تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد سیزدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۹
۱۲۵۹-۱۲۷۰
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.2443.1646

مقاله پژوهشی

تجزیه‌وتحلیل بیان برخی از ژن‌های درگیر در شبکه‌های پیام‌رسانی در گیاه آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl.) تحت تنش شوری

الهام یونسی ملردی[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲]، علی پاکدین پاریزی*[۳]

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دکترای ژنتیک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳. استادیار پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دکترای بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۱۸

چکیده

در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با شبکه پیام‌رسان و تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش شوری شامل G-types-LecRLK، CIPK20، HSFA1a و C3H-ZF در برگ‌های گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. قلمه‌های گیاهی در شرایط هیدروپونیک کشت و پس از یک ماه تحت تیمارهای کنترل (محلول هوگلند بدون افزودن کلریدسدیم)، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک کلریدسدیم قرار گرفتند. پس از ۷۲ ساعت تیمار، نمونه‌های برگی از گلدان‌ها جمع-آوری شد و محتوای پراکسیدهیدروژن و فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز اندازه‌گیری و تغییرات بیان ژن‌های ذکرشده با استفاده از روش qRT-PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). بیان ژن LecRLK تغییر چندانی را نسبت به شاهد نشان نداد و بیان ژن CIPK20 به ترتیب ۷ و ۱۶ برابر نسبت به شاهد در هر دو تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم کاهش یافت. بیان ژن HSFA1a با مقدار نمک رابطه مثبت داشت ($P < ۰/۰۵$) و با افزایش غلظت نمک افزایش چشمگیری نشان داد. بیان ژن C3H-ZF به‌طور معنی‌داری در هر دو تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد کاهش یافت ($P< ۰/۰۵$) نتایج نشان داد که الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه تحت شرایط تنش شوری می‌تواند به نقش هر ژن، غلظت نمک و مدت‌زمان تنش مربوط باشد.

***واژه‌های کلیدی:* آلوروپوس لیتورالیس، تنش‌های غیرزیستی، بیان ژن، هالوفیت، تحمل شوری.**

مقدمه

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های زیستی است که به‌شدت اقتصاد کشاورزی را در جهان تحت تأثیر قرار داده است. درک مکانیسم تحمل تنش شوری و بهبود توانایی تحمل در محصولات کشاورزی ازجمله موضوعات مهم در حوزه مطالعات کشاورزی محسوب می‌شود. گیاهان از طریق تغییرات در سطح فیزیولوژیک و مولکولی به اثرات مخرب تنش‌های مختلف از قبیل شوری پاسخ می‌دهند. شرایط محیطی نامطلوب، از طریق تولید بیش‌ازحد و انباشت گونه‌های اکسیژن فعال (ROS[1]) منجر به تحریک واکنش آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌شود که به‌طورکلی تنش اکسیداتیو نامیده می‌شود. گونه‌های اکسیژن فعال به بسیاری از اجزای سلولی آسیب رسانده و سبب کاهش محصول می‌شود. گیاهان با به‌کارگیری سیستم‌های کارآمدی با تنش‌های اکسیداتیو

[1] *Reactive oxygen species*

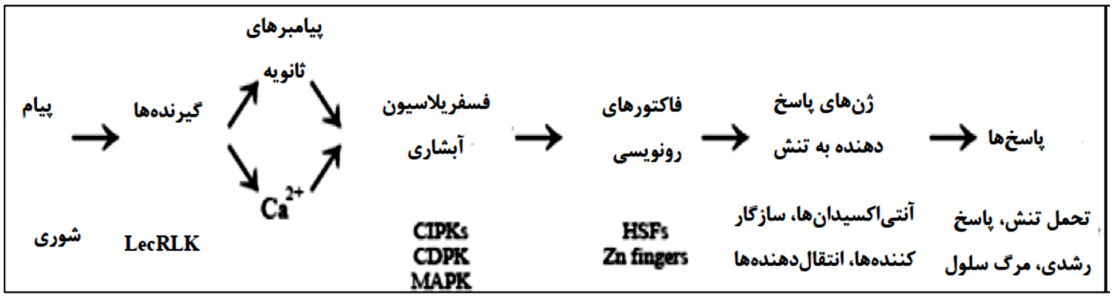
* نگارنده پاسخگو: علی پاکدین پاریزی. پست الکترونیک: a.pakdin@sanru.ac.ir

