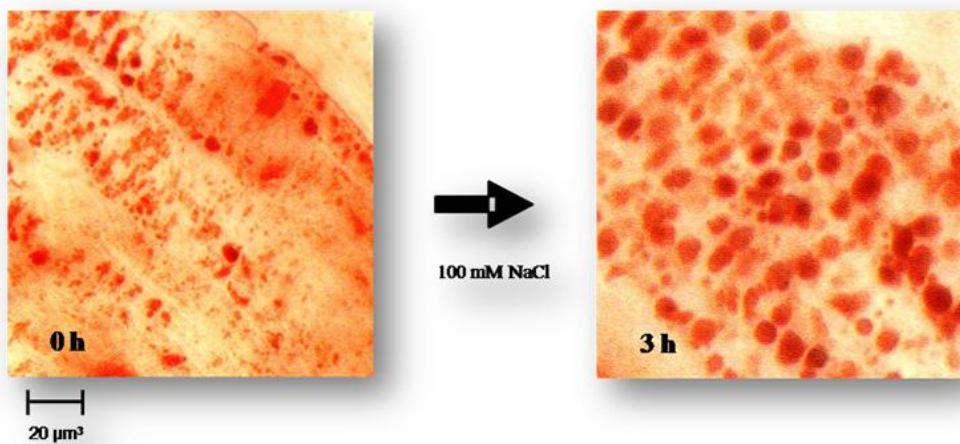
## نتایج و بحث

افزایش حجم واکوئل در سلول‌های مریستمی (سلول‌های منطقه تقسیم و منطقه در حال طویل شدن) ریشه برنج رقم IR651 سه ساعت پس از اعمال تیمار ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم در شکل یک ارائه شده است. سلول‌های مریستمی قبل از تیمار شوری حاوی واکوئل‌های کوچکی بودند که ۳ ساعت پس از اعمال تنفس کلرید سدیم به صورت معنی‌داری افزایش حجم یافتند. در سلول‌های منطقه تقسیم، بخش بسیار کوچکی از حجم سلول توسط واکوئل‌ها اشغال شده و اندازه‌گیری تغییرات حجم در واکوئل‌های آنها، آسان‌تر بود. همچنین این سلول‌ها با آوندهای چوبی ارتباط داشته و در صورتی که قادر به تجمع نمک در

منتقل شد. مخلوط آنزیم و سلول‌ها بر روی تکان دهنده افقی با ۳۰–۴۰ دور در دقیقه در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲–۲۰ ساعت نگهداری و سپس به مدت یک ساعت در تاریکی به حالت ساکن قرار داده شد. برای جداسازی سلول‌هایی که دیواره‌شان هضم نشده بود، مخلوط پروتوبلاست و آنزیم از صافی نایلونی ۴۵ و ۲۵ میکرونی استریل عبور داده شد. سپس محلول آنزیمی و پروتوبلاست‌ها به داخل فالکون‌های استریل انتقال یافته و در ۸۰۰–۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته و پروتوبلاست‌ها با اضافه نمودن ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشوی پروتوبلاست (CPW) مجدداً سانتریفیوژ گردید و این عمل دو بار دیگر تکرار شد و پس از حذف کامل محلول آنزیمی، پروتوبلاست‌ها در CPW محلول نگهداری شد. محلول‌های ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم و ۲۰۰ میلی مولار مانیتول تهیه شده و پتانسیل اسمزی آنها با استفاده از دستگاه اسمومتر مدل Wescoe-5520، USA تنظیم شد.

برای تهیه محلول بافیلومایسین A1 ۲۰ نانومولار، به ظرف حاوی ۱۰ میکرو گرم بافیلومایسین A1 مقدار یک میلی لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه شده و به صورت محلول ذخیره در دمای ۲۰–درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Bowman *et al.*, 1988). سپس براساس وزن مولکولی بافیلومایسین A1 (۶۲۲/۸۴ گرم) ۱۲۴ میکرولیتر از محلول تهیه شده در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. در این روش میزان نهایی DMSO نباید بیشتر از یک درصد باشد.

تیمارهای مختلف شامل شاهد (آب مقطر)، کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار، مانیتول هم اسمز با کلرید سدیم ۲۰۰ میلی مولار، بافیلومایسین A1 با غلظت ۲۰ نانومولار (BAF) (محلول در DMSO) و بافیلومایسین همراه با کلرید سدیم (BAF+NaCl) در غلظت‌های مذکور، بر ریشه جوانه‌های سه روزه، کشت‌های تعليق سلولی ۴ ماهه در مرحله حداکثر منحنی رشد و

