

تشریح مکانیسم مولکولی ایجاد تحمل به تنش شوری در گیاه شورپسند *Aeluropus littoralis* توسط ژن‌های *AISOS*

امین محمدی پورفرد^۱، محمدزمان نوری^{۲*}، علی دهستانی^۳

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۲. استادیار، موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل

۳. استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۸/۲۳)

Dissection of the molecular mechanism of salinity stress tolerance in halophyte plant, *Aeluropus littoralis* using *AISOS* genes

Amin Mohammadi Purfard¹, Mohammad-Zaman Nouri^{2*}, Ali Dehestani³

1. Agricultural Biotechnology Ph.D. Candidate, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

2. Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Amol, Iran

3. Assistant Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

(Received: Jul. 26, 2017 - Accepted: Nov. 20, 2017)

Abstract

Salinity stress is one of the most important environmental stresses that affects crop production. Salt Overly Sensitive regulation path is an important route in the regulation of ion homeostasis. In this study, the expression patterns of *AISOS1*, *AISOS2* and *AISOS3* genes were evaluated in the salt tolerant plant, *Aeluropus littoralis* under 0, 200, 400 and 600 mM sodium chloride and after 0, 8, 16, 24, 48 and 72 h of the stress exposure. Salinity stress significantly increased the expression of all genes compared to the control. In 200 mM NaCl treatment, *AISOS1* and *AISOS2* expression increased in various time courses and peaked at 72 h after the stress exposure. In 400 and 600 mM NaCl treatment, however, the maximum expression of *AISOS1* was observed at 48 h after the stress. *AISOS2* was highly expressed at the salt concentrations of 400 and 600 mM after 48 h and 24 h, respectively. The maximum rate of *AISOS3* transcription was recorded in 400 and 600 mM NaCl after 24 h and 16 h, respectively. Different mechanism of the effect of *AISOS3* on *AISOS2*, effect of *AISOS2*-*AISOS3* complex on *AISOS1* and differences in the act of the genes are of the reasons for the variations in the gene expression. These results suggest that in severe stress conditions, the reaction of genes would be rapid and with different patterns. *AISOS3* showed a different pattern of the expression comparing to the two other genes which implies differences in the gene regulation mechanism.

Keywords: Sodium Chloride, Expression, *Aeluropus littoralis*, *AISOS*.

چکیده

تنش شوری از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که تولید گیاهان زراعی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مسیر تنظیمی فوق حساس به نمک از جمله مسیرهای مهم در تنظیم هموستازی یون می‌باشد. در این مطالعه، الگوی بیان ژن‌های *AISOS1*، *AISOS2* و *AISOS3* در گیاه متحمل به شوری *Aeluropus littoralis* تحت تأثیر سطوح مختلف سدیم کلرید شامل صفر، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار و در زمان‌های صفر، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش اندازه‌گیری شد. میزان بیان هر سه ژن با اعمال تنش شوری، نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت. در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، میزان بیان ژن‌های *AISOS1* و *AISOS2* در ۷۲ ساعت به حداکثر رسید. در حالی که ژن *AISOS1* در غلظت ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار، پس از ۴۸ ساعت به حداکثر بیان رسید و ژن *AISOS2* در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار، پس از ۴۸ ساعت و در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار، بعد از ۲۴ ساعت بیشترین بیان را نشان دادند. بیشترین میزان نسخه‌برداری ژن *AISOS3* در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار، ۲۴ ساعت و در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار، ۱۶ ساعت پس از اعمال تنش بود. مکانیسم متفاوت اثر ژن *AISOS3* بر *AISOS2*، اثر کمپلکس *AISOS2*-*AISOS3* بر *AISOS1* و وجود تفاوت در عملکرد این ژن‌ها از دلایل این تغییرات می‌باشد. تغییرات بیان ژن‌ها نشان می‌دهد در تنش شدید، واکنش ژن‌ها با الگوی متفاوت می‌باشد. مقایسه روند تغییرات ژن‌ها نشان داد، رفتار ژن *AISOS3* نسبت به دو ژن دیگر در تنش شدید متفاوت بود که بیانگر تفاوت در مکانیسم عمل این ژن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سدیم کلرید، میزان بیان، *Aeluropus littoralis*، *AISOS*

مقدمه

تنش‌های غیرزیستی همچون خشکی، شوری، دمای بالا و تنش‌های اکسیداتیو از عوامل کاهش‌دهنده عملکرد در گیاهان زراعی بوده و به طور متوسط، علت ۵۰ درصد افت محصولات عمده کشاورزی می‌باشند (Valliyodan & Nguyen, 2006). میان این تنش‌ها، تنش شوری یکی از مهمترین موانع توسعه و گسترش تولیدات کشاورزی است که بسیاری از نواحی را از زیرکشت خارج و یا باعث نقصان عملکرد محصولات شده است (Zhang et al., 2008). سدیم و کلرید یون‌های غالب در بیشتر مناطق شور هستند. در طول تکامل، گونه‌های مختلف گیاهان که به عنوان نمک دوست یا هالوفیت شناخته شده‌اند، به زندگی در محیط‌های با شوری بالا سازگاری یافته‌اند. گیاه چمن‌شور یا *Aeluropus littoralis* از جمله گیاهان متحمل به شوری است که بومی ایران بوده و می‌تواند غلظت‌های بالاتر از ۶۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید را تحمل نماید. این گیاه تک لپه و از خانواده گرامینه می‌باشد که در خاک‌های شور ساحلی و بیابانی قادر به رشد است (Gulzar et al., 2003).