مقابله می‌کنند (Jithesh et al., 2006). آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی به‌عنوان بخشی از این سیستم‌ها عناصر کلیدی مکانیسم‌های دفاعی و مقاومت به تنش هستند. فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تحت تنش شوری، تغییر چشمگیری می‌کند و میزان تحمل به شوری تحت تأثیر ظرفیت این سیستم است؛ بنابراین تحمل تنش‌های محیطی می‌تواند با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در محیط درون‌تنی گیاه بهبود یابد (Khaliq et al., 2015).

در سطح مولکولی، ابتدا سلول‌های گیاهی تنش شوری را به‌وسیله گیرنده‌هایی در سطح غشای سلول دریافت کرده و سپس شبکه‌های پیام‌رسان پیچیده و متناوب شامل مولکول-های پیام‌رسان، پروتئین‌کینازها و فاکتورهای رونویسی تشکیل شده و درنهایت بیان بسیاری از ژن‌های پایین‌دستی پاسخ‌دهنده به تنش تغییر می‌کند (Golldack et al., 2014). چندین خانواده از گیرنده‌ها در سطح غشای سلول-های گیاهی وجود دارند که در این میان خانواده RLKها یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیرنده‌های سطح سلولی محسوب می‌شوند. این خانواده بر اساس قلمروهای خارج سلولی‌شان شامل دامین‌های S، تکرارهای غنی از لوسین و دامین‌های متصل‌شونده به لکتین، به چند زیرخانواده تقسیم می‌شود. در میان آن‌ها، نقش زیرخانواده‌ی LecRLKها در پاسخ سلولی به تنش شوری تائید و گزارش شده است (Deng et al., 2009). بااین‌حال، نقش زیرگروه G-type-LecRLK در سازگاری با تنش‌های محیطی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. پس از دریافت پیام تنش، تغییر غلظت مولکول‌های کوچک درون فضای سلول مانند کلسیم و اسید آبسیزیک موجب ایجاد مسیرهای پیام‌رسان آبشاری مختلف می‌شود (Golldack et al., 2014; Chen et al., 2013). تغییر در غلظت کلسیم با چندین حسگر کلسیم مانند کالمودولین (CaM)، پروتئین مرتبط با CaM، CDPKها و CBLها تشخیص داده می‌شود. حسگرهای کلسیم نوع CBL گیاهی به‌طور خاص با CIPKها تعامل دارند و مجموعه CBL-CIPK را تشکیل می‌دهند. SOS اولین و شناخته‌شده‌ترین عضو مجموعه CBL-CIPK است. این مجموعه پیچیده از طریق فسفریله کردن اجزای پایین‌دستی مانند فاکتورهای رونویسی امکان تداوم مسیر انتقال پیام را فراهم می‌کند (Chen et al., 2013). پس‌ازآن، خانواده‌های مختلف فاکتورهای رونویسی با توجه به نقش واسطه‌ای‌شان و امکان اتصال آن‌ها به سطح مولکول‌های DNA پیام‌های درک تنش را به پیام تغییر بیان ژن‌های واکنش‌دهنده به تنش تبدیل می‌کنند. یکی از خانواده‌های فاکتورهای رونویسی که به ایجاد پاسخ مناسب در برابر تنش‌های زیست‌محیطی کمک می‌کند، HSFها هستند (Pandey et al., 2015). پروتئین‌های HSF به سه دسته (A، B و C) طبقه‌بندی می‌شوند و پرموتورهای ژن‌های هدف این خانواده از فاکتورهای رونویسی توالی HSE را شامل می‌شوند (Pandey et al., 2015; Guo et al., 2016). گروه ۱ در کلاس A از HSFها (HSFA1) عامل اصلی فعال‌کننده رونویسی در پاسخ به شوک حرارتی هستند و همچنین گزارش شده است که این زیرگروه می‌تواند واکنش رونویسی را در طول تنش‌های غیرزیستی دیگر از قبیل تنش‌های اکسیداتیو، شوری و خشکی نیز میانجی‌گری کند (Liu et al., 2013). گروه دیگر از فاکتورهای رونویسی درگیر در پاسخ به تنش‌های زیستی خانواده ZFها هستند. خانواده ZF بر اساس تعداد و ترتیب قرارگیری آمینواسیدهای سیستئین و هیستون در ساختار ثانویه‌شان به ۹ گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند (Ganie et al., 2020). گروه C3H از خانواده ZF نقش مهمی در افزایش تحمل به تنش‌های زیست‌محیطی بازی می‌کنند (Jiang et al., 2017). گزارش شده است که افزایش بیان ژن BoC3H (از خانواده C3H-ZF) از طریق تنظیم سطح پراکسیدهیدروژن، هدایت الکتریکی نسبی، پرولین آزاد، مالون دی‌آلدئید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحمل به نمک را در گیاه *Brassica oleracea* افزایش می‌دهد (Jiang et al., 2017). یک مسیر عمومی انتقال پیام که منجر به پاسخ تنش در گیاهان می‌شود، در شکل ۱ نشان داده شده است.

