مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره دوم، بهار و تابستان ۱۳۹۱ (۳۷-۲۷)

Crop Biotech.
Vol.2, No. 2, Spring and Summer 2012

بررسی بیان ژن‌های *AlSOS1* و *AlNHX* در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* Parl تحت تنش شوری ناشی از کلریدسدیم

ولی‌اله قاسمی‌عمران[۱]*، عبدالرضا باقری[۲]، قربانعلی نعمت‌زاده[۳] و امین میرشمسی[۴]
۱، دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی‌کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۲، ۴، استادان و اعضای هیأت علمی‌گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی‌گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۳، استاد، عضوهیأت علمی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری‌گیاهی طبرستان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۲)

Evaluation of the Expression Pattern of *AlSOS1* and *AlNHX* Genes Under NaCl Stress in Halophyte Grass *Aeluropus littoralis* Parl.

V. GHASEMI OMRAN[1]*, A. R. BAGHERI[2], GH. NEMATZADEH[3] AND A. MIRSHAMSI[4]
1, Ph.D. Student of Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, 2, 4, Professors, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, 3, Professor, Genetics & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.
(Received: Jan. 21, 2012 - Accepted: Feb. 21, 2012)

چکیده

شوری و به‌طور عمده کلریدسدیم، از رشد گیاهان جلوگیری نموده و سبب کاهش تولیدات کشاورزی می‌گردد. در گیاهان عالی دفع و حجره‌بندی سدیم به‌واسطه آنتی‌پورترهای موجود در غشاهای پلاسمایی و واکوئلی انجام می‌شود. در این مطالعه، الگوی بیان ژن‌های *AlNHX* و *AlSOS1* در پاسخ به تیمار شوری ۲۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم در زمان‌های ۶ ساعت، ۱، ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش با استفاده از تکنیک Real Time-PCR در گیاه *Auleropus* مورد بررسی قرار گرفت. سطوح نسخه‌برداری دو ژن در پاسخ به تنش در همه بافت‌ها افزایش یافت. بیان ژن *AlSOS1* در بافت برگ پس از ۶ ساعت افزایش یافت و بیان ژن *AlNHX* پس از ۲۴ ساعت ازاعمال تنش به بالاترین میزان خود رسید. در بافت گره و میانگره سطوح نسخه‌برداری هر دو ژن، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش به‌شدت افزایش یافت و سپس در ۳ و ۸ روز بعد از اعمال تنش به‌تدریج کاهش یافت تا در نهایت ۱۷ روز پس از تنش به حالت پایدار برابر با شاهد (بدون تنش) بازگشت. میزان بیان هر دو ژن در بافت‌های ریشه به آهستگی بعد از اعمال تنش افزایش یافت و پس از ۳ روز به میزان حداکثر رسید و این میزان بیان تا ۸ روز پس از تنش ادامه یافت و در ژن *AlNHX* پس از ۱۷ روز به حالت پایدار برابر با شاهد بازگشت، درحالی‌که در مورد ژن *AlSOS1* پس از ۱۷ روز همچنان بیان دو برابر شاهد بود.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، *Aeluropus littoralis*، AlSOS1، AlNHX، بیان ژن

Abstract

Salinity, predominantly NaCl, limits plant growth and impairs agricultural productivity. In higher plants, Na+ efflux and compartmentalization are achieved by Na+/H+ antiporters located in both the plasma and vacuolar membranes. Here we investigated the expression pattern of the genes AlNHX and AlSOS1 under 250 mM NaCl treatment after 6h, 1, 3, 8 and 17 days time intervals by Real Time-PCR technique. The transcript levels of AlNHX and AlSOS1 were up-regulated due to salt stress in all tissues. The AlSOS1 expression remarkably increased in leaves after 6 h and the AlNHX transcript abundance reached the maximum level after 24 h. In node and internode tissues, the transcript levels of AlNHX and AlSOS1 increased sharply 24 h after salt treatment and then gradually decreased within 3 and 8 days and finally after 17 days reached a steady-state in which the mRNA content was similar to that of the control plants. The transcript abundance of both genes in roots slightly increased upon salt treatment and after 3 days reached their maximum levels and their expression continued until day 8 days and then decreased to a basal expression similar to control for AlNHX gene but in case of AlSOS1, decreased to reach a new steady-state in which the mRNA content was about 2-fold that of the control plants .