تنش شوری باعث بروز دامنه وسیعی از واکنش‌ها در گیاهان و تغییر در سرعت رشد و میزان عملکرد محصولات می‌شود (Reddy et al., 2004). درک مکانیسم تحمل به غلظت‌های بالای سدیم کلرید در گیاهان متحمل به شوری می‌تواند به افزایش تحمل در گیاهان حساس و به تبع آن، افزایش عملکرد محصولات کشاورزی کمک نماید (Rozema & Schat, 2013). گیاهان از مکانیسم‌های متعددی برای مقابله با تنش شوری استفاده می‌کنند. مطالعات اخیر نشان داده که درک اجزای تنش و نیز مسیرهای پیام‌رسانی نقش مهمی را در تنظیم نمودن واکنش گیاه به تنش شوری ایفا می‌نماید (Deinlein et al., 2014). صفت تحمل به شوری توسط تعداد زیادی

ژن از طریق شبکه‌های تنظیمی ژنتیکی پیچیده‌ای کنترل می‌شود (Ji et al., 2013). یکی از واکنش‌های کلیدی گیاهان متحمل به تنش شوری، حفظ تعادل یونی سلولی از طریق محدود کردن تجمع Na^+ است (Tester & Davenport, 2003). یکی از مسیرهای سیگنالی شناخته شده که به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته و برای تنظیم تعادل یونی ضروری شناخته شده، مسیر پیام‌رسانی فوق حساس به نمک^۱ است (Ji et al., 2013)، از این بین می‌توان به مطالعات انجام شده روی آرآبیدوپسیس، برنج، تنباکو و غیره اشاره نمود (Huh et al., 2002; Shabala et al., 2007; Shabala, 2009). این مسیر ابتدا تنش شوری باعث برانگیخته شدن پیام کلسیم درون سیتوسل و در نتیجه فعال شدن کمپلکس SOS3/SOS2 می‌شود. سپس کمپلکس فعال SOS3/SOS2 باعث بیان ژن SOS1 در مرحله نسخه‌برداری و سایر نقل و انتقال دهنده‌های یونی پس از ترجمه می‌شود (Zhu, 2000). گیاهان در تنش شوری غلظت بالایی از یون پتاسیم را در سیتوسل حفظ می‌نمایند و مقادیر یون سدیم را در سیتوسل خود کاهش می‌دهند. گیاهان این کار را از طریق تنظیم بیان و فعالیت ترانسپورترهای سدیم/پتاسیم و پمپ‌های H^+ به عنوان تامین‌کننده انرژی ترانسپورترها انجام می‌دهند (Zhu et al., 1993). اگرچه تمامی سنسورهای تنش شوری مشخص نشده‌اند، اما برخی از اجزای مسیر سیگنالی‌نگ در گیاهان شناسایی شده است. مطالعات نشان می‌دهد مجموعه‌ای از پروتئین کینازها از جمله پروتئین SOS3 که پروتئین متصل به کلسیم می‌باشد و نیز سرین/ترئونین پروتئین کیناز SOS2، بوسیله سیگنال کلسیم در تنش شوری فعال می‌گردند. این مجموعه از پروتئین کینازها پس از فسفریله شدن،

1. Salt Overly Sensitive

۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. کلون‌ها هر دو روز یک‌بار با محلول غذایی ۱/۲ غلظت هوگلدن آبیاری شدند. پس از یک ماه، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های ۲۰ لیتری حاوی محلول غذایی ۱/۲ غلظت هوگلدن منتقل و با استفاده از پمپ آکواریومی هوادهی شده و با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید تیمار شده و با شاهد بدون نمک مورد مقایسه قرار گرفتند (Ghasemi Omran et al., 2012). میزان بیان ژن‌های *AISOS1*، *AISOS2* و *AISOS3* در زمان‌های مختلف شامل صفر، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش، با استفاده از آزمایش Real Time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

استخراج RNA کل از نمونه‌های برگ‌ی با استفاده از کیت تریزول^۱ شرکت اینویترژن^۲ بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد (Cat. No. 15596-018). بدین منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ‌ی تازه در هاون چینی از پیش سرد شده توسط ازت مایع کاملاً پودر گردید و مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول تریزول به بافت گیاهی افزوده شد. سپس با استفاده از کلروفورم و رسوب بوسیله ایزوپروپانول، RNA کل استخراج گردید. mRNA با استفاده از mRNA capture kit شرکت ژس^۳ و طبق دستورالعمل مربوطه با استفاده از محلول لیز کننده^۴ به ویال استرپتاویدین متصل گردید و سایر ناخالصی‌ها بوسیله بافر شستشوی موجود در کیت از محیط حذف گردید (Feron et al., 2004).