گیاه آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl.)، چمنی چندساله، هالوفیت و متعلق به خانواده گرامینه است که در خاک‌های شور رشد می‌کند. این گیاه می‌تواند یون سدیم را از طریق غده‌های نمکی بر روی سطح برگ تخلیه کند، بنابراین قادر است در خاک‌های شور بدون علائم سمیت زندگی کند. علاوه بر این، آلوروپوس لیتورالیس گیاهی دیپلوئید (2n = 2X = 14) با ژنوم نسبتاً کوچک (۳۴۹ مگاباز) است که این ویژگی مولکولی آن را به یک منبع ژنتیکی ارزشمند برای درک مبنای مولکولی پاسخ به تنش شوری و بهبود تحمل در گیاهان هم‌خانواده این گیاه مانند گندم و برنج تبدیل کرده است (Zouari et al., 2007). در پژوهش حاضر با هدف بررسی تغییرات شبکه‌های پیام-رسانی و تنظیمی گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس تحت

تنش شوری، تغییرات بیان ژن‌های دخیل در این مسیر شامل G-type-LecRLK، CIPK20، HSFA1a و C3H-typeZF ارزیابی شد. به‌علاوه، محتوای پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسیددیسموتاز مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱. مسیر عمومی برای انتقال سیگنال‌های تنش زیستی در گیاهان (Xiong et al., 2002). مثال‌هایی از اجزای درگیر در هر مرحله نشان داده شده است. اختصارات مربوط به اجزاء شامل موارد ذیل می‌شود: lecRLK: lectin- Receptor Like Kinase، CIPK: CBL- interacting protein kinases، CDPK: Calcium Dependent Protein Kinase، MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase، HSFs: Heat Shock Factor، Zn fingers: *Zinc finger transcription factors*

Fig. 1. A generic pathway for the transduction of abiotic stress signals in plants (adopted from Xiong et al, 2002). Examples of involved components in each step are indicated. The abbreviations of the components include the following: lecRLK: lectin- Receptor like Kinase, CIPK: CBL-interacting protein kinases, CDPK: Calcium Dependent Protein Kinase, MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase, HSFs: Heat Shock Factors, Zn fingers: *Zinc finger transcription factors*

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مواد گیاهی

بذرهای گیاه آلوروپوس لیتورالیس از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرها با استفاده از هیپوکلریت سدیم (۰/۸۵%) به مدت یک دقیقه استریل و سپس در گلدان‌های حاوی شن و ماسه در دمای ۲۰/۳۰ درجه سانتی‌گراد (روز/شب) و دوره نوری ۸/۱۶ ساعت کشت شدند. بعد از ۶۰ روز از گیاهان قلمه تهیه شد و در گلدان‌های پلاستیکی ۳/۵ لیتری حاوی محلول ۱/۲ هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) به‌صورت هیدروپونیک کشت‌شده و تحت شرایط گلخانه با رطوبت نسبی ۶۵-۴۵ درصد قرار داده شدند. هوادهی با استفاده از پمپ‌های هوا انجام و محلول هوگلند هر دو هفته با محلول جدید جایگزین شد.

