

بررسی تغییرات بیان ژن‌های *SOS1*، *P5CS1* و *PMP3-6* در لاین‌های ذرت تحت تنش شوری

زهرا ابراهیمی‌پور^۱، رضا درویش‌زاده^{۲،۳*}، سرور ارژنگ^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استاد، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۴. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۲۹)

Study the expression of *SOS1*, *P5CS1* and *PMP3-6* genes in maize under salt stress

Zahra Ebrahimipour¹, Reza Darvishzadeh^{2,3*}, Sorour Arzhang⁴

1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

2. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

3. Professor, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

4. Ph.D. in Plant Breeding-Molecular Genetics and Genetic Engineering, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: May 10, 2020 - Accepted: Aug. 19, 2020)

Abstract

High concentration of salt in soil and water is one of the major factors limiting crop growth and production worldwide. A factorial experiment based on completely randomized design with two biological and three technical replicates was performed in 2018-2019 to study the ion leakage rate and changes in relative expression of *SOS1*, *P5CS1* and *PMP3-6* genes in the root and leaf of *Zea mays* L. tolerant and susceptible lines under normal and 8 dS/m salinity conditions using real-time PCR technique after 24-hours and 7-days (as short-time and long-time, respectively) of applying salt stress. The results showed that ion leakage rate at long-time was high in the susceptible line than that of the tolerant line. The highest relative expression of *P5CS1* and *PMP3-6* genes in 8 dS/m salinity stress was observed in the roots of tolerant line. In contrast, the highest increase in the relative expression of *SOS1* gene was observed in the leaf tissue of susceptible line at short-time. Correlation analysis among the relative expression of studied genes revealed a positive significant correlation ($P \leq 0.05$) between *P5CS1* and *PMP3-6* genes expression. Probabilily, the high expression of *PMP3-6* and *P5CS1* genes in the root tissue of the tolerant line in the earlier time post salt stress application is responsible for regulating osmotic pressure and preventing excessive Na^+ entry into the plant that results in increasing the tolerance of plant to salt stress. The results of this study can be useful in *Zea mays* L. breeding programs for producing salinity tolerant varieties.

چکیده

غلظت بالای نمک در آب و خاک یکی از عمده‌ترین عوامل محدود کننده رشد و تولید گیاهان در سراسر جهان است. در این مطالعه، میزان نشت یونی و تغییرات بیان نسبی ژن‌های *SOS1*، *P5CS1* و *PMP3-6* در ریشه و برگ لاین‌های متحمل و حساس ذرت تحت شرایط نرمال و تنش شوری ۸ dS/m، در زمان‌های ۲۴ ساعت (کوتاه مدت) و ۷ روز (بلند مدت) بعد از اعمال تنش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار زیستی و ۳ تکرار تکنیکی در سال ۱۳۹۸ با فناوری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان نشت یونی در لاین حساس در بلند مدت بیشتر از لاین متحمل بود. بیشترین میزان بیان نسبی دو ژن *P5CS1* و *PMP3-6* در شرایط تنش شوری (۸ dS/m) در بافت ریشه لاین متحمل مشاهده شد. در مقابل بیشترین میزان بیان نسبی ژن *SOS1* در بافت برگ لاین حساس در کوتاه مدت مشاهده شد. محاسبه همبستگی بین بیان نسبی ژن‌ها نشان داد بین بیان نسبی ژن‌های *P5CS1* و *PMP3-6* همبستگی مثبت و معنی‌داری ($P \leq 0.05$) وجود دارد. احتمالاً بیان بالای ژن‌های *P5CS1* و *PMP3-6* در ریشه لاین متحمل اندکی بعد از اعمال تنش شوری (کوتاه مدت) گیاه را در تنظیم فشار اسمزی و جلوگیری از ورود زیاد سدیم به درون گیاه یاری نموده و باعث افزایش تحمل گیاه به تنش شوری می‌شود. نتایج این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی ذرت برای تولید ارقام مقاوم به شوری مفید واقع شود.

Keywords: Abiotic stresses, *Zea mays* L., Salinity resistance, Ion leakage, Real time PCR.

واژه‌های کلیدی: تنش‌های غیر زیستی، ذرت، مقاومت به شوری، نشت یونی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی.

مقدمه

تنش‌های زیستی و غیر زیستی از عوامل مهم کاهش تولید محصولات زراعی محسوب می‌شوند (Huang *et al.*, 2008). شوری یک چالش زیست‌محیطی جهانی است که بر تولید محصول در بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی تأثیر می‌گذارد (Rengasamy, 2010). خاک شور خاکی است که هدایت الکتریکی عصاره اشباع^۱ آن بیش از چهار دسی‌زیمنس بر متر (dS/m)^۲ (معادل ۴۰ میلی‌مولار NaCl) باشد (Qadir *et al.*, 2000). شوری خاک ناشی از آنیون‌ها و کاتیون‌های بسیاری از جمله Na^+ ، Ca^{2+} ، Cl^- ، SO_4^{2-} و HCO_3^- می‌باشد، اما مهم‌ترین آن‌ها Na^+ و Cl^- است (Ebrahimi and Bhatla, 2012). زیرا یون‌های کلرید و سدیم بیشتر از سایر یون‌ها توسط سلول‌های ریشه گیاهان جذب می‌شوند (Rani *et al.*, 2012; Shahbaz and Ashraf, 2013). از جمله اثرات اولیه تنش شوری می‌توان به ایجاد تنش خشکی کاذب یا فیزیولوژیک (تنش اسمزی)، سمیت و عدم توازن یون‌ها و از اثرات ثانویه آن به تولید گونه‌های فعال اکسیژن^۳ و ایجاد تنش اکسیداتیو^۴ اشاره نمود که منجر به کاهش میزان فتوسنتز، کاهش میزان فعالیت آنزیم‌ها و فعالیت‌های متابولیسمی سلول، اختلال در عمل غشاها و نهایتاً کاهش رشد می‌شوند. تنش اسمزی به صورت سریع در فاز اولیه تنش رخ داده و تنش یونی به صورت کند در فاز دوم تنش رخ می‌دهد که در سطوح بالای تنش شوری باعث مرگ سلول‌های گیاهی می‌گردند (Munns and Tester, 2008; Horie *et al.*, 2012).