Keywords: Salt stress, *Aeluropus littoralis*, AlSOS1, AlNHX, Gene expression

*نویسنده مسئول: ولی‌اله قاسمی عمران
E-mail:ghasemiomran@yahoo.com

مقدمه

شوری و به‌طور عمده کلریدسدیم، رشد کلی گیاهان را محدود نموده و سبب کاهش تولید در محصولات کشاورزی می‌گردد. در بسیاری از گیاهان به‌ویژه غلات، یون سدیم علت اصلی آسیب ویژه یونی محسوب می‌شود (Tester and Davenport. 2003). به‌دلیل این‌که سدیم فراوان‌ترین کاتیون در خاک‌های شور به‌شمار می‌رود و از لحاظ شیمیایی شباهت بسیار زیادی به یون پتاسیم دارد، سمیت سدیم در سیتوزول اغلب با کمبود پتاسیم همراه است (Pardo and Rubio. 2011). بسیاری از آنزیم‌های سیتوزولی با یون پتاسیم فعال می‌شوند و توسط یون سدیم مهار می‌گردند (Flowers and Yeo.1995). سدیم در غلظت‌های بالا، به‌دلیل اثرات مضر روی جذب موادمعدنی و آب، فعالیت‌های آنزیمی، فتوسنتز و سوخت و ساز برای گیاه سمی است (Niu *et al.* 1995). حساسیت به شوری آنزیم‌های سیتوزولی هم در گیاهان حساس به شوری و هم در گیاهان شورپسند مشابه است و بیانگر این نکته است که نگه‌داری نسبت پتاسیم به سدیم در سطح غلظتی بالا، به‌عنوان پیش‌نیاز کلیدی برای رشد گیاه در شرایط شوری بالا به‌شمار می‌رود (Glenn *et al.* 1999). گیاهان از راهکارهای متفاوتی با هدف جلوگیری از تجمع سدیم اضافی استفاده می‌نمایند که شامل بهبود جذب یون توسط ریشه، بارگیری در آوندچوبی جهت توزیع در فواصل دور، بازجذب یون توسط پروتئین‌های پرتمایل انتقال‌دهنده پتاسیم (HKT) در بافت‌های گیاهی ویژه و حجره‌بندی واکوئلی در محور گیاه و در برگ‌های مسن‌تر می‌باشد (Niu *et al.* 1995; Zhu. 2001; Pardo and Rubio. 2011). در درون سلول‌های گیاهی غلظت‌های سدیم سیتوزولی عموماً توسط حجره‌بندی یا دفع سدیم در سطح غیرسمی نگه داشته می‌شود (Blumwald, 2000). در محیط‌های شور، حجره‌بندی یون‌هایی که به‌طور بالقوه برای سوخت و ساز سلولی آسیب‌رسان هستند (به‌طور مثال کلرید و سدیم) راهکار مؤثری جهت سمیت‌زدایی یونی فراهم می‌آورد و در عین حال نسبت بالای پتاسیم به سدیم را در سیتوزول حفظ می‌کند. به‌علاوه، انباشتگی یون‌ها در داخل واکوئل فشار اسمزی در جهت بهبود جذب آب را فراهم می‌نماید (Pardo and Rubio. 2011). آنتی‌پورترهای واکوئلی سدیم/پروتون پروتئین‌های غشایی هستند که تبادل سدیم را در مقابل پروتون در تونوپلاست تحت گرادیانت الکتروشیمیایی پروتون تولیدشده توسط H-ATPase و H-PPiase کاتالیز می‌کنند (Barkla and Blumwald. 1991; Yamaguchi *et al.* 2003). بیش بیان ژن آنتی‌پورتر واکوئلی سدیم/پروتون گیاه آرابیدوپسیس (*AtNHX1*) منجر به افزایش مقاومت به شوری در گیاهان تراریخته کلم (Yamaguchi *et al*. 2003)، گوجه (Zhang and Blumwald. 2001) و گندم (Xue *et al.* 2004) شده است. از طرف دیگر، مسیر وابسته به کلسیم (SOS) که تنظیم‌کننده تعادل یونی سدیم و پتاسیم و انتقال دور برد سدیم می‌باشد، در گیاه آرابیدوپسیس گزارش شده است. در مسیر SOS پروتئین متصل‌شونده به کلسیم یا SOS3 سیگنال تنش شوری را دریافت و منتقل می‌نماید. SOS3 پروتئین SOS2 را فعال نموده و به‌سمت غشای پلاسمایی هدایت می‌نماید تا فسفریلاسیون ترانسپورتر سدیمی SOS1 توسط کمپلکس SOS2-SOS3 فراهم شود (Qiu *et al.* 2002; Zhu. 2003). پروتئین آنتی‌پورتر سدیم/پروتون SOS1، پروتئین غشای پلاسمایی ۱۲۷ کیلودالتونی با ۱۲ دامین فراغشایی فرضی در انتهای N و دنباله بلند سیتوپلاسمی آب‌دوست در انتهای C می‌باشد (Shi *et al.* 2000). یکی از کارکردهای آنتی‌پورتر سدیم/پروتون در غشای پلاسمایی دفع سدیم از سلول‌هاست (Blumwald. 2000). ژن‌های *SOS1* در گیاهان حساس به شوری نظیر برنج (*OsNHA1* and *OsSOS1*)، (Zhou *et al.* 2006; Martinez-Atienza *et al.* 2007) گندم نانوایی

(*TaSOS1*) (Xu *et al.* 2008) *Phragmitesaustralis* (*PhaNHA1*-u) (Takahashi *et al.* 2009) و همچنین گیاهان مقاوم به شوری نظیر *Thellungiella halophila* (*ThSOS1*) (Oh *et al.* 2007)، *Cymodocea nodosa* (*CnSOS1A* و *CnSOS1B*) (Garciadebla *et al.* 2007)، *Chenopodium quinoa* (*cqSOS1A* و *cqSOS1B*)، (Maughan *et al.* 2009) و *Phragmitesaustralis* (*PhaNHA1*-n) (Takahashi *et al.* 2009) شناسایی شده است. از آن‌جایی‌که گیاهان هالوفیت تک‌لپه قادر به رشد و تحمل شرایط شوری بالا هستند، می‌توانند به‌عنوان بهترین ابزار جهت درک اساس مولکولی آنتی‌پورترها به‌شمار آمده و نقش احتمالی آن‌ها را در مقاومت به شوری آشکار سازند. به‌علاوه از آنجایی که بسیاری از گیاهان مهم از لحاظ کشاورزی گیاهان تک‌لپه گلیکوفیت هستند، مطالعه ژن‌های ویژه از گیاهان خویشاوند نزدیک می‌تواند به‌عنوان روش مؤثری جهت بهبود مقاومت به شوری این گونه محصولات با استفاده از فناوری‌های ژنتیک نوین باشد. *Aeluropus littoras* Parl. یک گیاه هالوفیت تک‌لپه و چندساله می‌باشد که بومی ایران بوده و می‌تواند کلریدسدیم تا میزان ۶۰۰ میلی‌مولار را تحمل نماید. این گیاه از لحاظ فتوسنتزی گیاهی C4 محسوب شده و در خاک‌های شور ساحلی و بیابانی با بارندگی کمتر از ۲۰۰ میلی‌متر در سال رشد می‌یابد (Liu. 1994; Gulzar *et al.* 2003; Li and Wang, 2004). این گیاه دیپلویید بوده و دارای ژنوم نسبتاً کوچک در حدود ۳۴۲ مگا جفت باز می‌باشد. علاوه بر مقاومت به شوری، آلوروپوس به‌عنوان گیاهی مقاوم به خشکی و گرما نیز محسوب می‌شود (Zouari *et al.* 2007). با وجود این شرایط آلوروپوس می‌تواند به‌عنوان منبع ژنتیکی غنی جهت درک مکانیزم‌های مرتبط با مقاومت به شوری، خشکی و گرما در جهت بهبود مقاومت به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان زراعی مهم به لحاظ اقتصادی مورد استفاده قرار بگیرد. این تحقیق با هدف بررسی بیان ژن‌های آنتی‌پورتر غشایی و واکوئلی تحت تنش شوری ناشی از کلریدسدیم با استفاده از تکنیک Real Time-PCR صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