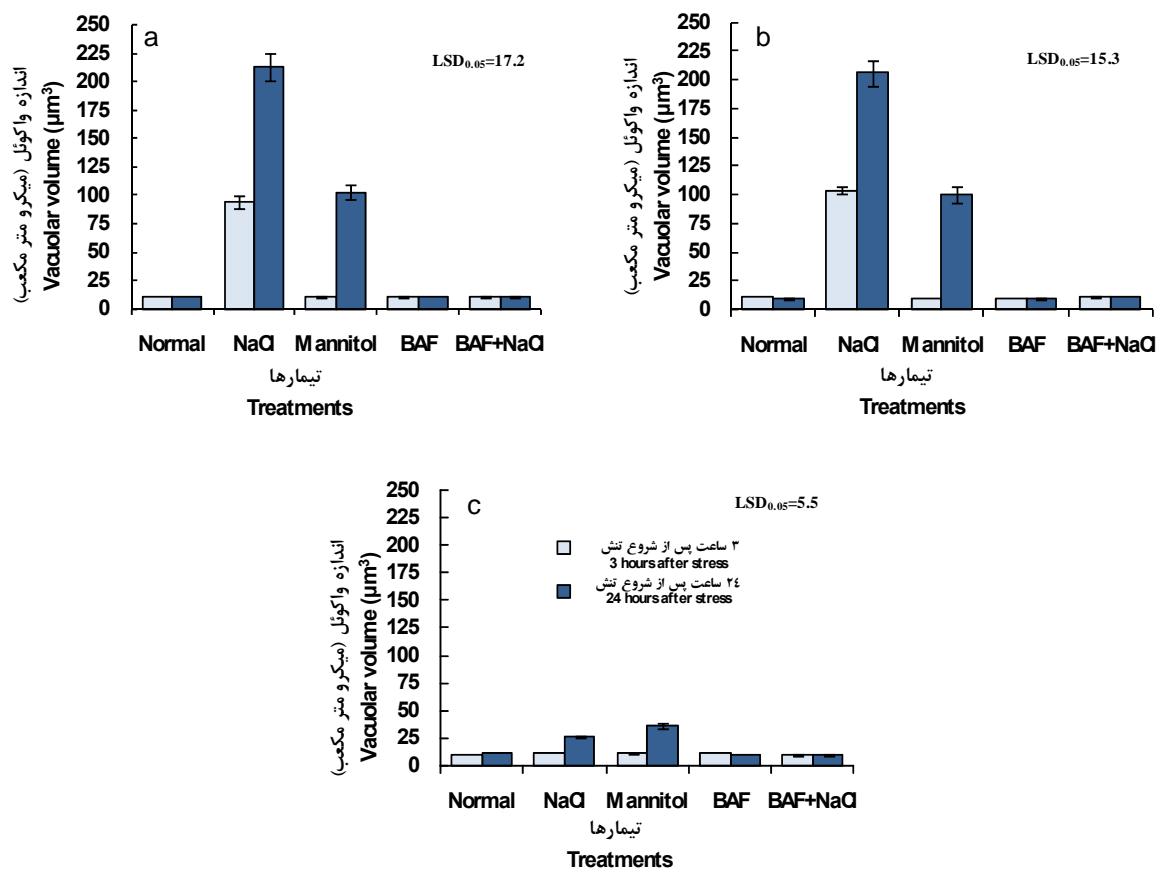


شکل ۱- افزایش سریع حجم واکوئل سلول های در حال طویل شدن نوک ریشه برنج رقم IR651 در تیمار ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم. سلول ها با استفاده از رنگ قرمز خشی رنگ آمیزی شده اند

Fig. 1. Rapid expansion in vacuolar volume of elongating cells in root tips of rice cv. IR651 in 100 mM NaCl treatment. Cells were stained with natural-red dye

مریستم ریشه این رقم دیده شد. این داده ها حاکی از افزایش حجم ۲/۵ برابری واکوئل ها در تیمار کلرید سدیم ۰/۵- مگاپاسکال و افزایش ۳/۵ برابری حجم واکوئل ها در تیمار مانیتول هم اسmez با کلرید سدیم پس از ۲۴ ساعت بوده است (شکل ۲). به نظر می رسد که افزایش حجم واکوئل مشاهده شده در ۳ ساعت اولیه، در ارقام متحمل IR651 و اهلی طارم) مختص به تنش کلرید سدیم بوده است، زیرا تیمار مانیتول با پتانسیل اسمزی یکسان با کلرید سدیم، تفاوت معنی داری با شاهد نداشت (شکل ۲). در این آزمایش، چون تیمارهای کلرید سدیم و مانیتول دارای پتانسیل اسمزی مشابه بودند، می توان اطمینان داشت که هر دو تیمار، تنش اسمزی یکسانی بر سلول های منطقه مریستمی نوک ریشه اعمال نموده اند و بنابراین تفاوت افزایش حجم ایجاد شده بین دو تیمار، ناشی از اثر ویژه یون های  $\text{Na}^+$  و  $\text{Cl}^-$  بوده است. به نظر می رسد که تجمع این دو یون در واکوئل باعث کاهش پتانسیل اسمزی محلول درون واکوئل شده که به تبع آن آب بیشتری به درون این اندامک