ذرت با نام علمی *Zea mays* L. گیاهی

یک‌ساله، دیپلوئید ($2n=20$)، یک‌پایه، دگرگشن و از خانواده گندمیان است. این گیاه از لحاظ فتوسنتزی جزو گیاهان C4 بوده و منشأ اولیه آن قاره‌ی آمریکا است. ذرت سومین محصول زراعی مهم پس از گندم و برنج است که در طیف وسیعی از خاک‌ها و شرایط آب و هوایی رشد می‌کند. ذرت، گندم و برنج حداقل ۳۰ درصد کالری بیش از ۴/۵ میلیارد نفر از جمعیت جهان را در ۹۴ کشور در حال توسعه جهان تأمین می‌کنند (Von Braun *et al.*, 2010). این گیاه یک منبع غنی از روغن و پروتئین است که بین ۸ تا ۱۵ درصد پروتئین مورد نیاز دنیا را تأمین می‌کند (Alizadeh *et al.*, 2009). این گیاه علاوه بر مصارف انسانی، خوراک دام و طیور بوده و ماده خام برای تولید بسیاری از محصولات صنعتی در سطح جهان را تأمین می‌کند (Salvador, 1997). سطح زیر کشت این محصول در سال ۲۰۱۷ در جهان حدود ۱۹۷ میلیون هکتار و تولید محصول آن حدود ۵/۷ تن در هکتار بوده است (FAO, 2017). پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۵۰ تقاضا برای ذرت در کشورهای در حال توسعه دو برابر شود (Rosegrant *et al.*, 2008). ذرت گیاهی است حساس به شوری و آستانه کاهش عملکرد گیاه در اثر شوری ۱/۷ dS/m گزارش شده است (Maas *et al.*, 1986).

تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش شوری از طریق تغییر در بیان پروتئین‌ها، هدایت آبی را کاهش می‌دهند؛ بنابراین مطالعه بیان ژن‌های درگیر در تحمل به شوری در بافت‌های مختلف گیاه، درک بهتر از پاسخ گیاه به تنش در سطح مولکولی را فراهم می‌نماید. ژن‌های گوناگونی در پاسخ به تنش دخالت دارند که اثرات تنش را به حداقل رسانده و منجر به تنظیم محیط سلولی و تحمل گیاه می‌شوند. تأثیر اولیه تنش‌های غیر زیستی در دیواره سلولی و غشای پلاسمایی رخ می‌دهد که به عنوان واسطه بین سلول و محیط خارج هستند (Bajji *et al.*, 2001). غشای پلاسمایی نقش مهمی در حفظ هومئوستازی سلول و انتقال سیگنال دارد. قرار گرفتن

1. Electrical conductivity of the soil saturation extract

2. DeciSiemens per meter

3. Reactive oxygen species (ROS)

۴ Oxidative burst

نام‌های *SOS3*، *SOS2* و *SOS1* شد که یک پیام کلسیم القاشده با تنش یونی را به هومئوستازی یونی متصل می‌نمایند. ژن *SOS1* نقش مهمی در تحمل به تنش شوری دارد. این ژن کد کننده یک آنتی‌پورتر پروتون / سدیم واقع در غشای پلاسمایی است. فعال سازی *SOS1* در خروج سدیم و توزیع مجدد این یون در سراسر گیاه نقش دارد (Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003). تغییر نسبت یون‌ها در گیاه تحت تنش شوری به علت نفوذ یون سدیم از طریق مسیرهای جذب یون پتاسیم می‌باشد (Oh *et al.*, 2010). هومئوستازی یونی در درون سلول یکی از جنبه‌های مهم در مقاومت به تنش شوری محسوب می‌شود.

در بسیاری از گزارش‌ها به وجود ارتباط مثبت بین تجمع پرولین و تحمل به تنش یا سازگاری به تنش اشاره شده است (Mattioli *et al.*, 2008). در برخی موارد مشاهده شده است که با افزایش پرولین خارجی، رشد سلول‌ها در محیط کشت افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد پرولین می‌تواند نقش مفیدی را در سازگاری سلول‌های کشت شده به تنش اسمزی ایفا نماید (Ehsanpour and Fatahian, 2003). به عنوان نمونه می‌توان به پژوهشی با عنوان تأثیر تنش شوری بر تنظیم بیان ژن‌های درگیر در بیوستنز پلی‌آمین در ذرت اشاره کرد (Rodríguez *et al.*, 2006). در مسیر بیوستنز پرولین، ژن *P5CS* کدکننده آنزیم کلیدی است که گلوتامات را به پرولین ۵-کربوکسیلات تبدیل می‌نماید (Kishor, 1989).

مطالعه‌ای بیان ژن‌های *SOS2* و *PMP3-1* در آفتابگردان (Saadia *et al.*, 2013) نشان داد بیان هر دو ژن طی تنش شوری در مقایسه با شرایط نرمال افزایش یافت. در مطالعه‌ی دیگری تحت عنوان جداسازی و شناسایی ژن‌های *PMP3* در ذرت

در معرض تنش‌های غیر زیستی باعث افزایش نفوذپذیری غشاها و در نتیجه از بین رفتن الکترولیت‌های درون سلول می‌شود (Lyons, 2012). بنابراین، محافظت از غشای پلاسمایی در هنگام قرار گرفتن در معرض تنش‌های غیر زیستی مهم است. اولین بار در ساکارومایسس سرویزیه^۱ گزارش شد که پروتئولیبید غشای پلاسمایی *PMP3*^۲ در تعدیل اثرات تنش‌های درجه حرارت پایین و شوری که باعث بی‌ثباتی غشای سلول می‌شوند، نقش دارد (Navarre and Goffeau, 2000). بعداً بیشتر روشن شد که *PMP3* به عنوان یکی از اعضای گروه پلی‌پپتیدهای هیدروفوبیک کوچک، نقش مهمی در حفظ هومئوستازی یونی طی مواجهه با تنش شوری، خشکسالی، سرما و آبسزیک‌اسید دارد (Fu *et al.*, 2012). برای پی‌بردن به کارایی این ژن در محافظت از غشای سلولی، ارزیابی نشت یونی^۳ روشی مناسب است چرا که تنش شوری باعث افزایش نشت یونی می‌گردد. دلیل این افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (*ROS*) و القای تنش اکسیداتیو است؛ گونه‌های فعال اکسیژن منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تغییر در نفوذپذیری غشا و خسارت به سلول می‌گردند و در نتیجه ی آن غشای سلولی پاره شده و نشت یونی افزایش می‌یابد (Farooq *et al.*, 2015).