بذرهای گیاه آلوروپوس از رویشگاه‌های طبیعی آن در شهر اصفهان جمع‌آوری شده و درون ماسه شسته‌شده تحت شرایط دوری روشنایی ۱۶ ساعت، دمای روز/شب ۲۵/۲۸°C و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۸۰ درصد در گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان کشت شدند. گیاهچه‌ها هر سه روز یک بار با محلول غذایی هوگلند ۱/۲ آبیاری شدند. پس از یک ماه، گیاهچه‌ها به گلدان‌های ۲۰ لیتری حاوی ۱/۲ هوگلند که توسط یک ورقه یونولیت منفذدار پوشانده شده و با استفاده از پمپ آکواریومی هوادهی می‌شدند، انتقال یافتند.

جداسازی ژن *AlSOS1* تجزیه و تحلیل توالی

گیاهچه‌های دو ماهه با محلول ۱/۲ هوگلند حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به‌مدت ۳ روز مورد تیمار قرار گرفتند. سپس RNA کل با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini شرکت Qiagen استخراج شد. در مراحل استخراج RNA از هضم DNase روی ستون (On-Column DNase Digestion) استفاده شد. جهت ساخت رشته اول cDNA از کیت سنتز رشته اول cDNA شرکت Fermentas استفاده شد. PCR نسخه‌برداری معکوس با استفاده از آغازگرهای دجنره زیر انجام پذیرفت:

آغازگر رفت (5'-GCTGCRTTTCTYCGYGCWCATA-3')

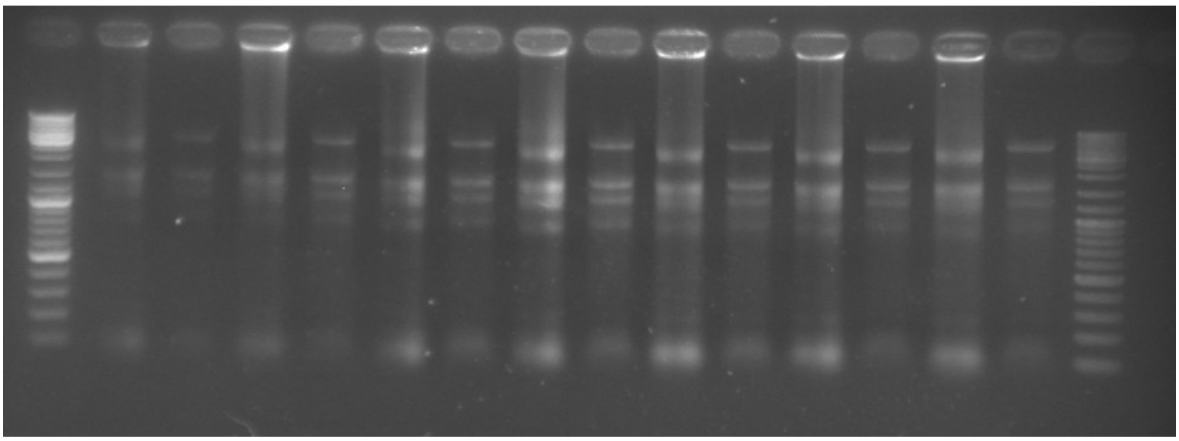
و آغازگر برگشت (5'- CCAGTTGGCYTTGARCCYTC-3')