واکوئل های خود باشند، می توانند به سرعت با محلول نمک که به آوند چوبی وارد می شود، افزایش حجم دهنند (Binzel and Ratajczak, 2001). مشاهده واکوئل های در حال بزرگ شدن تاییدی بر وجود این سازوکار در سلول ها می باشد (Fukuda *et al.*, 2004). همان طور که در شکل ۲ (b) و (a) نشان داده شده است، تنش شوری در سلول های مریستمی دو رقم IR651 و اهلی طارم پس از ۳ ساعت، موجب افزایش ۱۰ برابری حجم واکوئل ها شد، در حالی که تیمار مانیتول (تش خشکی) هم اسmez با کلرید سدیم در مقایسه با شاهد، تفاوت معنی داری در آنها بوجود نیاورد. در هر دو رقم، ۲۴ ساعت پس از اعمال کلرید سدیم و مانیتول، حجم واکوئل ها به ترتیب ۲۰ (۱۰ به ۲۰۰ میکرو متر مکعب) و ۱۰ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. در سلول های مریستمی رقم حساس به شوری IR29 طی سه ساعت پس از اعمال تیمارهای کلرید سدیم و مانیتول، تفاوت معنی داری با شاهد مشاهده نشد، در حالیکه ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمارهای مختلف، تغییرات حجم واکوئل در سلول های منطقه



شکل ۲- تغییر حجم واکوئل سلول های نوک ریشه برنج به ترتیب (a) IR651، اهلمنی طارم (b) و (c) در تیمار های شاهد، کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار، مانیتول، بافیلومایسین و بافیلومایسین + کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار. سلول ها با استفاده از رنگ قرمز خنثی رنگ آمیزی شده اند. مقدار  $17.5 = \text{LSD}_{0.05}$  میکرو متر مکعب است.

Fig. 2. Vacuolar volume expansion changes in root tip cells of IR651, Ahlami tarom and IR29 root tips respectively under normal, NaCl (100mM), Mannitol, Bafilomycin and Bafilomycine + NaCl (100 mM) . Cells were stained with natural-red dye.  $\text{LSD}_{0.05}=17.5 \mu\text{m}^3$ .

کلرید سدیم و مانیتول طی ۲۴ ساعت نشان می دهد که تنها تغییر روابط آبی درون سلول و تنفس اسمزی باعث بروز این تغییرات شده و این موضوع ارتباطی با تجمع واکوئل سدیم و کلر نداشته است. تفکیک واکوئل  $\text{Na}^+$  یک سازو کار موثر برای جلوگیری از سمیت سدیم می باشد که طی فرایند تکامل، در ارقام متحمل به وجود آمده است. (Blumwald *et al.*, 2000; Zhu, 2001)

نشان ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم بر کشت های تعلیقی و پرتوپلاست های رقم IR651 و اهلمنی طارم نیز باعث افزایش حجم واکوئل ها شد و تفاوت معنی داری

جذب و باعث افزایش حجم ۱۰ برابری آن شده است. میمورا و همکاران (Mimura *et al.*, 2002) پدیده مشابهی را در سلول های مریستمی ریشه جو (*Hordeum vulgare* L.) تحت تاثیر نشان دادند که توسط تیمار کلرید سدیم و مانیتول پس از ۲۴ ساعت دیده شد، به احتمال زیاد ناشی از تنظیم اسمزی به منظور مقابله با نشان خشکی ۰/۵-۰/۵ مگا پاسکال حاصل از تیمار کلرید سدیم و مانیتول بوده است.

افزایش ۲/۵ و ۳/۵ برابری حجم واکوئل در سلول های مریستمی رقم IR29 به ترتیب در تیمار های