سیستم *SOS*^۴ در گیاه آرابیدوپسیس تالیاناً^۵ به عنوان یک سیستم پیام‌رسان سلول در مسیرهای تحمل به تنش شوری عمل می‌نماید (Quintero *et al.*, 2002). آنالیز مولکولی موتانت‌های *SOS* منجر به شناسایی سه پروتئین درگیر در این سیستم به

1. *Saccharomyces cerevisiae*
2. Plasma membrane proteolipid 3
3. Electrolyte leakage
4. Reactive oxygen species
5. Salt overly sensitive
6. *Arabidopsis thaliana*

۱۴/۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۱۷/۵ سانتی‌متر) حاوی پرلیت و پیت‌ماس با نسبت دو به سه کشت شدند. در طول دوره رشد از محلول غذایی هوگ‌لند (pH محلول معادل ۵/۸) برای تغذیه و آبیاری گلدان‌ها استفاده شد. در مرحله هشت برگی (مرحله‌ی گیاهچه‌ای) تنش شوری ۸ dS/m (از منبع NaCl، کمپانی Merck آلمان) به نصف تعداد گلدان‌های هر لاین (به تعداد ۱۲ گلدان و یک بوته در هر گلدان) اعمال گردید و نصف دیگر گلدان‌های هر لاین در همان شرایط قبلی رشد یافتند. نمونه‌برداری از برگ‌ها و ریشه‌های گیاهان در دو زمان ۲۴ ساعت (کوتاه مدت) و ۷ روز (بلند مدت) بعد از اعمال تنش شوری انجام گرفت. در تعدادی از بررسی‌ها ژن‌های درگیر در تنش شوری در کوتاه مدت در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش شوری بررسی شده است (Hassani *et al.*, 2016) و در تعدادی ژن‌های درگیر در بلندمدت زمان‌های ۳، ۷ و ۱۲ روز بعد از اعمال تنش بررسی شده است (Abdolahi *et al.*, 2017). در این تحقیق زمان ۲۴ ساعت و ۷ روز جهت بررسی ژن‌های درگیر در تنش انتخاب شد. نمونه‌ها بلافاصله به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۲ تکرار اجرا شد.

اندازه‌گیری نشت یونی

در مرحله‌ی ۸ برگی از برگ‌های کامل هر یک از گیاهان مورد نظر نمونه‌برداری صورت گرفته و برگ‌ها در اندازه‌های یکسان برش داده شده و داخل فالتکون قرار گرفتند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به فالتکون‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت بر روی دستگاه شیکر قرار گرفتند و میزان هدایت الکتریکی^۱

(Fu *et al.*, 2012) مشاهده شد بیان این ژن‌ها تحت تنش شوری افزایش یافت. بنابراین احتمالاً این ژن‌ها در ایجاد مقاومت گیاه در برابر تنش نقش دارند. هدف از این پژوهش، مطالعه تغییرات بیان نسبی ژن‌های SOS1، P5CS1 و PMP3-6 تحت تنش شوری در دو لاین متحمل و حساس ذرت بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تنش شوری

تعداد ۹۳ لاین خالص ذرت که از دانشگاه رازی کرمانشاه، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی و مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شده‌اند، تحت شرایط نرمال و تنش شوری ۸ dS/m در شرایط گلدانی و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه ارزیابی شدند (نتایج منتشر نشده). در این آزمایش گلدان‌ها با خاک لومی شنی پر شدند. از روش کیف بوختر برای تعیین شوری اولیه خاک استفاده شد. میزان شوری اولیه خاک ۲ dS/m بوده و از نمک NaCl برای تنظیم شوری خاک در محدوده‌ی ۸ dS/m استفاده شد. شوری خاک در ۳ مرحله در طول آزمایش کنترل و در صورت نیاز با نمک NaCl تصحیح گردید. متوسط درجه حرارت در طول آزمایش ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور آبیاری در ابتدا هر ۵ روز یک بار و در انتها به هر روز آبیاری تغییر یافت. بر اساس تجزیه و تحلیل نتایج در شرایط نرمال و تنش شوری، ۲ لاین با واکنش متفاوت به شوری (لاین شماره ۱۰ به‌عنوان لاین متحمل و لاین شماره ۴۶ به‌عنوان لاین حساس) انتخاب شدند (جدول ۱). لاین‌ها در اتاق رشد با شرایط کنترل شده (شدت نور بین ۱۰ هزار تا ۱۲ هزار لوکس، ۱۶ ساعت دوره‌ی روشنایی و ۸ ساعت دوره‌ی تاریکی، متوسط دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت محیط بین ۷۵ تا ۸۰ درصد) در گلدان‌های (با ارتفاع

1. Electrical conductivity (EC)

میکرولیتر آغازگر الیگو dT (Oligo dT18) (۱۰ میکرو مولار) به آن اضافه شد. پس از انجام یک سانتریفیوژ پالسی، لوله حاوی مواد، به مدت ۵ دقیقه در دمای 65°C قرار گرفت. پس از سرد کردن لوله حاوی مواد روی یخ، یک ورتکس نرم (ورتکس با زمان کوتاه و دور کند) انجام گرفت. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش $5\times$ RiboLock™ RNase Inhibitor (۲۰ واحد در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی مولار) و ۱ میکرولیتر آنزیم RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) به لوله حاوی مواد اضافه شد. بعد از انجام سانتریفیوژ پالسی، لوله حاوی مواد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای 42°C و به مدت ۵ دقیقه در دمای 72°C قرار داده شد. پس از ساخت cDNA واکنش‌های کنترل مثبت و منفی به منظور بررسی صحت ساخت cDNA و عدم آلودگی به DNA ژنومی انجام گرفت و پس از تأیید cDNA ساخته شده، میزان تغییرات بیان نسبی سه ژن *SOS1*، *P5CS1* و *PMP3-6* بررسی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در زمان واقعی (Real time PCR)

برای مطالعه تغییرات بیان نسبی ژن‌ها، ابتدا توالی کدکننده ژن‌های *SOS1*، *P5CS1* و *PMP3-6* از پایگاه اطلاعاتی NCBI ذخیره و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزارهای Primer-Blast و Oligo analyzer نسخه (1.0.2) طراحی شد (جدول ۲). میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از دستگاه Rotor gene Q-Pure Detection-Qiagen مدل ۶۰۰۰ (کیاژن، آمریکا) بررسی شد. برای انجام Real time PCR از کیت Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2x) #K0241 شرکت فرمنتاز استفاده شد. ترکیب و مقادیر مواد مورد نیاز جهت انجام Real time PCR در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر در نظر گرفته

اولیه (EC_1) با استفاده از دستگاه EC سنج اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در حمام آب گرم با دمای 70°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از رسیدن دما به 90°C درجه سانتی‌گراد (که حدوداً ۲۵ دقیقه طول کشید)، میزان هدایت الکتریکی ثانویه (EC_2) اندازه‌گیری شد. در نهایت مقدار نشت یونی نمونه‌های مورد نظر با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد (Lutts, 1995).

$$EL = (EC_1/EC_2) \times 100$$

در این فرمول EL میزان نشت یونی، EC_1 میزان هدایت الکتریکی اولیه و EC_2 میزان هدایت الکتریکی ثانویه می‌باشد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از نمونه‌های ریشه و برگ با استفاده از محلول استخراج RNX-plus™ (سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت و بر روی یخ انجام گرفت. برای بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد و سپس عکس‌برداری از ژل در زیر UV^۱ با دستگاه Gel Documentation انجام گرفت. قبل از سنتز cDNA، تیمار DNase برای حذف DNA ژنومی طبق دستورالعمل موجود در کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, USA) انجام گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. برای سنتز cDNA در لوله استریل ۰/۲ میلی‌لیتری، به مقدار ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز ریخته شد. سپس ۶ میکرولیتر RNA استخراج شده (۲ میکروگرم) و ۱

شد، به طوری که ۶/۲۵ میکرولیتر از کیت مورد نظر، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی (۱۰ میکرومولار)، ۰/۳ میکرولیتر از cDNA (۵۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) و ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز درون لوله ۰/۲ میلی‌لیتر استریل ریخته و داخل دستگاه قرار داده شد.