برای تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده، به ترتیب از روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز استفاده شد (Rouholamin et al., 2015). نرمال‌سازی RNA استخراج‌شده در هر تیمار به

برخی از ترانسپورترهای یونی غشا پلاسمایی از جمله آنتی پورتر Na^+/H^+ یا SOS1 را فعال می‌نمایند (Parida and Das, 2004).

با توجه به اهمیت تنش شوری، تحقیقات متعددی روی مکانیسم‌های تحمل به شوری در گیاه *A. littoralis* صورت گرفته است. گیاه *A. littoralis* گیاهی هالوفیت و چند ساله و تک لپه‌ای است که قادر به تحمل شوری تا سطح ۶۰۰ میلی‌مولار می‌باشد و در مناطق با بارندگی کمتر از ۲۰۰ میلی‌لیتر در سال و نیز خاک‌های شور ساحلی رشد نماید (Li & Liu, 1994; Wang, Shi et al., 2003; Gulzar et al., 2004). با افزایش بیان ژن *SOS1* در آرابیدوپسیس، گیاهان تراریخت با سطح بالایی از مقاومت به شوری به دست آوردند (Shi et al., 2000) و همچنین گزارشی از شناسایی و جداسازی رونوشت‌های پاسخگو به پتاسیم کلرید در گیاه *A. littoralis* منتشر گردیده است (Fatemi et al., 2014). *A. littoralis* علاوه بر مقاومت بالا در برابر شوری در برابر گرما و خشکی نیز مقاوم می‌باشد (Zouari et al., 2007). به دلیل اهمیت گیاه *A. littoralis* به عنوان یک منبع ژنتیکی مناسب و به منظور پی‌بردن به سازوکارهای تحمل به شوری در گیاهان زراعی به خصوص گیاهان خانواده گرامینه و نیز اهمیت تغییرات بیان ژن‌های پاسخگو به تنش در ساعات اولیه تنش، این پژوهش با هدف تشریح تغییرات در بیان ژن‌های *AISOS1*، *AISOS2* و *AISOS3* در ساعات اول مقابله گیاه *A. littoralis* در مواجهه با تنش شوری در این گیاه، طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

کلون‌های گیاه *A. littoralis* از گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان جمع‌آوری و درون ماسه شسته شده و تحت شرایط

1. Trizol
2. Invitrogen
3. Roche company
4. Lysis buffer

۳۰ ثانیه بود. منحنی ذوب با استفاده از فلورسنت سایبرگرین هیچ ساختار سنجاق سری یا شکل‌گیری لوپ را در واکنش PCR شناسایی نکرد. محصولات تکثیر Real time PCR روی ژل آگارز بارگذاری شد تا وجود باند صحیح و منفرد تایید گردد. سه تکرار برای هر آزمایش در نظر گرفته شد و سیگنال‌های فلورسنت در هر مرحله پلیمریزاسیون در دستگاه BioRAD C1000™ Thermal Cycler شرکت BioRad جمع‌آوری شد (Bio-Rad, USA). مقادیر آستانه‌ای (C_T) توسط نرم‌افزار داخلی دستگاه مطابق فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Target - actin) محاسبه شد. پردازش داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

واکنش گیاه *A. littoralis* به تنش شوری از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و مولکولی قابل بحث می‌باشد که در مطالعه حاضر سنجش میزان بیان برخی از ژن‌های مسیر سیگنالی SOS در گیاه *A. littoralis* تحت تنش مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. الگوی بیان سه ژن *AISOS1*، *AISOS2* و *AISOS3* در گیاه *Aeluropus littoralis* در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تنش شوری مورد اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل قرار گرفت که نتایج به‌دست آمده در ادامه تشریح می‌شود. با توجه به این‌که الگوی بیان ژن‌ها در تیمار شاهد بدون تنش در طول زمان‌های مختلف نمونه‌برداری تغییرات خاصی را نشان نداد، لذا بررسی‌های الگوی بیان ژن روی تیمارهای تنش شوری صورت پذیرفت. نتایج حاصل از بررسی بیان، به صورت نسبت بیان ژن‌ها در گیاهان تنش یافته به بیان ژن‌ها در گیاهان شاهد ارائه گردید. در نتیجه مقدار بیان نمونه‌های شاهد در نمودارها صفر می‌باشد.