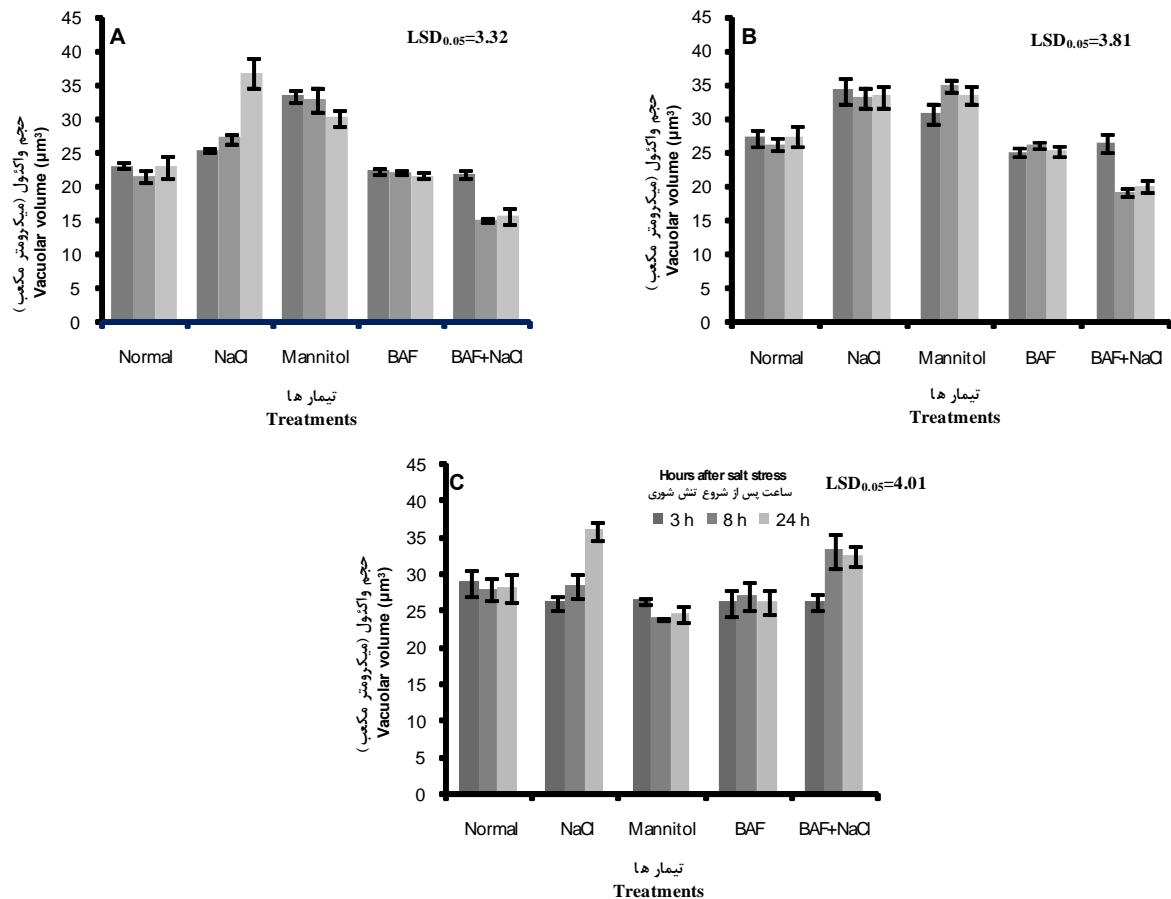
واکوئل‌ها شد. به عبارت دیگر، BAF به طور کامل از افزایش حجم واکوئل که در پی تیمار کلرید سدیم در ارقام متحمل مشاهده شد، جلوگیری کرد. بافیلومایسین V-ATPase A1 بازدارنده بسیار موثر (Bowman *et al.*, 1988) می‌باشد. باومن و همکاران (1988) گزارش کردند که غلظت ۱۰ نانومولار BAF، فعالیت آنزیم ATPase واکوئلی را متوقف می‌کند. در آزمایش حاضر نیز احتمالاً تاثیر بازدارنده‌گی BAF بر V-ATPase، به طور معنی‌داری از افزایش حجم واکوئل جلوگیری کرد. مشاهده کاهش معنی‌دار حجم واکوئل‌ها در سلول‌های تحت تیمار کلرید سدیم علاوه بافیلومایسین A1، می‌تواند نقش کلیدی  $H^+$ -ATPase واکوئلی را در امکان پمپ کردن یون‌ها به درون واکوئل توجیه کند، زیرا انتقال فعال ثانویه یون سدیم به داخل واکوئل از طریق آنتی‌پورتر  $Na^+/H^+$  تونوپلاست، توسط نیروی محرك پروتون که به وسیله فعالیت V-ATPase و یا V-PPase ایجاد می‌شود، انرژی می‌گیرد.

گزارش شده است که فعالیت V-ATPase تحت تاثیر تنفس شوری افزایش می‌یابد (Dietz *et al.*, 2001). ماتسوموتو و چونگ (Matsomoto and Chung, 1988) با آزمایش روی ریشه‌های جو در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، گزارش کردند که سرعت انتقال  $H^+$  در V-ATPase دو برابر شد. ناکامورا و همکاران (Nakamora *et al.*, 1992) با اندازه‌گیری فعالیت هیدرولیزی V-ATPase در ریشه‌های نوعی لویبا تحت تاثیر تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، افزایش ۱/۴ و ۱/۳ برابری را در فعالیت V-ATPase طی ۳ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار شوری گزارش نمود. پژوهشگران زیادی سطوح بیان زیرواحدهای V-ATPase را تحت تاثیر تنفس شوری مطالعه کرده و افزایش ظاهر برخی از زیرواحدها را گزارش نموده‌اند (Ballesteros *et al.*, 1996; Berndt *et al.*, 1999; Bremberger and Luttge, 1992; Perera *et al.*, 1995).