جدول ۱. خصوصیات مورفولوژیک دو لاین ذرت تحت شرایط نرمال و تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر

K ⁺ /Na ⁺	محتوای نسبی آب برگ (RWC %)		عملکرد دانه (g)		عرض برگ (cm)		طول برگ (cm)		ارتفاع بوته (cm)		قطر ساقه (cm)		شرایط تنش (dS/m)		شماره مقاومت لاین به تنش شوری	لاین
	Se	Mean	Se	Mean	Se	Mean	Se	Mean	Se	Mean	Se	Mean	Se	Mean		
0.841	41.462	0.690	79.25	1.528	270.75	0.047	5.2	0.157	31	0.318	145.333	0.002	2.203	0	Tolerant	10
0.559	40.710	1.269	68.69	3.003	270.17	0.05	5.333	0.609	32.833	1.108	188.666	0.002	2.183	8		
0.373	53.626	0.296	80.74	3.644	156.80	0.01	4.1	0.094	31.166	1.099	155	0.009	2.003	0	Susceptible	46
1.071	31.001	0.591	80.66	0.547	82.87	0.02	4.2	0.327	23	1.594	105	0.010	1.793	8		

Se: standard error, dS/m: deciSiemens per meter, g: gram, cm: centimeter, RWC: Relative water content.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در Real Time PCR برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها تحت تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس

ژن	شماره دسترسی	توالی پرایمر (۵'→۳')	دمای اتصال (°C)	اندازه محصول (bp)
<i>SOS1</i>	LOC100383969	F: 5'- GTGGGGTTGTTATTGCAGATGGT R: 5'- CCAACCCATACCCAAAGTGACG	63	165
<i>P5CS1</i>	LOC103630430	F: 5'- TTCGATGAGGGACGGTGAAGT R: 5'- CCTAGACTAGACACAGCCTCGGTA	64	141
<i>PMP3-6</i>	LOC100279015	F: 5'-TGCTTGCTACCACGCCTCCT R: 5'- ACGAACGTCTCCGACCCCAT	61.5	159
<i>Actin</i>	LOC100281811	F: 5'-CTGAGGTTCTATCCAGCCATC R: 5'- CCACCACTGAGGACAACATTAC	61	133

bp: base pair, SOS: Salt overly sensitive, P5CS: Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase, PMP: Plasma membrane proteolipid.

(شکل ۱). آزمایش در ۲ تکرار زیستی (آزمایشی) و ۳ تکرار تکنیکی (آزمایشگاهی) انجام گرفت.

تجزیه‌های آماری

به منظور بررسی تاثیر ژنوتیپ، بافت، مدت زمان پس از اعمال تنش بر میزان بیان نسبی ژن‌ها، تجزیه‌ی داده‌ها به صورت فاکتوریل بر پایه مدل آماری طرح پایه کاملاً تصادفی با رویه GLM در نرم‌افزار SAS^۵ (نسخه ۹/۴) انجام گرفت. همبستگی بین میزان بیان نسبی ژن‌ها با رویه‌ی COIT در همین نرم‌افزار محاسبه شد.

نتایج و بحث

بررسی میزان نشن یونی

دوره‌های زمانی جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر با توجه به توالی آغازگرها و محصول حاصل از تکثیر ژن شامل فعال‌سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در یک چرخه و بعد ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و اتصال آغازگرها در دماهای اتصال مربوط به هر ژن به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. جهت نرمال‌سازی داده‌ها از ژن *Actin* به عنوان ژن مرجع^۱ یا خانه‌دار استفاده شد. پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی ذوب^۲ برای هر ژن به دست آمد و با استفاده از آن درستی تکثیر محصول مربوط به هر ژن بررسی و تایید شد

3. Biological/experimental repeats (=consist of different biological samples)

4. Technical repeat

5. Statistical Analysis System

1. Internal control or reference gene or housekeeping gene

2. Melting curve

سلولی و خروج بیشتر الکترولیت‌ها از غشاء می‌باشد (Hana et al., 2004). به‌طور کلی نفوذپذیری بیشتر غشاء سلولی در نتیجه تنش‌های محیطی، باعث افزایش نشت ترکیبات سلولی مانند پتاسیم، آمینواسیدها، کربوهیدرات‌ها و در مجموع الکترولیت‌های مختلف به خارج از سلول می‌شود (Mandhanis, 2006). Kaya و همکاران (2002) گزارش کردند که نشت یونی در ذرت در اثر تنش شوری افزایش می‌یابد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (Kaya et al., 2002).

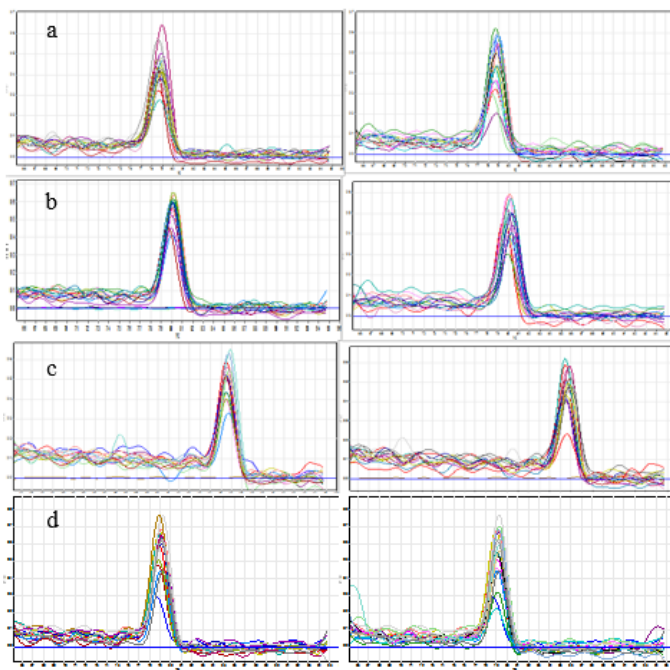
جدول ۳. تجزیه واریانس برای نشت یونی در برگ دو لاین

حساس و متحمل ذرت در شوری صفر و ۸ دسی‌زیمنس بر متر.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
Salt	1	1535.74**
Line	1	196.91 ^{ns}
Time	1	661.45*
Salt × Line	1	1405.22**
Salt × Time	1	1055.80*
Line × Time	1	58.36 ^{ns}
Line × Salt × Time	1	277.48 ^{ns}
Error	7	89.43