روش qPCR و با استفاده از ژن *Actin* صورت گرفت. ساخت رشته اول و دوم cDNA با دستورالعمل کیت mRNA Capture شرکت ژس و با استفاده از ویال‌های PCR حاوی streptavidin انجام شد (Feron *et al.*, 2004). در این حالت پس از اتصال mRNAها به دیواره ویال استرپتاویدین و شستشوی ویال، mRNA در ۸ μl آب بدون نوکلئاز دوباره حل شده و واکنش رونویسی معکوس با RiboLock dNTP (10 nmol each)، DTT 50mM، RNaseInhibitor 50U، 250mM KCl، 250mM Tris-HCl (pH 8.3)، 20mM MgCl₂ و 200U از آنزیم رونوشت بردار معکوس RevertAid (ترموسابنتیفیک) در حجم نهایی ۲۰ μl کامل گردید و در دمای ۴۲°C به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. پس از انجام واکنش، ویال با بافر شستشو، شستشو داده شد. قبل از ساخت رشته اول و دوم cDNA، به‌منظور حذف DNA احتمالی، نمونه RNA با آنزیم دی‌اکسی‌ریبونوکلئاز ۱ تیمار شد. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مورد بررسی (جدول ۱) بر اساس نواحی حفاظت‌شده ژن‌های SOS در گندم با استفاده از نرم‌افزار DNASTAR MegAlign طراحی گردیدند و نیز توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *Actin* (کنترل داخلی گیاه *A. littoralis*)، براساس مطالعات پیشین طراحی گردید (Hashemi *et al.*, 2016).

واکنش PCR بر اساس دستورالعمل کیت مورد نظر انجام شد. به‌این‌ترتیب که مرحله اولیه واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشت‌سازی در همان دما به مدت ۱۰ ثانیه و سپس اتصال بسط تلفیقی در دمای ۶۰ درجه به مدت

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

ژن	توالی رفت	توالی برگشت
<i>AISOS1</i>	5'-CAGCTTACTGGGGAATGCTC-3'	5'-ACTTGGGAAGTGGACACTGG-3'
<i>AISOS2</i>	5'-TCGCCAAGGTCAGGTTTCGG-3'	5'-CGCGCTCAGCCAAAATCA-3'
<i>AISOS3</i>	5'-GGAGGCCCTCTACGAGTTG-3'	5'-AAAGCTGGGGAATGACATGG-3'
<i>Actin</i>	5'-GTATGGCAACATTGTCCTCAG-3'	5'-TGGAGCAACGACCTTGAT-3'

ژن *AISOS1*

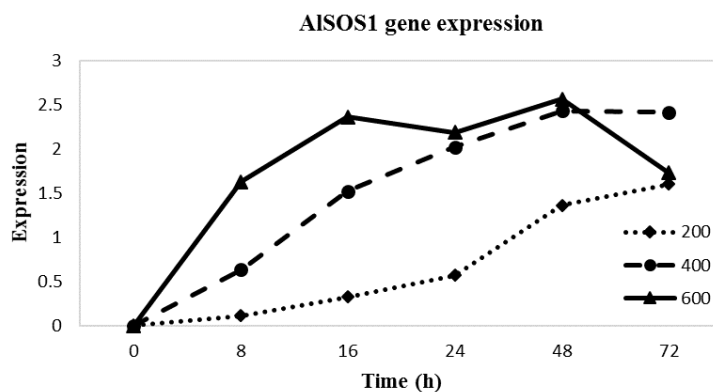
میزان بیان ژن *AISOS1* تحت تنش‌های مختلف سدیم کلرید، نسبت به شاهد با توجه به تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute, 2005) افزایش معنی‌داری نشان داد که این افزایش، در غلظت‌های بالای نمک یعنی ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار، نسبت به غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار بیشتر بود. در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، با گذشت زمان، میزان بیان ژن *AISOS1* روند صعودی داشت و بیشترین آن در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۱). در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار، میزان بیان ژن مذکور تا ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش افزایش یافت و پس‌از آن شیب آن کاهش یافت و میزان بیان در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تنش، ثابت ماند. در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، میزان بیان در ساعات اولیه بعد از تنش افزایش بیشتری نسبت به دو غلظت دیگر (۲۰۰ و ۴۰۰) داشت (شکل ۱). بدان معنی که این ژن با افزایش غلظت سدیم کلرید، از طریق افزایش میزان رونوشت‌برداری، واکنش سریع‌تری به تنش شوری داشت. در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار، میزان بیان به یک‌باره پس از ۸ ساعت افزایش زیادی یافت و این افزایش تا ۱۶ ساعت بعد از اعمال تنش ادامه یافت و پس‌از آن تا ۲۴ ساعت بعد از تنش ثابت ماند و در ۴۸ ساعت مجدداً مقداری افزایش نشان داد اما بعد از آن در ۷۲ ساعت پس از تنش کاهش یافت. چنین کاهش در ۷۲ ساعت پس از تنش در این گیاه شورپسند، می‌تواند ناشی از عمل سایر ژن‌های دخیل در این مکانیسم و رسیدن به حالت تعادل و یا وارد شدن گیاه به فاز مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی باشد (Wang et al., 2012).