از آنجایی که تیمار شوری باعث افزایش حجم

(در سطح ۵ درصد) نسبت به شاهد داشت (شکل‌های ۳ و ۴، a و b). بینزل و همکاران (Binzel *et al.*, 1985; 1988) گزارش کردند که، اندازه واکوئل سلول‌های کشت تعیقی توتوون تحت تاثیر تیمار شوری افزایش داشت. میمورا و همکاران (Mimura *et al.*, 2002) نیز افزایش حجم واکوئل را در تنفس شوری در سلول‌های کشت تعیقی و پروتوبلاست‌های درختان مانگرو گزارش کردند. در کشت‌های تعیق سلولی و پروتوبلاست‌های هر دو رقم متحمل، تیمار مانیتول همانند کلرید سدیم موجب افزایش ۳۰ درصد حجم واکوئل‌ها شد (شکل‌های ۳ و ۴). افزایش مشابه در حجم واکوئل در پی اعمال تیمار مانیتول و کلرید سدیم احتمالاً در اثر سازوکارهای مرتبط با تغییر روابط آبی سلول ایجاد شده است، زیرا هر دو تیمار پتانسیل اسمزی ۰/۵-۰/۵ مگاپاسکال بر سلول‌های منفرد کشت تعیق سلولی و پروتوبلاست‌ها وارد می‌کنند. بهر حال باید توجه داشت که کشت‌های تعیقی سلولی در محیط‌های نمکی رشد می‌کند که حاوی مقادیر قابل توجهی از یون‌های سدیم و پتاسیم می‌باشد و علاوه بر آن محیط CPW که برای نگهداری پروتوبلاست به کار می‌رود، حاوی مقادیر قابل توجهی از یون پتاسیم است. جذب  $Na^+$  و  $K^+$  از محلول غذایی می‌تواند باعث بهبود سریع تورژسانس در سلول‌های تعیقی و پروتوبلاست‌های تحت تنفس اسمزی شود. تنفس شوری بر IR29 کشت‌های تعیق سلولی و پروتوبلاست‌های رقم (حساس به شوری)، موجب افزایش ۲۵ درصدی حجم واکوئل‌ها شد. در حالی که تیمار مانیتول هم اسمز با آن تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان نداد.

تیمار BAF در سلول‌های مریستمی، کشت تعیقی و پروتوبلاست‌های حاصل از ارقام حساس و متحمل تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. همچنین این تیمار در کشت‌های تعیق سلولی و پروتوبلاست‌های IR651 و اهلمنی طارم باعث کاهش ۳۵ درصدی حجم