تیماردهی و نمونه‌برداری

مرحله اعمال تنش شوری با در نظر گرفتن سه سطح تیمار شامل کنترل (محلول هوگلند بدون افزودن نمک کلرید سدیم) و دو تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و سه تکرار برای هر یک اجرا شد. به‌منظور جلوگیری از شوک ناگهانی، غلظت نمک به‌تدریج و طی سه مرحله (شش روز) با محلول هوگلند دارای ۷۵ میلی‌مولار کلریدسدیم (برای تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار) و ۱۲۰ میلی‌مولار کلریدسدیم (برای تیمار ۴۰۰ میلی‌مولار) به غلظت نهایی رسید. سپس نمونه‌های برگی پس از ۷۲ ساعت اعمال تنش با غلظت‌های نهایی (تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار) برداشت و بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند.

اندازه‌گیری پراکسیدهیدروژن

برای تعیین سطح پراکسیدهیدروژن ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه برگی در ۱۸۰۰ میکرو لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱٪ (w/v) همگن شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و به ۵۰۰ میکرولیتر محلول رویی، ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۱۰ میلی‌مولار) و ۱۰۰۰ میکرولیتر یدید پتاسیم (۱میلی‌مولار) اضافه گردید. میزان جذب در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Shimadzu,UV-1800UV) اندازه‌گیری شد. محتوای پراکسیدهیدروژن نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد تهیه‌شده با استفاده از غلظت شناخته‌شده پراکسیدهیدروژن محاسبه و نتایج به‌صورت نانومول برگرم وزن تر بیان شد (Loreto and Velikova, 2001).

تهیه عصاره از نمونه‌های برگی

برای استخراج عصاره، نمونه‌های برگی در حضور ازت مایع به‌طور کامل پودر شدند و سپس ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه‌های پودر شده با ۱۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷) همگن شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۸ دقیقه با ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و مایع رویی به‌عنوان عصاره گیاهی در مراحل بعدی برای بررسی فعالیت آنزیمی استفاده شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس روش Dazy و همکاران (۲۰۰۸) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵۰ میلی مولار (pH= ۷)، اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی مولار، EDTA (۰/۱ میلی مولار) و ۵۰ میکرولیتر عصاره گیاهی بود. واکنش با حجم نهایی ۱/۵ میلی‌لیتر با افزودن پراکسیدهیدروژن ۱/۲ میلی‌مولار به مخلوط واکنش آغاز شد. میزان اکسیداسیون آسکوربات در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از آنزیم‌سنجی به‌عنوان واحد فعالیت بر میکروگرم کل پروتئین بیان شد.

اندازه‌گیری بیان ژن

به‌منظور بررسی میزان تغییر بیان ژن‌های موردمطالعه، RNA کل از نمونه‌های برگ با استفاده از کیت RNeasy(Plant Mini Qiagen Inc., Germany) استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA به ترتیب توسط ژل آگارز و اسپکتروفتومتری تعیین شد. به‌منظور حذف آلودگی DNA ژنومی، نمونه‌های RNA تحت تیمار آنزیم (RNase free DNase I Thermo Fisher Scientific, USA) قرار گرفتند. سپس برای ساخت cDNA تک‌رشته‌ای یک میکروگرم از RNA کل با استفاده از کیت رونویسی معکوس بر اساس روش کار شرکت تولیدکننده (Fermentas, Germany) مورداستفاده قرار گرفت. جفت آغازگرهای اختصاصی استفاده‌شده در جدول شماره ۱ نشان داده شده‌اند (Hashemipetroudi et al., 2104).

واکنش qRT-PCR در حجم نهایی ۲۵ میلی‌لیتر شامل Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, US)، 200 نانوگرم cDNA به‌عنوان الگو، آغازگرهای رفت و برگشت (هرکدام ۰/۲ میکرومول) و آب فاقد نوکلئاز تهیه شد. چرخه‌های حرارتی شامل واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۱۵ دقیقه)، ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۱۵ ثانیه)، اتصال آغازگرها در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) انجام شد. تعیین منحنی ذوب برای بررسی اختصاصیت آغازگرها در دمای ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مقادیر بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) با استفاده از GAPDH به‌عنوان ژن مرجع داخلی محاسبه شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

برای هر تیمار سه گیاه مجزا به‌عنوان تکرار بیولوژیک در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون توکی انجام شد.