در همین زمینه مطالعه‌ای به منظور بررسی الگوی بیان این ژن در پاسخ به تیمار شوری ۲۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، در بافت‌های گره، میان‌گره، ریشه و برگ گیاه *A. littoralis* انجام شد و نتایج نشان داد که سطوح نسخه‌برداری در همه بافت‌ها در پاسخ به تنش افزایش یافت، همچنین در این پژوهش به فعال‌شدن همزمان ژن *AISOS1* و *AINHX1* که یک آنتی‌پورتر واکوئلی است نیز اشاره گردیده است (Ghasemi Omran et al., 2012). از نظر زمان پاسخ به تنش نشان داده شد که بیان ژن *AISOS1* در بافت برگ پس از ۶ ساعت افزایش یافت و سه روز پس از اعمال تنش به حالت قبل از تنش (بدون تنش) بازگشت. افزایش بیان ژن *AISOS1* تحت تنش شوری منحصر به گیاهان شورپسند نمی‌باشد و در سایر گیاهان نیز گزارش شده است. در گیاه آراییدوپسیس، میزان mRNA ژن *SOS1* تحت تنش شوری هم در ساقه و هم ریشه افزایش یافت، درحالی‌که در تنش سرما و ABA بدون تغییر باقی ماند (Shi et al., 2000). در گندم نان سطح بیان ژن *TaSOS1* تحت تأثیر ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید در بافت برگ در نه ساعت پس از تنش افزایش موقتی داشت (Xu et al., 2008). میزان بیان ژن *PeSOS1* پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید به میزان ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از شاهد در برگ‌های گیاه برنج افزایش یافت (Wu et al., 2007). در پژوهشی دیگر (Rezaei Moshaei et al., 2014)

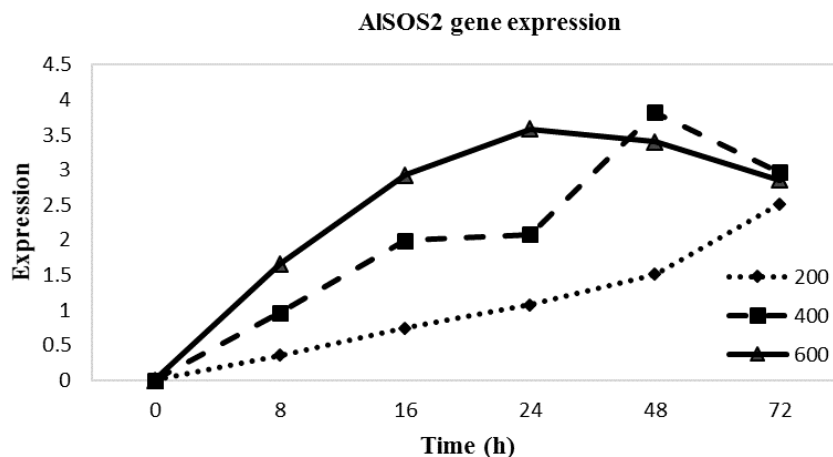
ژن *AISOS2*

میزان نسبی mRNA ژن *AISOS2* در گیاه *A. littoralis* با افزایش زمان در تنش شوری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و شدت این افزایش در غلظت‌های مختلف، یکسان نبود. در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید با افزایش زمان، میزان رونوشت به‌تدریج افزایش یافت و در آخرین زمان اندازه‌گیری یعنی ۷۲ ساعت پس از تنش، به بالاترین میزان خود رسید. در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار، میزان بیان ابتدا تا ۱۶ ساعت افزایش یافت و تا ۲۴ ساعت ثابت ماند و سپس مجدداً در ۴۸ ساعت افزایش تقریباً دو برابری نشان داد و پس از آن در زمان ۷۲ ساعت کاهش یافت. در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار نیز تا ۲۴ ساعت پس از تنش میزان بیان افزایش یافت و سپس رو به کاهش گذاشت؛ به‌طوری‌که در ۲۴ ساعت پس از تنش به حداکثر میزان خود رسید. اما حداکثر میزان رونوشت در دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، به ترتیب در ۷۲ و ۴۸ ساعت پس از تنش رخ داد (شکل ۲). در مطالعه‌ای که توسط *Jannesar et al.* (2014) انجام شد، نشان دادند که میزان بیان ژن *alaSOS2* در گیاه *Aeluropus lagopoides* به‌طور معنی‌داری در بافت‌های برگ و ریشه تحت تأثیر تیمار سدیم کلرید افزایش یافت.