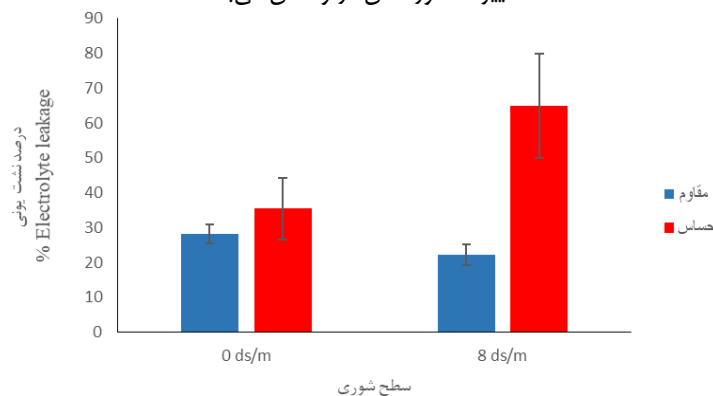
ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر لاین و همچنین برهمکنش لاین × شوری در سطح احتمال ۱٪ و اثر لاین × زمان در سطح احتمال ۵٪ بر میزان نشت یونی معنی‌دار است (جدول ۳). درجه آزادی اشتباه ۷ به دلیل وجود یک تکرار گم شده در ترکیب تیماری می‌باشد. میزان نشت یونی در سطح شوری صفر دسی‌زیمنس بر متر در لاین حساس کمی بیشتر از لاین متحمل بود؛ ولی اختلاف بین دو لاین از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. نشت یونی در شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر در لاین حساس خیلی بیشتر از لاین متحمل (حدود ۳/۵ برابر) بود. میزان نشت یونی در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری در لاین حساس کمی بیشتر از لاین متحمل بود؛ ولی اختلاف بین دو لاین از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. نشت یونی در ۷ روز بعد از اعمال تنش شوری در لاین حساس خیلی بیشتر از لاین متحمل (حدود ۴ برابر) بود (شکل‌های ۲ و ۳). مقادیر بالای نشت یونی نشان‌دهنده‌ی عدم توانایی غشا در حفظ ترکیبات درون سلولی، اختلال در فعالیت و انسجام غشاء

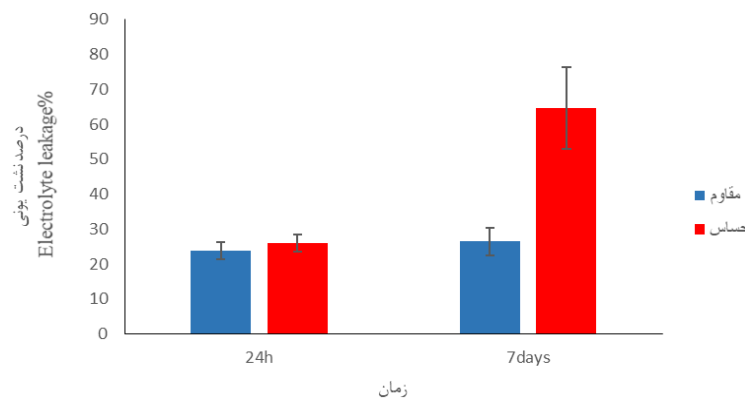


شکل ۱. منحنی ذوب ژن‌های مورد مطالعه (a): *SOS1*، (b): *P5CSI*، (c): *PMP3-6*، (d): *Actin* به ترتیب از چپ به راست ریشه و برگ، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی در ذرت تحت شرایط تنش شوری. در نمودارها محور ایکس دما (درجه سانتی‌گراد) و

محور ایگرگ نسبت dF به dT است (dF/dT). یعنی نسبت مشتق تابع فلورسنس در مقابل دمای ذوب است که نشان‌دهنده میزان تغییرات فلورسنس در واکنش می‌باشد.



شکل ۲. اثر متقابل لاین × شوری بر میزان نشت یونی در دو لاین حساس و متحمل ذرت



شکل ۳. اثر متقابل لاین × زمان بر میزان نشت یونی در دو لاین حساس و متحمل ذرت

بیان نسبتی ژن *SOS1* در بافت ریشه لاین متحمل در مقایسه با لاین حساس احتمالاً باعث پمپاژ سدیم اضافی وارد شده به سیتوپلاسم سلول‌های ریشه، به محیط بیرون شده و بدین ترتیب تعادل یونی ایجاد و باعث مقاومت گیاه به شوری می‌شود. در این راستا چون سدیم اضافی به بافت‌های برگ منتقل نشده؛ لاین متحمل نیازی به افزایش بیان ژن نمی‌بیند چون هرگونه افزایش در بیان ژن و تولید فرآورده‌ای به قیمت کاهش عملکرد است.

بیان نسبتی ژن *SOS1*

بر اساس نتایج تجزیه واریانس تمامی اثرات اصلی مورد بررسی شامل لاین، بافت و مدت زمان پس از اعمال تنش شوری و اثر متقابل دو جانبه و سه جانبه آن‌ها بر روی بیان نسبتی ژن *SOS1* معنی‌دار ($P \leq 0.01$) می‌باشد (جدول ۴). در بافت ریشه بیشترین افزایش در بیان نسبتی ژن *SOS1* در لاین متحمل در کوتاه مدت (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) مشاهده شد. در بافت برگ در مقابل، بیشترین میزان بیان نسبتی ژن *SOS1* در لاین حساس باز در کوتاه مدت (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) مشاهده شد. میزان بیان ژن *SOS1* در طولانی مدت (۷ روز بعد از اعمال تنش شوری) در هیچ‌کدام از لاین‌ها (اعم از متحمل و حساس) در هیچ‌یک از بافت‌های مورد مطالعه تغییرات محسوسی نشان نداد (شکل ۴).

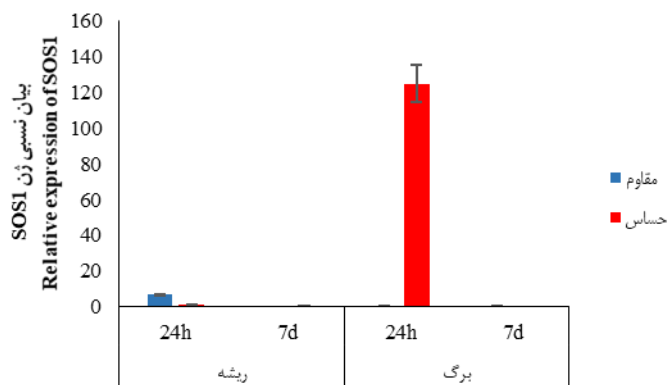
جدول ۴. تجزیه واریانس برای تغییرات بیان نسبتی ژن‌های مورد مطالعه در ریشه و برگ دو لاین حساس و متحمل ذرت تحت تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		<i>SOS1</i>	<i>P5CSI</i>	<i>PMP3-6</i>
Tissue	1	3409.27**	9.22*	8051.13**
Line	1	3556.74**	0.016 ^{ns}	15355.54**

Line × Tissu × Time	1	4279.65**	12.45*	7178.05**
Error	8	26.91	1.71	263.94

ns. * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

Time	1	4199.30**	44.73**	7903.33**
Tissue × Line	1	4381.88**	5.54 ^{ns}	14597.12**
Tissue × Time	1	3418.90**	1.08 ^{ns}	6075.44**
Line × Time	1	3547.86**	0.28 ^{ns}	14204.74**



شکل ۴. تغییرات بیان نسبی ژن *SOS1* در ریشه و برگ لاین‌های متحمل و حساس ذرت، ۲۴ ساعت و ۷ روز بعد از اعمال تنش شوری.