جدول ۱. آغازگرهای اختصاصی استفاده شده برای qRT-PCR

Table 1. Specific primers used for qRT-PCR

نام ژن Gene name	شماره دسترسی Accession No.	توالی آغازگر Primer sequence
CIPK20	Z191099	caggagatgaggccagcact ctgttgctgttgctgcttgg
LecRLKs	JK671176	cggccgacaatgggtgaag gggcatgccaacctcctgtag
HSFA1a	Jk671211	gcagtgcccagttgtctt ttgggcctggtgtcata
ZF	JZ191101	gctcttgttggctcccctct tcaccatttacgccccaatc
GAPDH	JN604531	tgggcaagattaagatcggaat ttgatgtcgctgtgcttcca

نتایج و بحث

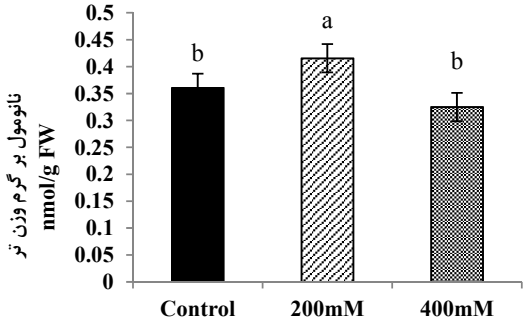
یکی از شاخص‌های اصلی بروز تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی تغییر در غلظت پراکسیدهیدروژن سلولی است. نتایج این پژوهش نشان داد که محتوای پراکسیدهیدروژن در غلظت ۲۰۰ میلی مولار کلریدسدیم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، اما در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم تغییر معنی‌داری در پراکسیدهیدروژن مشاهده نشد (شکل ۲؛ جدول ۲).

در کل، افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن در بیشتر گیاهان تیمار شده با نمک گزارش شده است (Sofo et al., 2015). پراکسید هیدروژن به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان در پاسخ به تنش شوری عمل می‌کند و بر بیان ژن‌های مربوط به تنش

مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد (Guo et al., 2006; Kumar et al., 2012). انباشت پراکسیدهیدروژن در تیمار ۲۰۰ میلی مولار کلریدسدیم در پژوهش حاضر ممکن است با نقش پیام‌رسان این مولکول مرتبط باشد. از سوی دیگر، به علت اینکه غلظت بالای پراکسیدهیدروژن برای گیاه سمی بوده و گیاهان از آنزیم‌های تخریب‌کننده آن از قبیل کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برای از بین بردن پراکسیدهیدروژن استفاده می‌کنند (Kumar et al., 2012)؛ بنابراین، کاهش میزان پراکسیدهیدروژن در گیاهان تحت شوری با غلظت نمک ۴۰۰ میلی مولار می‌تواند با توان بالای آلوروپوس برای تخریب این ترکیب در شرایط نامساعد در ارتباط باشد.

نتایج مشابهی از کاهش سطح پراکسیدهیدروژن تحت تنش شوری در گیاه هالوفیت *Suaeda salsa* گزارش شده است (Cai-Hong et al., 2005). آنزیم آنتی‌اکسیدانی آسکوربات‌پراکسیداز تمایل زیادی برای حذف پراکسیدهیدروژن از محیط سلولی و تنظیم مقادیر پراکسیدهیدروژن داخل سلولی در طی تنش دارد (آب + دهیدروآسکوربات ← پراکسیدهیدروژن + آسکوربات) (Jithesh et al., 2006; Meloni et al., 2003). فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در نمونه‌های برگی گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تیمار با نمک پس از ۷۲ ساعت به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$). به‌طوری‌که در هر دو تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار نمک، فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز به میزان ۸ و ۷ برابر تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۳؛ جدول ۲).