گزارش کردند گیاهانی که به مدت دو هفته تحت تیمار با غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید قرار گرفته بودند، افزایش معنی‌داری را در میزان mRNA ژن *AISOS1* در ریشه و برگ گیاه *A. littoralis* نشان دادند. نتایج پژوهش نشان داد که *AISOS1* یک آنتی‌پورتر سدیم/ پروتون در غشای پلاسمایی است که در دفع یون سدیم از سیتوسل به فضای خارج سلولی و ممانعت از تجمع سریع یون سدیم در سیتوپلاسم سلول ایفای نقش می‌کند (Ghasemi Omran, 2012; Ghasemi Omran, 2013). بنابراین افزایش بیان این ژن بسته به غلظت سدیم کلرید، در گیاه شورپسند آلوروپوس افزایش خواهد یافت. به این معنی که اگر غلظت سدیم کلرید بالا باشد، بیان این ژن به‌منظور خروج سریع‌تر و بیشتر سدیم کلرید، سریع‌تر اتفاق خواهد افتاد و پس از خروج مقدار کافی از سدیم به خارج از سلول، میزان بیان آن متعادل‌تر خواهد شد. بر اساس گزارشات، گیاه گندم در سطوح پایین تنش شوری یعنی ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار از مکانیسم *SOS1* به‌منظور تحمل به تنش شوری استفاده می‌کند (Ramezani et al., 2011). بر اساس نتایج پژوهش حاضر، گیاه آلوروپوس قادر است که در غلظت‌های بالاتر شوری نیز از این مکانیسم استفاده کند.



شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید بر میزان بیان ژن *AISOS1* نسبت به ژن رفرنس *Actin* روی گیاه *A. littoralis* در زمان‌های متفاوت

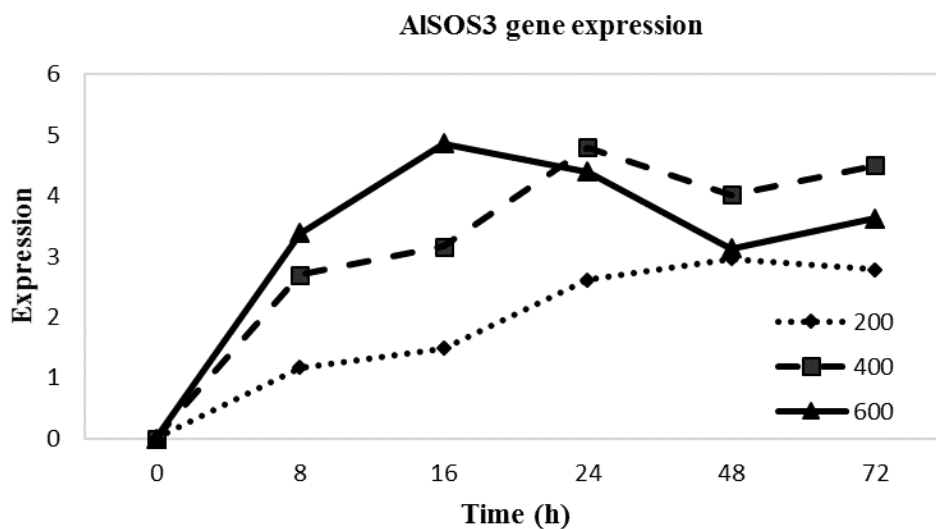


شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید بر میزان بیان ژن *AISOS2* نسبت به ژن رفرنس *Actin* روی گیاه *A. littoralis* در زمان‌های متفاوت

شروع به کاهش یافتن نمود. در غلظت‌های بالاتر، یعنی ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار، میزان بیان این ژن بیشتر بود و طی مدت کمتری پس از اعمال تنش به حداکثر میزان خود رسید. به‌عنوان مثال، در غلظت ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار، به ترتیب پس از ۲۴ و ۱۶ ساعت میزان رونوشت ژن به حداکثر خود رسید.

ژن *AISOS3*

نتایج آنالیز بیان ژن *AISOS3* در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تنش شوری موجب افزایش میزان بیان این ژن شد، بدین‌صورت که در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، میزان بیان تا ۴۸ ساعت پس از تنش افزایش یافت و سپس مجدداً



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید بر میزان بیان ژن *AISOS3* نسبت به ژن رفرنس *Actin* روی گیاه *A. littoralis* در زمان‌های متفاوت

تحقیقات نشان داده که *SOS3* در پاسخ به تنش سدیم کلرید افزایش می‌یابد (Yang et al., 2009). *SOS3* از طریق تنظیم ژن *AIR1* در تولید و تجمع فلاونوئیدها و آنتوسیانین در مواجهه با تنش شوری نقش دارد (Van Oosten et al., 2013). گیاهانی که در میزان پروتئین *SOS3* کمبود دارند، نسبت به تنش شوری بسیار حساس هستند که این پدیده را می‌توان با افزودن کلسیم جبران کرد. *SOS3* در آراییدوپسیس از طریق شرکت در فرایند تشکیل مجدد وابسته به کلسیم ریزرشته‌های اکتین در تحمل به شوری نقش مهمی ایفا می‌کند (Ye et al., 2013). با کشف موتانت‌های *SOS* در آراییدوپسیس، اساس مولکولی تعادل یونی تحت تنش شوری روشن شد (Zhu, 2000). مسیر *SOS* تعادل K^+ و Na^+ در نقطه اتصال ریشه و خاک و همچنین انتقال Na^+ از ریشه به ساقه را تنظیم می‌کند. تنش شوری نوسانات کلسیم سیتوسولی را توسط یک پروتئین تخصصی متصل به کلسیم (*SOS3*) تحریک می‌کند که موجب فعال شدن *SOS2* (یک پروتئین کیناز سرین/ ترونین) می‌شود (Qiu et al., 2002). *SOS2* کیناز موجب فسفریله کردن و فعال کردن *SOS1* (آنتی‌پورتر Na^+/H^+ غشای پلاسمایی) می‌گردد (Quintero et al., 2002). نهایتاً فعال شدن *SOS1* با خارج کردن Na^+ به خارج از ریشه، به تحمل گیاه به شوری کمک می‌کند (Xu et al., 2008).