سطح بیان، فقط در رابطه با *SOS1* اتفاق افتاده و ژن‌های دیگر (*NHX1* و *AKT1*) فعالیت آنچنانی نداشته‌اند؛ به عبارتی *SOS1* یک جانبه پمپاژ سدیم به بیرون را انجام داده و سدیم اضافی از طریق راه‌های دیگر تخلیه و مدیریت نشده است بنابراین سیتوپلاسم برای فعالیت آنزیم‌ها وضعیت مساعد نداشته و این وضعیت باعث ضعف در توانایی لاین در مقابله با تنش شوری شده است. وضعیت K^+/Na^+ در دو لاین مورد مطالعه با نتایج بیان نسبی ژن *SOS1* تا حدودی هم‌خوانی دارد (جدول ۱). Shi و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که افزایش بیان ژن *SOS1* از طریق تنظیم پروموتور CaMV 35S در گیاه آرابیدوپسیس، با جلوگیری از تجمع یون سدیم در ساقه و برگ، باعث بهبود تحمل به تنش شوری در این گیاه شد (Shi et al., 2003).

بیان نسبی ژن *P5CSI*

تجزیه واریانس روی داده‌های بیان نسبی ژن *P5CSI* نشان داد که به غیر از دو اثر اصلی زمان و بافت که به ترتیب در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و اثر سه جانبه لاین × بافت × زمان که در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند بقیه‌ی اثرات روی بیان نسبی

در مقابل در لاین حساس به دلیل عدم کنترل ورود و عدم ایجاد تعادل یونی در سطح ریشه، سدیم اضافی احتمالاً به قسمت‌های بالا یعنی بافت‌های برگ منتقل شده است. گیاه (لاین حساس) برای ایجاد تعادل به ناچار سطح بیان ژن *SOS1* را در بافت برگ افزایش داده است. چنانچه مشخص شده است این ژن بخشی از سیستم SOS هست که در جهت ایجاد تعادل یونی (همئوستازی یونی) فعال می‌شود. بدین گونه که به محض دریافت تنش، سطح کلسیم درون سلولی افزایش پیدا کرده؛ بالا رفتن سطح کلسیم را گیرنده‌های مختلف از جمله *SOS3* دریافت می‌کنند. *SOS3* با ایجاد کمپلکس با *SOS2* و با فسفوریلاسیون آن باعث فعال شدن *SOS2* می‌گردد. کمپلکس *SOS3-SOS2* باعث فعال شدن *SOS1* و *NHX1* و عدم فعالیت *AKT1* می‌گردد که به ترتیب باعث پمپاژ سدیم به بیرون سلول، انتقال سدیم به درون واکوئل و بسته شدن راه ورود سدیم از طریق کانال ویژه پتاسیم به درون سلول می‌گردد. احتمالاً در لاین حساس بالا رفتن

1. Sodium-Hydrogen Exchangers (The vacuolar Na^+/H^+ antiporter)
2. High-affinity K^+ transporter

ژن معنی‌دار نبودند (جدول ۴).

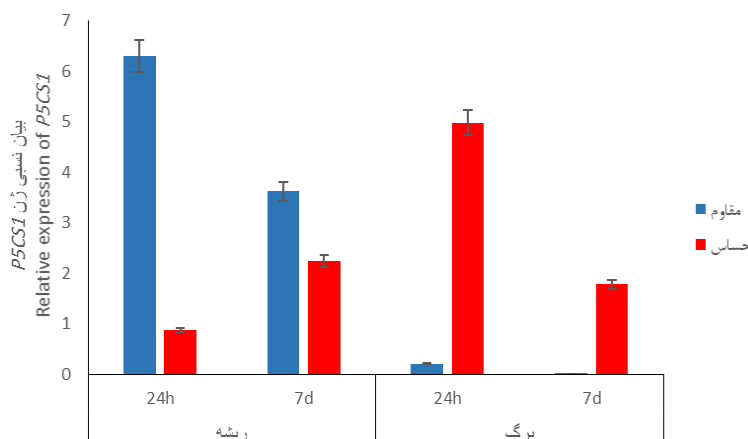
میزان بیان ژن *P5CSI* در بافت ریشه در هر دو زمان ۲۴ ساعت و ۷ روز بعد از اعمال تنش شوری در لاین متحمل بیشتر از لاین حساس افزایش یافته است. در حالی که بیان ژن *P5CSI* در بافت برگ در هر دو زمان در لاین حساس بیشتر از لاین متحمل بود. در مقایسه ۲ زمان نمونه برداری بعد از اعمال تنش شوری، اختلاف بیان نسبی ژن در دو لاین در زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش بسیار بیشتر از آن در ۷ روز بعد از اعمال تنش است.

در مقایسه روند تغییرات بیان ژن در دو لاین در بافت ریشه مشاهده شد که در لاین متحمل میزان بیان در ۷ روز بعد از اعمال تنش در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش کاهش یافته است که این امر احتمالاً به دلیل سازگاری گیاه به شرایط تنش می‌باشد در حالی که در لاین حساس بر عکس آن میزان بیان در ۷ روز بعد از اعمال تنش در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش افزایش یافته است.

در مقایسه روند تغییرات بیان ژن در دو لاین در بافت برگ مشاهده شد که در هر دو لاین میزان بیان در ۷ روز بعد از اعمال تنش در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش کاهش یافته است و این کاهش در لاین حساس بسیار بیشتر از لاین متحمل است (شکل ۵). نتایج به دست آمده از مطالعه‌ای که Ibragimova و همکاران (۲۰۱۵) از طریق کلون کردن و انتقال ژن *P5CSI* به گیاه توتون انجام دادند، نشان داد که سطح پرولین در گیاهان تراریخته در

شرایط تنش شوری، ۱/۵ تا ۴ برابر افزایش داشت و گیاهچه‌ها در مراحل اولیه رشد، دارای سرعت رشد ریشه‌ی بیشتری نسبت به گیاهان نرمال بوده و سریع‌تر توسعه یافتند (Ibragimova et al., 2015). مطالعات دیگری که در رابطه با بیان ژن *P5CSI* در آراییدوپسیس انجام گرفته است نشان می‌دهد که گیاهان تراریخته‌ی حاوی این ژن، بیان بالایی را در کل گیاه در شرایط کم‌آبی داشتند، در صورتی که در شرایط غیرتنش، بیان این ژن در اندام‌های تولید مثلی هم‌چنان بالا بود (Yoshida et al., 1999).