که بر اساس نواحی حفاظت‌شده آنتی‌پورتر غشایی سدیم/پروتوناز گیاهان دیگر طراحی شده بود. سپس این دو آغازگر دجنره جهت تکثیر PCR با استفاده از شرایط چرخه دمایی زیر به واکنش PCR اضافه شدند: واسرشته‌سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در ۹۵°C و به دنبال آن ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی در ۹۵°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و اتصال در ۵۵°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و بسط در ۷۲°C به‌مدت ۴۵ ثانیه صورت پذیرفت. محصول تکثیرشده روی ژل آگارز ۱/۵٪ و با استفاده از اتیدیوم بروماید نمایان‌سازی‌شده سپس از روی ژل آگارز جدا و خالص‌سازی شده (با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification شرکت Roche مطابق دستورالعمل) و با استفاده از کیت InsTAclone™ PCR Cloning مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Fermentas) به درون وکتور pTZ57R/T شرکت Fermentas متصل شده و توالی‌یابی گردید. براساس این توالی ۴۵۰ جفت بازی، چهار آغازگر دیگر با استفاده از نرم‌افزار CLCMainWorkbench طراحی شد تا cDNA با طول کامل با استفاده از کیت Smarter RACE cDNA Amplification شرکت Clontech تکثیر شود: آغازگرهای رفت شامل GSP2(5'-GATGTTCGAGTTACATTCCCACAGGTGC-3')، NGSP2(5'-CGGCAAGTAACATACTCGGTATTGACGC-3') و آغازگرهای برگشت شامل: GSP1 (5'-CGGTGGTGGTTTCGTCTTCAACTTCTTC-3') و NGSP1 (5'-CTGTTTCAGGCAGCGCCCCAAC-3') بودند. ساخت رشته اول cDNA با استفاده از ۱µgRNAکل و آغازگرهای فراهم‌شده توسط کیت براساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. برای 3'RACE، ۵µl از 3' RACE-Ready cDNA به‌عنوان الگو به‌همراه آغازگر GSP2 و آغازگر UPM موجود کیت مورد استفاده قرار گرفت. قطعه PCR ۲ کیلو جفت‌بازی به‌دست‌آمده به درون pTZ57R/T شرکت Fermentas همسانه‌سازی شده و به‌طور کامل توالی‌یابی گردید. برای 5'RACE، ۵µl از 5' RACE-Ready cDNA به‌عنوان الگو به‌همراه آغازگر GSP1 و آغازگر UPM موجود کیت مورد استفاده قرار گرفت. محصول PCR خالص‌سازی و توالی‌یابی شد. توالی‌های به‌دست‌آمده از 5' RACE و 3' RACE در کنار هم قرار گرفت تا طول کامل ژن *AlSOS1* به‌دست آید (این توالی در کتابخانه داده‌های NCBI تحت شماره دستیابی HQ329792 ثبت گردید).

بررسی بیان

جهت ارزیابی الگوی تغییریافته ژن‌های *AlSOS1* و *AlNHX* پس از در معرض‌گرفتن گیاه در شرایط تنش شوری آزمایش Real Time PCR صورت پذیرفت. جهت اعمال تنش از روش پاساژدهی (اعمال تنش به‌صورت تدریجی) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا گیاهان تحت تنش ۱۰۰mM قرار گرفتند و سپس ۲۴ ساعت بعد mM ۱۵۰ دیگر به غلظت اولیه اضافه شد. نمونه‌برداری از گیاهان تنش‌یافته صفر و ۶ ساعت، و همچنین ۱، ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش صورت پذیرفت. RNA کل از نمونه‌های فریزشده برگ، ریشه و گره و میان‌گره گیاهان شاهد و گیاهان تحت تنش با استفاده از کیت Trizol (شرکت Invitrogen) مطابق با دستورالعمل شرکت صورت پذیرفت. یکپارچگی و صحت RNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ارزیابی شد. قبل از نسخه‌برداری معکوس جهت حذف باقیمانده احتمالی DNAی ژنومی نمونه‌های RNA با آنزیم دی‌اکسی‌ریبونوکلئاز ۱ تیمار شدند (شکل ۱).

جهت ساخت رشته اول cDNA از کیت سنتز رشته اول cDNA شرکت Fermentas با نسخه‌برداری معکوس ۲µg RNA در حجم نهایی



شکل ۱- الکتروفورز RNAی کل به‌ترتیب قبل و بعد از تیمار DNase روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در نمونه بافت برگی. ستون اول و آخر مربوط به نشانگر استاندارد مولکولی ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاز می‌باشد.

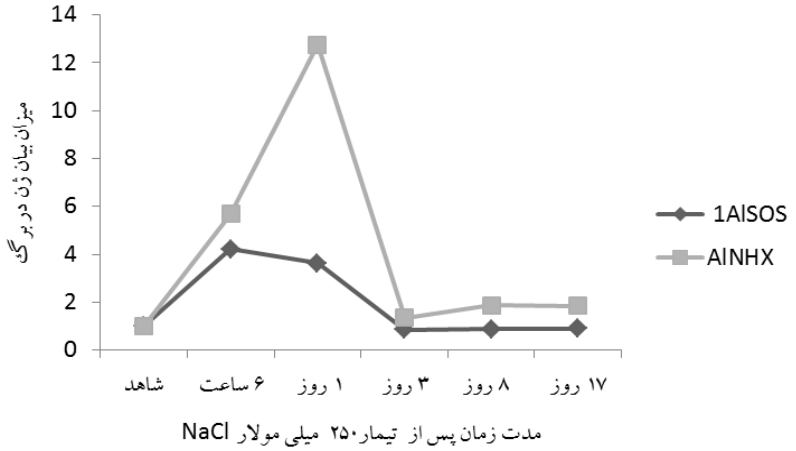
واکنش ۲۰µl مطابق دستورالعمل شرکت استفاده شد. ترکیب واکنش PCR شامل ۱µl از cDNA تا ۸ برابر رقیق‌شده، ۵µl از QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (شرکت Qiagen) ۱µM از هر آغازگر اختصاصی ژن در ۱۰µl حجم نهایی واکنش بود. برای هر جفت آغازگر واکنش PCR با شاهد بدون‌الگو نیز انجام شد. آغازگرهای اختصاصی *AlSOS1* که براساس توالی جداسازی‌شده طراحی شدند به قرار زیر بود: آغازگر رفت (5'-CAGCTTACTGGGGAATGCTC-3') و آغازگر برگشت (5'-ACTTGGGAACTGGACACTGG-3') که باندی به اندازه ۱۴۸ جفت باز را تکثیر می‌کند. آغازگرهای اختصاصی *AlNHX* که براساس توالی موجود در NCBI به شماره دستیابی AY825361 طراحی شدند به‌قرار زیر بود: آغازگر رفت (5'-GTTGTGAATGATGCCACGTC-3') و آغازگر برگشت (5'-ATCCAGCAAACACTCCAAGG-3') که باندی به اندازه ۱۴۷ جفت باز را تکثیر می‌کند. جفت آغازگر رفت (5'-TTGCTGGCCGAGACCTTAC-3') و برگشت (5'-GGCGAGCTTTTCCTTGATG-3') جهت تکثیر ژن اکتین آلوروپوس (که باندی به اندازه ۱۱۳ جفت باز را تکثیر می‌کند) به‌عنوان کنترل داخلی به‌کار رفت. واکنش‌های PCR مطابق دستورالعمل کیت به این شرح انجام شد: مرحله واسرشته‌سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در ۹۵°C و به دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشته‌سازی در ۹۵°C به‌مدت ۱۰ ثانیه و اتصال و بسط تلفیقی در ۶۰°C به‌مدت ۳۰ ثانیه بود. جهت اطمینان از صحت تکثیر محصولات اختصاصی چرخه‌های منحنی ذوب با پارامترهای زیر در ادامه صورت پذیرفت: ۹۵°C به‌مدت ۱ دقیقه، ۸۰ چرخه ۵۵°C به‌مدت ۱۰ ثانیه با ۰/۵°C افزایش دما در هر چرخه. منحنی ذوب با استفاده از فلوروسنت سایبرگرین هیچ ساختار سنجاق‌سری یا شکل‌گیری لوپ را در واکنش PCR شناسایی نکرد. محصولات تکثیر Real time PCR بر روی ژل آگارز بارگذاری شد تا وجود باند صحیح و منفرد تایید گردد. سه تکرار برای هر آزمایش در نظر گرفته شد. سیگنال‌های فلورسنت در هر مرحله پلیمریزاسیون در دستگاه C1000™ Thermal Cycler شرکت BioRAD جمع‌آوری شد. مقادیر آستانه‌ای (C_T) توسط نرم‌افزار داخلی دستگاه مطابق فرمول $2^{-(\Delta CT\ Target-\Delta CT\ actin)}$ با مقایسه مقادیر C_T ژن اکتین و ژن‌های *AlSOS1* و *AlNHX* حاصل از cDNA مشابه به‌عنوان الگو محاسبه شد.