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که میزان بیان سه ژن *AISOS1*، *AISOS2* و *AISOS3* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید، نسبت به شاهد به‌شدت افزایش یافت. میزان بیان ژن‌های مذکور در غلظت پایین سدیم کلرید یعنی ۲۰۰ میلی‌مولار، نسبت به غلظت‌های بالای آن یعنی ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار با سرعت کمتری افزایش یافت و زمان بیشتری نیاز بود تا به حداکثر میزان خود برسد. از آنجایی که سه ژن مذکور به‌طور هم‌زمان در یک مسیر سیگنالی فعالیت می‌کنند، بنابراین، در پژوهش

حاضر پروفایل بیان آن‌ها تا حدود زیادی شبیه به هم بود. در مواجهه با تنش، ابتدا ژن‌های *AISOS2* و *AISOS3* تحت تأثیر کلسیم فعال می‌گردند و در ادامه تنش و پس از فسفریله شدن روی ژن *AISOS1* که یک آنتی‌پورتر غشایی است، اثر می‌گذارند و آن را نیز فعال می‌نمایند تا در نتیجه این برهم‌کنش‌ها، غلظت یون‌های سدیم، پتاسیم و یون هیدروژن در سیتوسل تنظیم گردد. در این مسیر پروتئین متصل شونده به کلسیم *AISOS3* سیگنال تنش شوری را دریافت و منتقل می‌نماید. *AISOS3* پروتئین *AISOS2* را فعال می‌نماید و آن را به سمت غشای پلاسمایی هدایت می‌نماید تا فسفوریلاسیون ترانسپورتر سدیمی *AISOS1* توسط کمپلکس *AISOS2*-*AISOS3* فراهم گردد. از نکات قابل توجه در روند افزایش بیان ژن‌ها، تشابه روند افزایش بیان هر سه ژن در غلظت پایین تنش می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که در این گیاه مکانیسم واکنش به تنش شوری در غلظت پایین در هر سه ژن مشابه و تقریباً به‌صورت خطی و رو به بالا می‌باشد. این در حالی است که با افزایش شدت تنش، واکنش این ژن‌ها در گیاه متفاوت می‌گردد. بررسی روند تغییرات بیان نشان می‌دهد که چنانچه تنش شدید باشد، واکنش این ژن‌ها سریع‌تر و با الگوی متفاوتی می‌باشد. نکته مشترک در تنش‌های شدید، کاهش بیان از ۱۶ تا ۴۸ ساعت پس از آغاز تنش می‌باشد. مقایسه روند تغییرات ژن‌ها نکته مهمی را آشکار نمود و آن اثبات متفاوت بودن رفتار ژن *AISOS3* نسبت به دو ژن دیگر در تنش بالا در زمان ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از تنش بوده است. درحالی که در این ساعات، دو ژن *AISOS1* و *AISOS2* دارای روند نزولی بیان ژن بودند، بیان ژن *AISOS3* مجدداً روند صعودی را نشان داد که بیانگر تفاوت در مکانیسم عمل این ژن می‌باشد. بیان سریع و معنی‌دار این ژن‌ها تحت تنش شوری نشان‌دهنده اهمیت بالای این ژن‌ها در مکانیسم تحمل به شوری در گیاه شورپسند *A. littoralis*

سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان به خاطر فراهم سازی اعتبارات مالی و تامین امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می گردد.

می باشد. این نتایج نقش ژن های *AlSOS* را در ایجاد مقاومت در گیاه *A. littoralis* به روشنی نشان داد، به نحوی که می توان در پژوهش های آتی به عنوان گزینه هایی جهت انتقال ژن به گیاهان زراعی و ایجاد گیاهان مقاوم به شوری استفاده نمود.