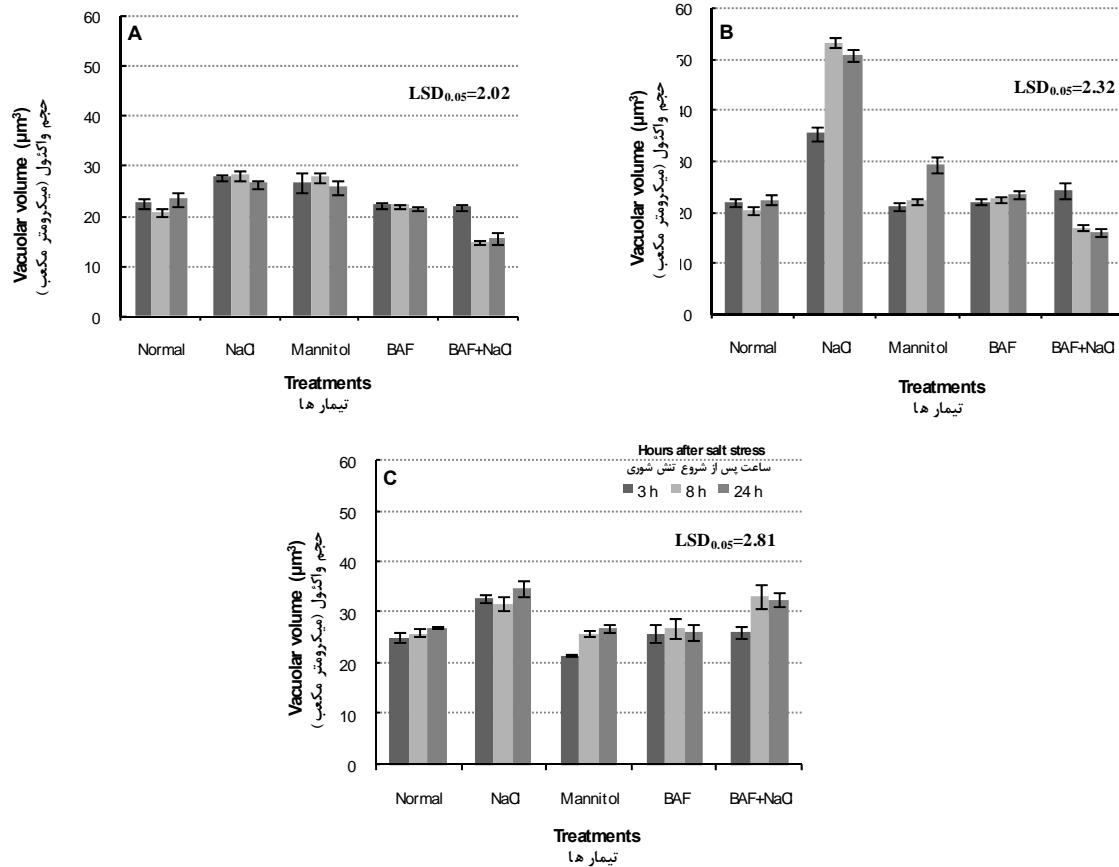


شکل ۳- تغییر حجم واکوئل سلول های کشت تعليقی حاصل از به ترتیب (A) IR651، اهلمنی طارم (B) و (C) IR29 در تیمار های شاهد، کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار، مانیتول، بافیلومایسین (BAF) و بافیلومایسین + کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار (BAF+NaCl). خطوط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد می باشند. مقدار  $LSD_{0.05} = 6/25 = 6.25 \mu\text{m}^3$  میکرومتر مکعب است.

Fig. 4. Vacuolar volume expansion changes in of derived cell suspension culture from IR651 (a), Ahlami tarom (b) and (c) IR29 respectively under normal, NaCl (100mM), Mannitol, Bafilomycin (BAF) and Bafilomycine + NaCl (100 mM) (BAF+ NaCL) . Vertical bars indicating standard error.  $LSD_{0.05}=6.25 \mu\text{m}^3$ .

بود، به نظر می رسد که در این رقم افزایش حجم واکوئل تحت تاثیر تیمار بافیلومایسین قرار نمی گیرد. از این رو احتمالاً می توان بخشی از فرآیند پمپ شدن  $\text{H}^+$  به داخل واکوئل را ناشی از فعالیت پمپ های دیگر موجود در غشاء تونوپلاست و یا نقش پر اهمیت کانال های  $\text{K}^+$  محسوب کرد. هر چند روشن شدن این موضوع نیاز به تحقیق بیشتری دارد. نظر به اینکه افزایش حجم واکوئل در سطح مریستم، کشت های تعليقی و پروتونپلاست ها تنها در ارقام متحمل به شوری و در

سلول های کشت تعليقی و پروتونپلاست های حاصل از IR29 شد، لذا بررسی نحوه تغییرات حجم این سلول ها تحت تاثیر تیمار BAF+NaCl نیز لازم به نظر می رسد. همان طور که شکل ۳ (c) و ۴ (c) مشخص است، تک سلول های کشت تعليق سلولی و پروتونپلاست های این لاین در تیمار BAF+NaCl نیز همانند تیمار کلرید سدیم افزایش حجم واکوئل نشان دادند. با توجه به اینکه مقدار افزایش حجم مشاهده شده در هر دو تیمار نیز به یک اندازه (از ۲۵ به حدود ۳۵ میکرومتر مکعب)



شکل ۴- تغییر حجم واکوئل پروتوپلاست های حاصل از به ترتیب (a) IR651، اهلمنی طارم (b) و (c) IR29 تیمارهای شاهد، کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار، مانیتول، بافیلومایسین، بافیلومایسین + کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار. خطوط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد می باشند. مقدار  $3/23 = \text{LSD}_{0.05}$  میکرومتر مکعب است.

Fig. 6. Vacuolar volume expansion changes in of protoplasts derived from IR651 (a), Ahlami tarom (b) and (c) IR29 respectively under normal, NaCl (100mM), Mannitol, Bafilomycin and Bafilomycine + NaCl (100 mM). Vertical bars indicating standard error.  $\text{LSD}_{0.05}=3.23 \mu\text{m}^3$ .

V-ATPase می باشد که به صورت متفاوتی در ارقام مختلف و در پاسخ به تشنج های یونی و اسمزی بیان می شوند و یا به علت نقش حمایت گر آنزیم V-PPase در حفظ فعالیت پمپ شدن  $\text{H}^+$  واکوئلی می باشد که لزوم بررسی هر یک از موارد فوق احساس می شود. به نظر می رسد که در ارقام متحمل برنج این سازوکار بتواند طی ساعت اولیه، گیاه را از اثرات مضر شوری حفظ کرده و فرست کافی برای تولید محلول های سازگار لازم جهت تنظیم اسمزی را فراهم آورد. آزمایش حاضر در جهت مقایسه مقدماتی ارقام با

عرض تنش کلرید سدیم مشاهده شد، می توان نتیجه گرفت که همبستگی قابل ملاحظه ای بین فعالیت آنزیم  $\text{H}^+$ -ATPase واکوئلی و سازوکارهای تحمل به تنش شوری در این ارقام وجود دارد. احتمالاً در ارقام متحمل، افزایش فعالیت V-ATPase موجب تقویت پمپ شدن یون ها به درون واکوئل می گردد. این موضوع شب الکتروشیمایی لازم به منظور جذب  $\text{Na}^+$  از طریق انتقال توام از قبیل آتنی پورتر  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  را فراهم می نماید. علت دیگر اختلافات گسترده بین ارقام متحمل و حساس به شوری، ایزوفرم های مختلف