نتایج و بحث

فرایندهای انتقالی که خروج یون از سلول را تنظیم می‌نمایند از یک سو و حجره‌بندی واکوئلی از سوی دیگر، درکاهش تجمع سدیم در سیتوزول گیاهی نقش حیاتی دارند. در گیاهان عالی دفع و حجره‌بندی سدیم به‌واسطه آنتی‌پورترهای موجود در غشاهای پلاسمایی و واکوئلی انجام می‌شود. بیش بیان آنتی‌پورتر سدیم/پروتون واکوئلی AtNHX1 و آنتی‌پورتر سدیم/پروتون غشای پلاسمایی At SOS1 گیاه آرابیدوپسیس مقاومت به شوری را در گیاهان تراریخته به دنبال داشته است (Pardo *et al.* 2011). این موضوع منعکس‌کننده نقش کلیدی آنتی‌پورترهای سدیم/پروتون در مقاومت به شوری می باشد. به‌همین دلیل این تحقیق با هدف بررسی بیان این دو ژن مهم در گیاه شورپسند آلوروپوس صورت گرفته است تا عکس‌العمل این دو ژن در پاسخ به شوری بررسی و مطالعه گردد.

طول کامل cDNAی SOS1 گیاه آلوروپوس با استفاده از RACE PCR به‌دست آمد (شماره دستیابی HQ329792). توالی نوکلئوتیدی با طول ۳۹۸۱ جفت باز متشکل از ۲۳۱ جفت باز ناحیه ترجمه‌نشده '۵ (5' UTR) و ۳۱۰ جفت باز ناحیه ترجمه‌نشده '۳(3' UTR) می‌باشد. چارچوب قرائت آزاد (ORF) فرضی ژن *AlSOS1* پروتئینی با ۱۱۴۶ آمینواسید کد می‌نماید. پروتئین پیش‌بینی‌شده به‌ترتیب دارای ۶۱، ۷۷ و ۸۲ درصد مشابهت در توالی آمینواسیدی با گیاهان آرابیدوپسیس، برنج و *Phragmites australis* بوده و ویژگی‌های عمومی مشترکی از جمله ۱۲ ناحیه فراغشایی، دم طویل سیتوپلاسمی، دامین تبادل سدیم/ پروتون و دامین فرضی اتصال نوکلیوتید حلقوی که در مرکز دم طویل انتهای C قرار دارد، می‌باشد (مطابق نرم‌افزار TMHMM) (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/). این داده‌ها نشان می‌دهد که AlSOS1 یک آنتی‌پورتر سدیم /پروتون در غشای پلاسمایی می‌باشد که می‌تواند نقش مهمی در مقاومت به شوری گیاه آلوروپوس داشته باشد.

در رابطه با ژن *AlNHX* میزان نسبی mRNA در برگ‌های گیاه مقاوم به شوری آلوروپوس با افزایش زمان تحت تنش شوری ۲۵۰ میلی‌مولار به‌شدت افزایش پیدا کرد. به این ترتیب که ۶ ساعت و ۲۴ ساعت پس از تنش به بالاترین میزان خود رسید (به‌ترتیب ۶ و ۱۲ برابر). در ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش میزان بیان به حالت عادی خود یعنی به میزان قبل از تنش بازگشت.