با این‌وجود بین دو تیمار نمک تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد. در پژوهش‌های پیشین، همبستگی مثبت بین غلظت کلریدسدیم و فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گیاه مقاوم به نمک *Plantago maritime* و گیاه حساس به نمک *Plantago media* (HediyeSekmen et al., 2007)، گیاهان *Avicennia marina* (Jithesh et al., 2006) و *Thinopyrum ponticum* (Wang et al., 2008) گزارش شده است. در طول تنش شوری به علت تغییر در فرآیندهای متابولیک، تولید گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌یابد و درنتیجه در میزان و فعالیت پروتئین مربوط به مکانیسم‌های کاهش اکسیژن فعال مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز افزایش مشاهده می‌شود (Cai-Hong et al., 2005; HediyeSekmen et al., 2007; Wang et al., 2008; Modaresi et al., 2014)؛ بنابراین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ازجمله آسکوربات‌پراکسیداز در پاسخ به تنش، نشان می‌دهد که تنظیم تنش اکسیداتیو، یکی از مؤلفه‌های مهم تحمل تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس است.



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم (۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار) بر محتوای پراکسیدهیدروژن در نمونه‌های برگی گیاه آلوروپوس لیتورالیس پس از ۷۲ ساعت اعمال تنش شوری. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار بین تیمارها ($P < ۰/۰۵$) را نشان می‌دهد.

Fig. 2. Effect of different concentrations of NaCl (0, 200 and 400 mM) on leaf H_2O_2 content of A. littoralis after 72 h of salt stress. Different letters above bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments.

جدول ۲. نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیک در پژوهش حاضر

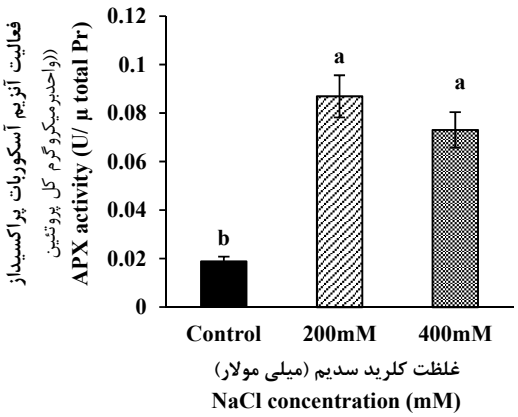
Table 2. Results of analysis of variance and comparison of means of physiological traits in present study

تیمارها Treatments	میانگین صفات Trait means	
	H_2O_2	APX
شاهد Control	0.36^{b*}	0.018^{b}
۲۰۰ میلی مولار کلریدسدیم 200 mMNaCl	0.41^{a}	0.086^{a}
۴۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم 400 mMNaCl	0.32^{b}	0.073^{a}
P-value	0.0002	0.05
SEM**	0.01	0.01

*میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار آماری هستند.

*Means with sameletter in each column have no statistical difference. **Standard error of means

در پژوهش حاضر تغییر در الگوی بیان چهار ژن شامل دو ژن متعلق به خانواده کینازها (LecRLK و CIPK20) و دو ژن مرتبط با فاکتورهای رونویسی (HSFA1a و ZF) در برگ‌های گیاه آلوروپوس لیتورالیس در پاسخ به ۷۲ ساعت تنش شوری مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور تعیین شرایط بهینه تکثیر، تائید صحت آغازگرهای طراحی‌شده و بررسی کیفیت cDNA، واکنش PCR انجام شد. تک باند با اندازه مورد نظر برای تمام ژن‌های موردبررسی، صحت عملکرد آغازگرهای طراحی‌شده را تائید نمود (شکل ۴).



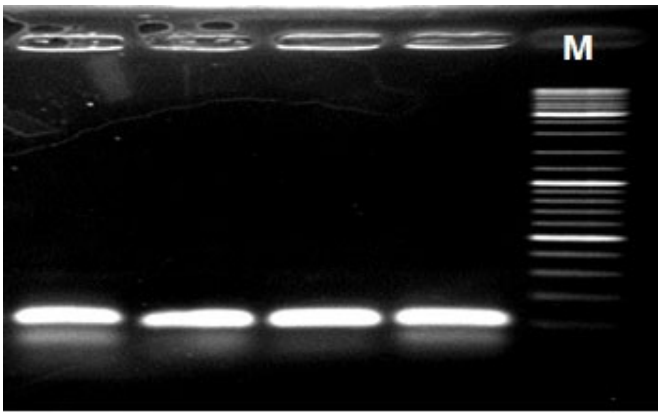
شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در نمونه‌های برگی گیاه آلوروپو سلیتورالیس پس از ۷۲ ساعت اعمال تنش شوری. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار بین تیمارها (P< ۰/۰۵) را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Effect of different concentrations of NaCl (0, 200 and 400 mM) on the activity and APX enzyme in leaves of A. littoralis after 72 h of salt stress. Different letters above bars indicate significant differences (P < 005) among treatments.