از آنجایی که ریشه اولین اندام در برخورد با تنش می‌باشد عملی که گیاه در شرایط تنش در راستای کاهش خسارت انجام می‌دهد خیلی مهم و حیاتی است در نتیجه احتمالاً افزایش بیان ژن *P5CSI* در بافت ریشه باعث افزایش تجمع پرولین (که نوعی سازگارساز می‌باشد) در ریشه‌ی گیاه شده و بدین ترتیب تنظیم فشار اسمزی صورت گرفته و جذب آب توسط گیاه انجام می‌گیرد. وضعیت محتوای نسبی آب برگ (RWC) در دو لاین مورد مطالعه با نتایج بیان نسبی ژن تا حدودی هم‌خوانی دارد (جدول ۱). از طرفی ورود بیش از حد سدیم به گیاه در جریان جذب آب با افزایش بیان ژن *SOS1* در لاین متحمل مدیریت شده؛ طوری که سدیم اضافی به بیرون پمپاژ می‌شود. بنابراین افزایش بیان این دو ژن (*SOS1* و *P5CSI*) در گیاه احتمالاً زمینه را برای مقاومت گیاه به تنش شوری فراهم می‌نماید.



شکل ۵. تغییرات بیان نسبی ژن *P5CSI* در ریشه و برگ لاین‌های متحمل و حساس ذرت، ۲۴ ساعت و ۷ روز بعد از اعمال تنش شوری.

به اندام‌ها و بافت‌های خاصی محدود می‌شود و بنابراین به احتمال زیاد در بافت‌های مختلف تحت شرایط نرمال و تنش عملکرد متفاوتی دارند (Fu et al., 2012).

همبستگی بین بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه

نتایج مطالعه همبستگی بین بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه (جدول ۵) نشان داد که بین بیان ژن‌های *PMP3-6* و *P5CSI* همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد. همبستگی بین بیان نسبی ژن‌های *SOS1* و *PMP3-6* منفی و بین ژن‌های *SOS1* و *P5CSI* مثبت اما غیرمعنی‌دار بودند. غیرمعنی‌دار بودن بعضی نتایج احتمالاً به دلیل کمتر بودن تعداد نمونه و درجه آزادی کمتر می‌باشد.

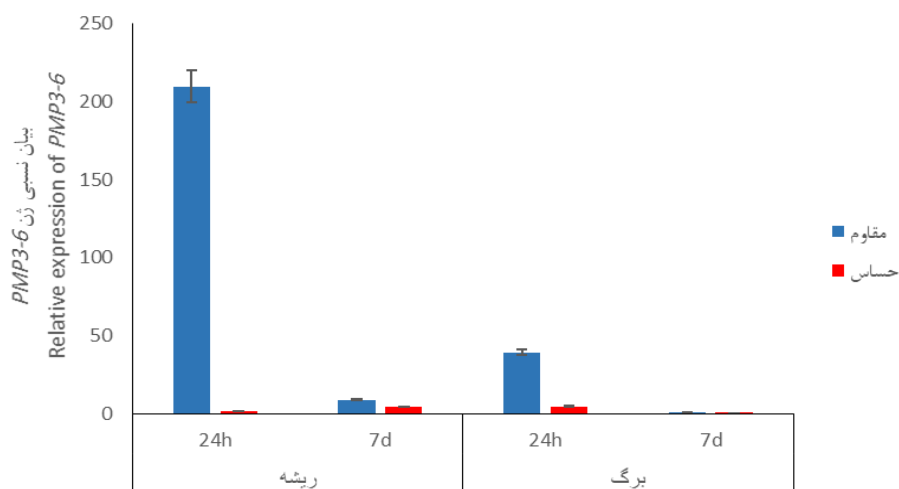
جدول ۵. همبستگی بین تغییرات بیان نسبی ژن‌های *SOS1*، *P5CSI* و *PMP3-6* در ریشه و برگ دو لاین متحمل و حساس ذرت تحت تنش شوری.

Gene	<i>SOS1</i>	<i>P5CSI</i>	<i>PMP3-6</i>
<i>SOS1</i>	1.00		
<i>P5CSI</i>	0.40 ^{ns}	1.00	
<i>PMP3-6</i>	-0.11 ^{ns}	0.57*	1.00

ns و *: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد.

بیان نسبی ژن *PMP3-6*

تجزیه واریانس روی داده‌های بیان نسبی ژن *PMP3-6* نشان داد تمامی اثرات اصلی و اثرات متقابل دو جانبه و سه جانبه بر روی بیان ژن *PMP3-6* معنی‌دار ($P \leq 0.01$) می‌باشد (جدول ۴). میزان بیان ژن *PMP3-6* در لاین متحمل در هر دو بافت در زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش بیشتر از لاین حساس بود. البته اختلاف دو لاین در این زمان (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش) در بافت ریشه بیشتر از بافت برگ بود. میزان بیان ژن در طولانی مدت (۷ روز بعد از اعمال تنش) در هیچ‌کدام از لاین‌ها (اعم از متحمل و حساس) به‌خصوص در بافت برگ تغییرات محسوسی نشان نداد (شکل ۶). Fu و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای که بر روی ژن‌های خانواده‌ی *PMP* در ذرت در رابطه با تنش شوری انجام دادند، نتیجه گرفتند که گیاهان متحمل دارای سطح بسیار بالایی برای هر هشت ژن *ZmPMP3* در بافت‌های جوان بودند. بیشترین سطح بیان ژن *ZmPMP3-6* در بافت ابریشم مشاهده شد. طبق گزارش آن‌ها، فعالیت ایزومرهای مختلف ژن *PMP3*



شکل ۶. تغییرات بیان نسبی ژن *PMP3-6* در ریشه و برگ لاین‌های متحمل و حساس ذرت، ۲۴ ساعت و ۷ روز بعد از اعمال تنش شوری.

می‌باشد. در ادامه در نظر هست تجزیه بیان ژن در لاین های حساس و متحمل در هر دو بافت ریشه و برگ با روش توالی‌یابی RNA (RNA Sequencing) انجام گیرد تا شبکه ژنی درگیر در مقاومت شناسایی شود. همسانه‌سازی و انتقال ژن‌های عامل مقاومت به ارقام حساس و بررسی مقاومت تراریخته‌ها در سطح مولکولی یا ویرایش توالی ژن‌های درگیر در لاین حساس با تکنولوژی نوظهور CRISPR/Cas9 در تأیید نقش ژن‌ها در مقاومت کمک اساسی خواهد نمود.