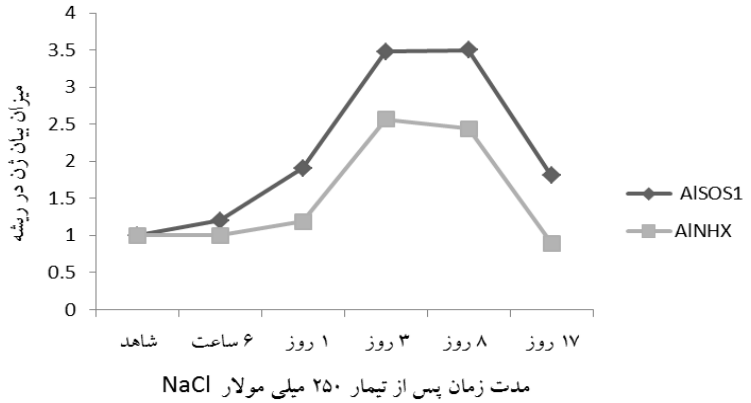


شکل ۲- فراوانی نسبی mRNAی ژن‌های *AlNHX* و *AlSOS1* در برگ‌های گیاه آلوروپوس در پاسخ به تنش شوری

گیاهچه‌های یک‌ماهه به گلدان‌های ویژه حاوی محلول ۱/۲ هوگلند که به‌خوبی هوادهی می‌شدند منتقل شده و پس از ۳ هفته تحت تنش ۲۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم قرار گرفتند. بیان ژن‌های *AlNHX* و *AlSOS1* در گیاهان شاهد بدون اعمال تنش و گیاهان تنش‌یافته ۶ ساعت، ۱، ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش با استفاده از روش real-time PCR مطالعه گردید. میزان بیان در ابتدای تیمار شوری (شاهد بدون اعمال تنش) روی عدد ۱ تنظیم شد. سطوح بیان سایر زمان‌های نمونه‌برداری به‌عنوان درصدی از میزان بیان در ابتدای تیمار شوری بیان شده است.

در مورد ژن *AlSOS1* نیز افزایش بیان پس از اعمال تنش مشاهده شد. به این صورت که پس از ۶ و ۲۴ ساعت به بالاترین میزان خود رسید (حدود ۴ برابر). مشابه با ژن *AlNHX* بیان این ژن نیز در ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش به حالت معمول برگشت (شکل ۲).

در ریشه گیاهان آلوروپوس بیان ژن *AlNHX* تحت تنش شوری ۲۵۰ میلی‌مولار تا یک روز پس از تنش تغییری پیدا نکرد. پس از گذشت ۳ روز از اعمال تنش بیان این ژن تا ۲/۵ برابر افزایش یافت و این افزایش بیان تا ۸ روز پس از تنش بدون‌تغییر ادامه یافت و در ۱۷ روز پس از تنش به حالت عادی خود بازگشت. در مورد *AlSOS1* بیان ژن در روز اول پس از تنش حدوداً دو برابر شد و در روز سوم پس از تنش به ۳/۵ برابر حالت عادی رسید و تا ۸ روز پس از تنش این بیان بالا ادامه داشت و در روز ۱۷ پس از تنش مشابه حالت یک روز پس از تنش در حدود دو برابر بیان شاهد ثابت باقی ماند (شکل۳).

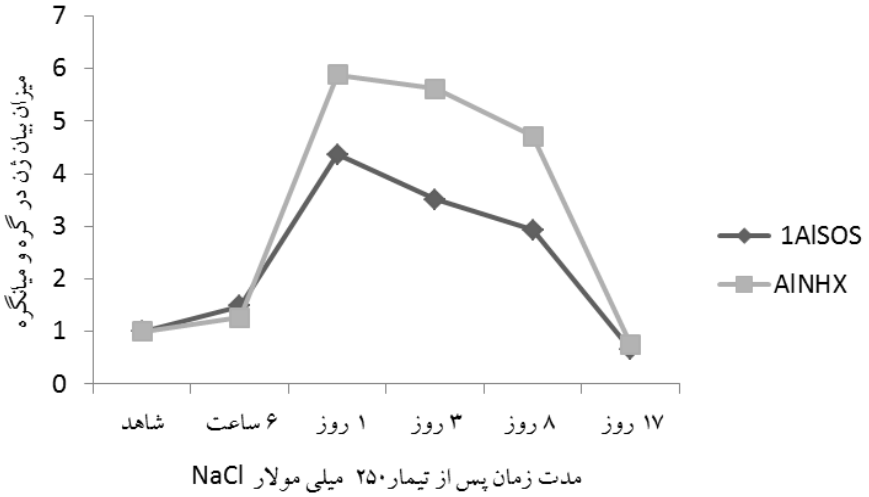


شکل ۳- فراوانی نسبی mRNAی ژن‌های *AlNHX* و *AlSOS1* در ریشه‌های گیاه آلوروپوس در پاسخ به تنش شوری. شرایط آزمایشی مشابه شرایط ذکر شده در بافت برگی بوده است.

در بافت گره و میانگره در ژن *AlNHX* تا ۶ ساعت پس از تنش تغییر چندانی در بیان ژن مشاهده نشد اما ۲۴ ساعت پس از تنش بیان به حدود ۵ تا ۶ برابر رسید و این بیان تا ۸ روز پس از تنش به حالت ثابت باقی ماند اما در روز ۱۷ پس از تنش به حالت معمول خود یعنی مشابه شاهد بازگشت. در مورد ژن *AlSOS1* بیان ژن ۶ ساعت پس از تنش تغییر چندانی پیدا نکرد و به حدود ۱/۵ برابر رسید. در روز اول، سوم و هشتم پس از تنش بیان این ژن با روندی رو به کاهش به ترتیب ۴/۵، ۳/۵ و ۳ برابر شاهد بود. در روز ۱۷ بیان به حالت عادی مشابه شاهد بازگشت. این افزایش بیان در ژن‌های *AlNHX* و *AlSOS1* در نمونه‌های مختلف گیاه آلوروپوس در تکرارهای بیولوژیکی آزمایش تکرارپذیر بوده است (شکل۴).