LecRLKs گروهی از گیرنده‌های غشایی درگیر در انتقال سیگنال‌های درک تنش هستند. در مطالعه حاضر پس از ۷۲ ساعت تنش شوری، بیان ژن LecRLK در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار کلریدسدیم در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۳؛ شکل a5).

در مطالعه دیگر، اثر شوری (۶۰۰ میلی مولار کلریدسدیم) بر بیان این ژن در آلوروپوس لیتورالیس پس از یک هفته ارزیابی‌شده و هیچ تفاوتی بین شاهد و گیاهان تحت تیمار مشاهده نشد (Hashemipetroudi et al., 2014). مطالعات پیشین نقش و عملکرد این خانواده ژنی را در ایجاد پاسخ‌های مرتبط با تحمل انواع تنش غیر زیستی، به‌ویژه شوری در گیاهان مختلف ارزیابی کردند. افزایش نسبی مقادیر بیان ژن‌های AtLecRLK2 و AtLecRLK-b2 در گیاه آرابیدوپسیس به‌وسیله تنش اسمزی و شوری گزارش شده است (Deng et al., 2009). همچنین نشان داده شده که ژن G-type LecRLK در *Glycine soja* تحت تنش شوری تحریک و بیان آن تحت تأثیر خشکی و اسیدآبسیزیک نیز تغییر می‌کند (Sun et al., 2012). تعداد رونوشت‌های PsLecRLK در گیاه *Pisum sativum* تحت تنش شوری ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار پس از ۶ و ۱۲ ساعت افزایش یافت، بااین‌وجود، بعد از ۲۴ ساعت، سطح بیان ژن نسبت به سطح بیان در گروه شاهد کاهش یافت (Vaid et al., 2008). در مقابل، کاهش در بیان LecRLK تحت تنش ۶۰۰ میلی مولار کلریدسدیم بعد از ۶ و ۲۴ ساعت در آلوروپوس لیتورالیس گزارش شده است (Hashemipetroudi et al., 2014).

درک سیگنال‌های تنش، اولین مرحله در مسیر انتقال سیگنال است و توسط حسگرها و گیرنده‌های سطح سلولی مانند خانواده RLK انجام می‌شود. پس از درک سیگنال یون سدیم توسط دنباله خارج سلولی LecRLKها، یک آبشار از پروتئین‌های فسفریلاسیون ایجاد می‌شود که باعث فسفوریلاسیون پروتئین‌های پایین‌دستی، فعال‌سازی عوامل رونویسی، تغییر مسیرهای هورمونی و درنهایت منجر به فعال شدن ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش می‌شود (Vaid et al., 2008; Li et al., 2014). مکانیسم SIT1 (LecRLK در برنج)، تحت شرایط شوری بررسی‌شده و نشان داد که SIT1 سبب فسفریله شدن MPK3/6 شده و نقش واسطه در تولید اتیلن و سیگنال‌های اتیلن ناشی از شوری دارد که به‌نوبه خود منجر به تولید و انباشت گونه‌های اکسیژن فعال در گیاه می‌شود (Li et al., 2014). به‌طورکلی، با مقایسه نتایج پژوهش‌های ذکرشده می‌توان پیشنهاد کرد که بیان ژن LecRLK به‌عنوان یک گیرنده سطح سلولی طی زمان کوتاهی پس از درک تنش شوری، افزایش می‌یابد و در اثر این افزایش مکانیسم‌های دیگر درگیر در تحمل تنش شوری، فعال می‌شوند. پس‌ازآن، بیان ژن به سطح بیان شاهد کاهش‌یافته و این کاهش با فعال‌سازی ژن‌های پایین‌دستی در ارتباط است و به افزایش احتمال بقای گیاه کمک کند.



شکل ۴. محصول PCR برای تائید صحت عملکرد آغازگرها مورداستفاده در واکنش qRT-PCR. طول قطعات تکثیرشده تقریباً ۱۰۰جفت باز است. M: نشانگر وزن مولکولی فرمنتاز #SM1153.