نتیجه‌گیری

شوری تنش پیچیده‌ای است که بر فعالیت‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه تأثیر می‌گذارد و باعث کاهش رشد گیاه می‌شود. گیاه با تغییر بیان ژن‌ها سعی در تعدیل اثرات تنش شوری می‌نماید. در این مطالعه افزایش بیان ژن‌های مورد مطالعه مخصوصاً دو ژن *PMP3-6* و *P5CS1* در بافت ریشه در مقایسه با بافت برگ در لاین متحمل احتمالاً حاکی از نقش مثبت این ژن‌ها در مقاومت به تنش شوری در ذرت

REFERENCES

- Abdolahi B, Alipour M, Darvishzadeh R, Majroomi B (2017) The effect of drought stress on the expression of genes encoding phenylalanine ammonia lyase (PAL), eugenol synthase 1 (EGS1) and caffeic acid O-methyltransferase (COMT) enzymes in Basil (*Ocimum basilicum*). Agricultural Biotechnology Journal. 9(4): 117-128.
- Alizadeh HA, Liaghat A, Abbasi F (2009) Effect of furrow fertigation on fertilizer and water use efficiency, productivity and yield components of corn (*Zea mays* L.). Journal of Water and Soil. 23(4): 137-147.
- Bajji M, Kinet JM, Lutts S (2001) The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. Plant Growth Regulation. 36: 61-70.
- Ebrahimi R, Bhatla SC (2012) Ion distribution measured by electron probe X-ray microanalysis in apoplastic and symplastic pathways in root cells in sunflower plants grown in saline medium. Journal of Biosciences. 37: 713-721.
- Ehsanpour AA, Fatahian N (2003) Effect of salt and proline on Medicago Sativa callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 73: 53-56.
- Farooq M, Hussain M, Wakeel A, Siddique KH (2015) Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. A review.

- Agronomy for Sustainable Development. 35(2): 461-481.
- Food and Agriculture Organization (2017) Statistics: FAOSTAT agriculture. Retrieved from <http://fao.org/crop/statistics>.
- Fu J, Zhang DF, Liu YH, Ying S, Shi YS, Song YC, Wang TY (2012) Isolation and characterization of maize *PMP3* genes involved in salt stress tolerance. PloS One. 7(2): e31101.
- Hana B, Bischofa JC (2004) Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. Cryobiology. 48: 8-21.
- Hassani H, Abdollahi Mandoulakani B, Darvishzadeh R, Hassani A (2016) Increasing the expression of genes Chavicol O-Methyl Transferase and Cinnamate 4-Hydroxylase under Methyl Jasmonate treatment in medicinal plant basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Plant Production. 39(3): 101-112.
- Horie T, Karahara I, Katsuhara M (2012) Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: an overview with the central focus on rice plants. Rice 5: 11-29.
- Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ (2008) The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. Journal of Experimental Botany. 59(11): 2991-3007.
- Ibragimova SM, Trifonova EA, Filipenko EA, Shymny VK (2015) Evaluation of Salt Tolerance of Transgenic Tobacco Plants Bearing with *P5CS1* Gene of *Arabidopsis thaliana*. Genetika. 51(12): 1368-1375.
- Kaya C, Kirnak H, Higgs D, Satali K (2002) Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. Horticulture. 93: 65-74.
- Kishor KPB (1989) Salt stress in cultured rice cells, effects of proline and abscisic acid. Plant Cell and Environment. 12: 629-633.
- Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J (1995) Changes in plant response to (NaCl) during development of rice varieties differing in salinity resistance. Journal of Experimental Botany. 46: 1843-1852
- Lyons J (2012) Low Temperature Stress in Crop Plants: the role of the membrane. Elsevier.
- Maas EV, Poss JA, Hoffman GJ (1986) Salinity sensitivity of sorghum at three growth stages. Irrigation Science. 7(1): 1-11.
- Mandhanis S, Madan S, Whney V (2006) Antioxidant defence mechanism under salt stress in wheat seedling. Biologia Plantarum. 50(2): 227-231.
- Mattioli R, Marchese D, D'Angeli S, Altamura MM, Costantino P, Trovato M (2008). Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology. 66(3): 277-288.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology. 59: 651-681.
- Navarre C, Goffeau A (2000) Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of *PMP3* a highly conserved small protein of yeast plasma membrane. EMBO Journal. 19: 2515-2524.
- Oh DH, Ali Z, Park Hyeong C, Bressan RA, Yun Dae J, Bohnert HJ (2010) Consequences of *SOS1* deficiency: Intracellular physiology and transcription. Plant Signaling and Behavior. 5(6): 766-768.
- Qadir M, Ghafoor A, Murtaza G (2000) Amelioration strategies for saline soils: a review. Land Degradation and Development. 11: 501-521.
- Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu JK, Pardo JM (2002) Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* *SOS* signaling pathway for Na⁺ homeostasis.

- Proceedings of the National Academy of Sciences. 99(13): 9061-9066.
- Rani CR, Reema C, Alka S, Singh PK (2012) Salt tolerance of *Sorghum bicolor* cultivars during germination and seedling growth. Research Journal of Recent Sciences. 1: 1- 10.
- Rengasamy P (2010) Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. Functional Plant Biology. 37(7): 613-620.
- Rodríguez-Kessler M, Alpuche-Solís AG, Ruiz OA, Jimenez-Bremont JF (2006) Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. Plant Growth Regulation. 48(2): 175-185.
- Rosegrant MW, Msangi S, Ringler C, Sulser TB, Zhu T, Cline SA (2008) International model for policy analysis of agricultural commodities and trade (IMPACT): Model description.
- Saadia M, Jamil A, Ashraf M, Akram NA (2013) Comparative study of *SOS2* and a novel *PMP3-1* gene expression in two sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines differing in salt tolerance. Applied Biochemistry and Biotechnology. 170(4): 980-987.
- Salvador RJ (1997) Maize. In: The Encyclopedia of Mexico: History, Culture and Society, Vol II. Fitzory Dearborn Publeasher, Chicago and London. pp. 769-775.
- Shahbaz M, Ashraf M (2013) Improving salinity tolerance in cereals. Critical Reviews in Plant Sciences. 32: 237-249.
- Shi H, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Nature Biotechnology. 21(1): 81.
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long-distance Na⁺ transport in plants. The Plant Cell. 14(2): 465-477.
- Von Braun J, Byerlee D, Chartres C, Lumpkin T, Olembo N, Waage J (2010) A draft strategy and results framework for the CGIAR. 20 March 2010. CGIAR, the World Bank, Washington, D.C.
- Yoshida Y, Nanjo T, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Stress-responsive and developmental regulation of Delta (1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (*P5CS1*) gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 261(3):766-772.