افزایش بیان‌ژن *AlNHX* در ریشه‌ها و شاخ و

برگ گیاه آلوروپوس در پاسخ به تیمار کلریدسدیم توسط Zhang *et al.* (2008) نیز گزارش شده است. نتایج آن‌ها نشان داد که سطوح نسخه‌برداری این ژن با اعمال تنش شوری ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم افزایش یافت و پس از ۶ ساعت از اعمال تنش شوری در ریشه بیان به‌شدت افزایش پیدا کرد در حالی‌که در شاخ و برگ‌ها افزایش کندتری داشت. در گیاهان آرابیدوپسیس، برنج و *Atriplex gmelini* نیز افزایش بیان‌ژن *NHX1* پس از اعمال تنش شوری گزارش شده است (Gaxiola *et al.* 1999; Fukuda *et al.* 1999; Hamada *et al.* 2001). به‌عنوان مثال در گیاه *Atriplex gmelini* بیان ژن *AgNHX1* پس از اعمال تیمار ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم در برگ‌های گیاه به‌ترتیب ۳ تا ۸ برابر افزایش یافت. در ریشه‌ها نیز بیان mRNA در ۴۰۰ میلی‌مولار شدت بیشتری داشت. در تحقیق حاضر افزایش بیان ژن *NHX1* در همه بافت‌های مورد مطالعه مشاهده می‌شود و نشان‌دهنده این نکته است که این ژن می‌تواند در مقاومت به شوری گیاه آلوروپوس نقش داشته باشد.



شکل ۴- فراوانی نسبی mRNAی ژن‌های *AlNHX* و *AlSOS1* در گره و میانگره‌های گیاه آلوروپوس در پاسخ به تنش شوری. شرایط آزمایشی مشابه شرایط ذکرشده در بافت برگی بوده است.

افزایش بیان‌ژن *NHA1* و یا *SOS1* نیز در گیاهان مختلف گزارش شده است. در آنالیز ژل بلات RNA در گیاه آرابیدوپسیس، mRNA ژن *SOS1* بدون اعمال تنش شوری شناسایی شد و با اعمال تنش بیان آن هم در ریشه و هم در ساقه افزایش یافت. با این حال بیان این ژن با تیمار سرما و ABA تغییری نشان نداد (Shi *et al.* 2000). در گیاه هالوفیت *Puccinellia tenuiflora* نسخه‌های ژن آنتی‌پورتر سدیم/پروتون غشایی *PtNHA1* در پاسخ به تنش کلریدسدیم ۱۵۰ میلی‌مولار افزایش یافت (Wang *et al.* 2009). در گیاهان گندمی که در معرض تنش ۲۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم قرار گرفته بودند، سطح بیان‌ژن *TaSOS1* در ریشه پس از ۳ ساعت از تنش به بیشترین مقدار خود یعنی ۵ برابر زمان بدون تنش رسید و ۹ ساعت بعد به سطح پایه بازگشت. پس از ۲۴ ساعت دوباره به‌صورت ثابتی بالا رفت تا اینکه ۴۸ ساعت پس از تنش به حدود دو برابر بدون تنش رسید. برعکس در بافت برگی سطح بیان به جز افزایش موقتی که در ۹ ساعت پس از تنش نشان داده بود تقریباً ثابت باقی ماند. این پاسخ در مقایسه با ریشه تأخیر داشت (Xu *et al.* 2008). در برنج تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولار تجمع

mRNAی *SOS1* را در ریشه القاء نمود اما تأثیری در ساقه و برگ نداشت (Martı´nez-Atienza *et al.* 2007). بیان‌ژن *PhaNHA1* در ریشه گیاهان نی حساس به شوری، پس از ۱۲ ساعت از تیمار کلریدسدیم به حداکثر مقدار خود رسید درحالی‌که در ریشه گیاهان نی مقاوم به شوری بعد از ۴۸ ساعت افزایش یافت و تا ۱۰ روز پس از تنش ثابت باقی ماند. در بخش‌های هوایی گیاه سطح نسخه‌برداری ژن *PhaNHA1* در گیاهان مقاوم به شوری نی بالاتر از گیاهان حساس به شوری بود، گرچه بیان‌ژن *PhaNHA1* پس از ۱۰ روز تنش در هر دو تقریباً یکسان بود (Takahashi *et al.* 2008). آنالیز وسترن بلات در گیاه *Populus euphratica* نشان داد که بیان *PeSOS1* تحت تنش شوری به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا کرد و تا میزان ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از شاهد در برگ‌ها پس از تیمار با ۲۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش بیان داشت (Wu *et al.* 2007). در تحقیق حاضر سطوح نسخه‌برداری ژن‌های *AlNHX* و *AlSOS1* در پاسخ به تنش کلریدسدیم در همه بافت‌ها افزایش یافت. میزان بیان هر دو ژن در بافت‌های ریشه به آهستگی بعد از اعمال تنش افزایش یافت و پاسخ به تنش در بافت ریشه روند کندتری نسبت به بافت‌های برگ، گره و میانگره داشت. به این معنی که در بافت ریشه ۳ روز پس از اعمال تنش میزان بیان به حداکثر مقدار خود رسید درحالی‌که در سایر بافت‌های مورد مطالعه ۶ تا ۲۴ ساعت پس از تنش شوری میزان حداکثر بیان دیده شد. همچنین پس از اعمال تنش کلریدسدیم فراوانی نسخه‌های ژن *AlSOS1* در بافت‌های برگ، گره و میانگره بیشتر از ژن *AlNHX* بود. درحالی‌که در بافت ریشه عکس این حالت مشاهده شد. به عبارتی دیگر پس از اعمال تنش بیان‌ژن *AlSOS1* شدت بیشتری داشت. بیان بالاتر ژن *AlSOS1* ممکن است به این دلیل باشد که این ژن مطابق تحقیقی که توسط Shi *et al.* (2000) صورت گرفته است به‌طور ترجیحی در سلول‌های اپیدرمی نوک‌ریشه و سلول‌های پارانشیمی مرز چوب/سیمپلاست ساقه و برگ‌ها بیان می‌شود و وظیفه دفع سدیم در این مناطق را به‌عهده دارد. در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که با توجه به روند بیان مشاهده شده در گیاه هالوفیت آلوروپوس هر دو ژن *AlNHX* و *AlSOS1* می‌توانند در تحمل به تنش شوری در این گیاه به طرق مختلف نقش مؤثری داشته باشند. بررسی‌های بیان با استفاده از روش مذکور حاکی از افزایش بیان این آنتی‌پورتر در پاسخ به تنش شوری بود که نشان‌دهنده اهمیت این آنتی‌پورتر در مقاومت این گیاه به تنش شوری می‌باشد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد و پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان دانشگاه کشاورزی و منابع‌طبیعی به‌دلیل فراهم‌سازی اعتبارات و امکانات آزمایشگاهی برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Barkla BJ, Blumwald E (1991) Identification of a 170-kDa protein associated with the vacuolar Na/Hantiport of *Beta vulgaris*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 11177-11181.