خاک را دفع می کند و ۲/۸ درصد از آن به آوند چوبی وارد می شود. به نظر می رسد که ارقام متحمل با تسهیم بخشی از سدیم وارد شده در واکوئل سلول های ریشه، به طور موثری از انتقال آن به اندام های هوایی جلوگیری می کنند. تسهیم سدیم در واکوئل سلول های ریشه، پتانسیل اسمزی درون این اندام ک را کاهش داده و به دنبال آن آب وارد واکوئل می شود. این موضوع به حفظ فشار آماس سلول و رشد آن کمک موثری می کند. این سازو کار از اثرات سمی این یون کاسته و هزینه متابولیکی کمتری نیز صرف تنظیم اسمزی سلول می شود. به نظر می رسد که این نتایج می توانند به درک علت زنده ماندن ریشه های ارقام متحمل و مرگ ریشه های ارقام حساس، علیرغم مساوی بودن نسبی میزان نمک خالص در هر گرم وزن خشک ریشه آنها، کمک کنند.

قابلیت تسهیم سدیم در واکوئل، به منظور مطالعات جامع بعدی صورت گرفته و رقم اهلمنی طارم و IR651 به عنوان ارقام متحمل و دارای سازو کار افزایش فعالیت آنزیم V-ATPase، برای انجام مطالعات بیشتر قابل توصیه می باشند. با این وجود باید توجه داشت که تحمل به شوری، یک صفت کمی بوده و ژن های بسیاری را در گیر می کند، از این رو برآیند چندین ژن با اثرات مختلف، رفتار نهایی گیاه را در مقابل تنش شوری تعیین می کند. به نظر می رسد که تلاقی بین رقم اهلمنی طارم، IR651، و انتخاب لاین ها در نسل های در حال تفکیک بر اساس قابلیت افزایش حجم واکوئل در سلول های مریستم نوک ریشه می تواند به ارتقای کیفیت ارقام پر محصول برنج کمک کند.  
با نظر گزارش گارسیا (Garcia, et al., 1997) گیاه برنج در حدود ۹۴ درصد از سدیم موجود در محلول

## References

- Ballesteros, E., J., P. Donaire and A. Belwer.** 1996. Effects of salt stress on H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase activities of tonoplast-enriched membrane vesicles isolated from sunflower roots. *Physiol Plant.* 97: 259-268.
- Barkla, B. G., L. Zingarelli, E. Blumwald and G. A. C. Smith.** 1995. Tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity and its energization by the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.* 109: 549-556.
- Berndt, E., C. Schmitt, D. Muhlenhoff and R. Ratajczak.** 1999. Daily-time course of V-ATPase activity and amount in tonoplast-enriched membrane vesicles from *Mesembryanthemum crystallinum* L. leaves in the C3-state or in the CAM-state of photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 35: 123-129.
- Binzel, M. L, P. M. Hasegawa, A. K. Handa, and R. A. Bressan.** 1985. Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 118-125.
- Binzel, M. L, F. D. Hess, R. A. Bressan, and P. M. Hasegawa.** 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86: 607-614.
- Binzel, M. L. and R. Ratajczak.** 2001. Function of membrane transport systems under salinity: tonoplast. Salinity: Environment - Plants - Molecules. In: A. Läuchli and U. Lüttge (ed.). Dordrecht, the Netherlands, Kluwer: 423-449.
- Blumwald, E., G. S. Aharon and M. P. Apse.** 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465: 140-151.
- Bowman, E. J., A. Siebers and K. Altendorf.** 1988. Bafilomycins: A class inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *PNAS.* 85: 7972-7976.