REFERENCES

- Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder JI (2014) Plant salt-tolerance mechanisms. Trends Plant Sci. 19: 371-379.
- Fatemi F, Nematzadeh Gh, Askari H, Hashemi SH (2014) Identification and isolation of transcripts in response to KCl from *Aeluropus littoralis*. Crop Biotech. 6: 73-83.
- Feron R, Mariani C, Vriezen WH (2004) Application of the mRNA capture kit in cDNA-AFLP. Biochemica. 3: 23-24.
- Flowers TJ, Colmer TD (2008) Salinity tolerance in halophytes. New Phytol. 179: 945-963.
- Ghasemi Omran V, Bagheri AR, Nematzadeh Gh, Mirshamsi A (2012) Evaluation of the expression pattern of *AlSOS1* and *AlNHX* genes under NaCl stress in halophyte grass *Aeluropus littoralis* Parl. Crop Biotech. 2: 27-37.
- Ghasemi Omran V, Bagheri AR, Nematzadeh Gh, Mirshamsi A, Babaiian Jelodar NA (2013) Isolation and expression analysis of *AlSOS1* gene under NaCl stress in halophyte grass *Aeluropus littoralis* Parl. Crop Breed. 7: 60-69.
- Gulzar S, Khan MA, Ungar IA (2003) Effects of salinity on growth, ionic content, and plant-water status of *Aeluropus lagopoides*. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 34: 1657-1668.
- Hashemi SH, Nematzadeh G, Ahmadian G, Yamchi A, Kuhlmann M (2016) Identification and validation of *Aeluropus littoralis* reference genes for Quantitative Real-Time PCR normalization. Biol. Res. Thessaloniki. 23: 1-13.
- Jannesar M, Razavi Kh, Saboora A (2014) Effects of salinity on expression of the salt overly sensitive genes in *Aeluropus lagopoides*. Aust. J. Crop Sci. 8:1-8.
- Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li, X (2013) The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. Mol. Plant. 6: 275-286.
- Li MY, Liu YJ (1994) Halophytes of yellow river delta in north Shandong province of China. J. Qufu. Normal Univ. 125-133.
- Parida AK, Das AB (2004) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60: 324-349.
- Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Regulation of *SOS1*, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by *SOS2* and *SOS3*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 8436-8441.
- Quintero FJ, Ohta M, Shi HZ, Zhu JK, Pardo JM (2002) Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na^+ homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 9061-9066.
- Ramezani A, Niazi A, Ebeli Moghaddam, AA, Zamani M (2011) Gene expression analysis of *SOS1* in two Iranian wheat species under salinity stress using qRT-PCR. In proceeding of the 7th National Biotechnology Congress of Iran.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Viekanadan MV (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and

- antioxidant metabolism in higher plant. *Plant Physiol.* 161: 1189-1202.
- Rezaei Moshaei M, Nematzadeh GA, Askari H, Nejad ASM (2014) Quantitative gene expression analysis of some sodium ion transporters under salinity stress in *Aeluropus littoralis*. *Saudi J. Biol. Sci.* 21: 394-399.
- Rozema J, Schat H (2013) Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environ. Exper. Bot.* 92: 83-95.
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000) The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6896-6901.
- Tavakkoli E, Rengasamy P, McDonald GK (2010) High concentrations of Na⁺ and Cl⁻ ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. *J. Exp. Bot.* 61: 4449-4459.
- Tester M, Davenport RJ (2003) Na⁺ transport and Na⁺ tolerance in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503-527.
- Valliyodan B, Nguyen HT (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 1-7.
- Van Oosten MJ, Sharkhuu A, Batelli G, Bressan RA, Maggio A (2013) The Arabidopsis thaliana mutant air1 implicates SOS3 in the regulation of anthocyanins under salt stress. *Plant Mol. Biol.* 83: 405-415.
- Wang J, Li X, Liu Y, Zhao X (2010) Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* 167: 1145-1151.
- Wang RZ (2004) Plant functional types and their ecological responses to salinization in saline grasslands, Northeastern China. *Photosynthetica.* 42: 511-519.
- Xu H, Jiang X, Zhan K, Cheng X, Chen X, Pardo JM, Cui D (2008) Functional characterization of a wheat plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 473: 8-15.
- Yang Q, Chen ZZ, Zhou XF, Yin HB, Li X, Xin XF, Hong XH, Zhu JK, Gong Z (2009) Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Mol. Plant.* 2: 22-31.
- Ye J, Zhang W, Guo Y (2013) Arabidopsis SOS3 plays an important role in salt tolerance by mediating calcium-dependent microfilament reorganization. *Plant Cell Rep.* 32: 139-148.
- Zhang GH, Q Su, LG an, S Wu (2008) Characterization and expression of a vacuolar Na antiporter gene the monocot halophyte *Aeluropus littoralis*. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 117-127.
- Zhu J K (2000) Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. *Plant Physiol.* 124: 941-948.
- Zhu JK, Shi J, Singh U, Wyatt SE, Bressan RA, Hasegawa PM, Capita NC (1993) Enrichment of vitronectin and fibronectin like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. *Plant J.* 3: 637-646.
- Zouari N, Ben Saad R, Legavre Th, Azaza J, Sabau X, Jaoua M, Masmoudi K, Hassairi A (2007) Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. *Gene.* 404: 61-69.