Blumwald E (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants.Curr.Opin. Cell Biol. 12: 431-434.

Flowers TJ, Yeo AR (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants, where next? Aust. J. Plant Physiol. 22: 875–884.

Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y

(1999) Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+exchanger gene in *Oryza sativa*. Biochim. Biophys. Acta. 1446: 149–155.

Garciadebla B, RosariH,Benito B (2007) Cloning of two SOS1 transporters from the seagrass *Cymodocea nodosa*. SOS1 transporters from *Cymodocea* and *Arabidopsis* mediate potassium uptake in bacteria. Plant Mol. Biol. 63: 479–490

Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast.Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1480-1485.

Glenn E, Brown JJ, Blumwald E (1999) Salt-tolerant mechanism and crop potential of halophytes. Crit. Rev. Plant Sci. 18: 227-255.

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.

Hamada A, Shono M, Xia T, Ohta M, Hayashi Y, Tanaka A, Hayakawa T (2001) Isolation and characterization of a Na^+/H^+antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini.* Plant Mol Biol. 46: 35-42.

Li MY, Liu YJ (1994) Halophytes of Yellow River Delta in north Shandong Province of China. J. Qufu. Normal Univ. 125-133.

Martinez-Atienza J, Jiang XY, Garciadeblas B, Mendoza I, Zhu J K, Pardo JM, Quintero FJ (2007) Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. Plant Physiol 143:1001–1012.

Maughan PJ, Turner TB, Coleman CE,Elzinga DB, Jellen EN, Morales JA, Udall JA, Fairbanks D J Bonifacio A (2009) Characterization of *Salt Overly Sensitive 1* (*SOS1*)gene homoeologs in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Genome .52: 647–657.

Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo J M (1995) Ion homeostasis in NaCl stressenvironments. Plant Physiol. 109:735–742.

Oh DH, Gong Q, Ulanov A, Zhang Q, Li Y, Ma W, Yun DJ, Bressan RA Bohnert HJ (2007) Sodium Stress in the Halophyte *Thellungiella halophila* and Transcriptional Changes in a *thsos1*-RNA Interference Line. J. Integr. Plant. Biol. 49: 1484–1496.

Pardo JM, Rubio F (2011) Na+ and K+ Transporters in Plant Signaling. Signaling and Communication in Plants. 7: 65-98.

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.

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.

Takahashia R, Liub S, Takano T (2009) Isolation and characterization of plasma membrane Na^+/H^+ antiporter genes from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants, J Plant Physiol. 166: 301-309.

Tester M, Davenport R (2003). Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Ann. Bot. 91:503–527.

Wang R Z (2004) Plant functional types and their ecological responses to salinization in saline grasslands, Northeastern China. Photosynthetica 42: 511–519.

Wang X, Yang R, Wang B, Liu G, Yang C,Cheng Y (2010) Functional characterization of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter from alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) Mol. Biol. Rep. 38:4813–4822.

Wu Y, Ding N,Zhao X,Zhao M, Chang

Z, Liu J, Zhang L (2007) Molecular characterization of PeSOS1: the putative Na^+/H^+ antiporter of *Populus euphratica*. Plant Mol. Biol. 65:1–11.

Xu H, Jiang X, Zhan K, Cheng X, Chen X, Xue ZY, Zhi DY, Xue GP, Zhao YX, Xia GM (2004) Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na^+/H^+antiporter gene with improved grain yield in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+. Plant Sci. 167: 849-859.

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.

Yamaguchi T, Apse MP, Shi H, Blumwald E (2003) Topological analysis of a plant vacuolar Na^+/H^+ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:12510-12515.

Zhang HX, Blumwald E (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nat. Biotechnol. 19:765-768.

Zhang GH, Su Q, An LJ, Wu S (2008) Characterization and expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus littoralis*. Plant Physiol. Biochem. 46: 117-126.

Zhou GA, Jiang Y, Yang Q,Wang JF,Huang JI, Zhang HS (2006) Isolation and characterization of a new Na^+/H^+ antiporter gene *OsNHA1* from rice (*Oryza sativa* L.). DNA Seq. 17: 24–30.

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.

Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. Trends Plant Sci. 6: 66–71.

Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. Curr. Opin. Plant Biol. 6: 441-445.