## منابع مورد استفاده

- Bremberger, C. and U. Luttge. 1992.** Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of crassulacean acid metabolism. *Planta.* 175: 465-470.
- Dietz, K. J., N. Tavakoli, C. Kluge, T. Mimura, S. Sharma, C. G. Haris, A. N. Chardonnens and D. Golldack. 2001.** Significant of V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J. Exp. Bot.* 52: 1969-1980.
- Fricke W. 2004.** Rapid and tissue-specific accumulation of solutes in the growth zone of barley leaves in response to salinity. *Planta.* 219, 515-525.
- Fukuda, A., A. Nakamura, A. Tagiri, H. Tanaka, A. Miyao, H. Hirochika and Y. Tanaka. 2004.** Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* 45(2): 146-159.
- Garcia, A. B. Engler, J. Iyer, S. Gerats, T. Van Montagu, M. and Caplan A. B. 1997.** Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol.* 115: 159-169.
- Ghassemi, M., B. R. Andersen, V. M. Reddy, P. R. Gangadharam, G. T. Spear and R. M. Novak. 1995.** Human immunodeficiency virus and *Mycobacterium avium* complex coinfection of monocyteoid cells results in reciprocal enhancement of multiplication. *J. Infect. Dis.* 171: 68-73.
- Gorham, J. 1992.** Grass responses to salinity. *Desertified Grasslands: Their Biology and Management.* In: G. P. Chapman (ed.). New York, Academic Press: 165-180.
- Guei R. G. and C. E. Wassom. 1993.** Genetics of osmotic adjustment in breeding maize for drought tolerance. *Heredity.* 7: 436—441.
- Hasegawa, P. M., R. A. Bressan, J. K. Zhu and H. J. Bohnert. 2000.** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Kafi, M. 2008.** Saline agriculture and its necessity in Iran. 10<sup>th</sup> Iranian Congress of Crop Production and Plant Breading, 17-20 Aug. Karaj. 137-162 (In Persian).
- Lacerda, C. F. D., J. Cambraia, M. A. Oliva and H. A. Ruiz. 2003.** Osmotic adjustment in roots and leaves of two sorghum genotypes under NaCl stress. *Plant Physiol.* 15(2): 113-118.
- Maeshima, M. 2001.** Tonoplast transporters: Organization and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 469-497.
- Matsomoto, H. and G. C. Chung. 1988.** Increase in proton-transport activity of tonoplast vesicles as an adaptive response of barley roots to NaCl stress. *Plant Cell Physiol.* 29: 1133-1141.
- Mimura, T., M. K. Hotta, T. Tsujimura, M. Ohnishi, M. Miura, Y. Okazaki, M. Mimura, M. Maeshima and S. W. Nemoto. 2002.** Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta.* 10: 115-126.
- Munns, R. 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell Env.* 25: 239-250.
- Munns, R. 2005.** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytol.* 167: 645-663.
- Nakamora, Y., K. Kasamo, N. Shmosato, M. Sakata and E. Ohta. 1992.** Stimulation of the extrusion of protons and H<sup>+</sup>-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca<sup>2+</sup> ions. *Plant Cell Physiol.* 33: 139-149.

- Perera, I., X. Li and H. Sze.** **1995.** Several genes encode nearly identical 16 KDa proteolipids of the vacuolar H+-ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 29: 227-244.
- Reuveni, M., A. B. Bennett, R. A. Bressan and P. M. Hasegawa.** **1990.** Enhanced H+-transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H+-ATPase after NaCl adaptation. *Plant Physiol.* 94: 524-530.
- Salekdeh, G. H. and S. Komatsu.** **2007.** Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics.* 7: 2976-2996.
- Serraj, R. and T. R. Sinclair.** **2002.** Osmolyte accumulation: can it really help increase crop under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25: 333-341.
- Wang, B., U. Luttge and R. Ratajczak.** **2001.** Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *J. Exp. Bot.* 52: 2355-2365.
- Yokoi, S., R. A. Bressan and M. Hasegawa.** **2002.** Salt stress tolerance of plants. JIRCAS Working Report. 25-33.
- Zhang, H. X. and E. Blumwald.** **2001.** Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotech.* 19: 765-768.
- Zhu, J. K.** **2001.** Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sci.* 6: 66-71.

# **Study of changes in volume of vacuole in meristem cells at root tip of rice (*Oryza sativa* L.) under saline conditions**

**Gholizadeh<sup>1</sup>, S., F. Moradi<sup>2</sup> and I. Nemati<sup>3</sup>**

## **ABSTRACT**

**Gholizadeh, S., F. Moradi and I. Nemati.** 2009. Study of changes in volume of vacuole in meristem cells at root tip of rice (*Oryza sativa* L.) under saline conditions.. **Iranian Journal of Crop Sciences.** 11 (4): 353-366 (in Persian).

To study changes of volume of vacuole meristemic cells at the root tip of rice under saline conditions, suspension-cultured cells and protoplasts from three rice genotypes including IR29 (susceptible), and IR651, Ahlami-Tarom (tolerant rice cultivars) were treated with 0.1 M NaCl, 0.2 M mannitol, 20 nM baflomycin A1, 0.1M NaCl complemented with 20 nM baflomycin A1 and distilled water (as control). Sampling carried out at 3, 8 and 24 hours after application of treatments. Results showed that vacuolar volumes increased only in tolerant cultivars when treated with NaCl. However, after exposure of cells to the mannitol with osmolarity similar to 0.1 M NaCl, such drastic changes were not observed in the vacuole volumes, indicating that salt-specific effect responses in vacuoles. Furthermore, baflomycin A1 completely inhibited the increase of vacuolar volume due to NaCl effects. This findings suggest that the V-ATPase may play an essential role in energizing a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter activity as well as vacuolar  $\text{Na}^+$  compartmentation in meristemic cells at the root tip of rice.

**Key words:** Baflomycin A1, Rice, Root meristemic cells, Salt stress and V-ATPase pump.

---

**Received: April, 2008      Accepted: August, 2009**

1- Lecturer, Islamic Azad University, Khorramshahr Unit, Khorramshahr, Iran

2- Assistant Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute (ABRI), Karaj,Iran (Corresponding author)

3- Lecturer, Islamic Azad University, Khorramshahr Unit, Khorramshahr, Iran