Fig. 4. PCR products for confirmation of primers performance used at qRT-PCR. Length of amplified fragmens is around 100 bp. M: molecular weight marker #SM0311 (Fermentas).

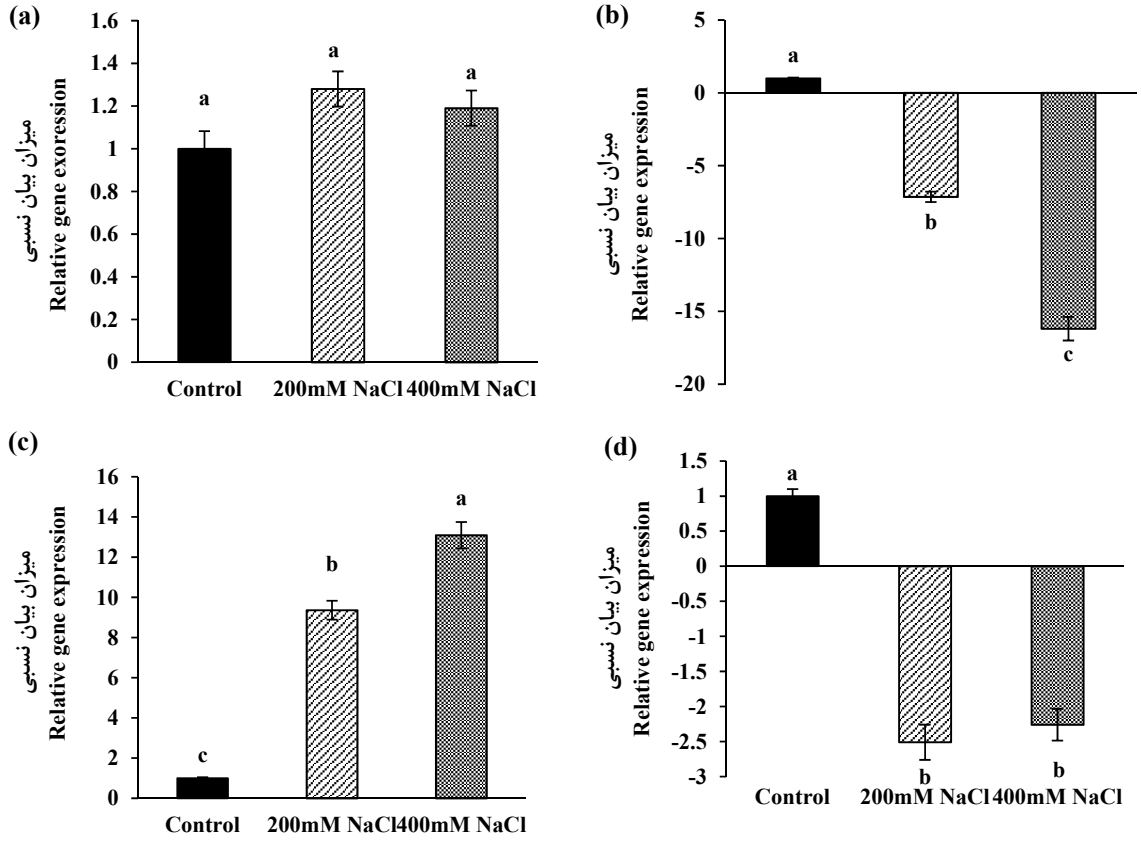
جدول ۳. نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین بیان ژن‌های موردمطالعه در پژوهش حاضر

Table 2. Results of analysis of variance and comparison of means of studied genes expression in present study

Treatments	تیمارها		Expression means		میانگین بیان	
			CIPK20	*LecRLKs*	HSFA1a	ZF
Control		شاهد	1^{a}	1^{a}	1^{c}	1^{a}
200 mMNaCl	میلی‌مولار	۲۰۰ کلریدسدیم	-7.14^{b}	1.28^{a}	9.36^{b}	-2.51^{b}
400 mMNaCl	میلی‌مولار	۴۰۰ کلریدسدیم	-16.19^{c}	1.19^{a}	13.09^{a}	-2.26^{b}
P-value			<.0001	0.6	<.0001	0.002
SEM**			2.47	0.15	1.79	0.56

گام بعدی در مسیر پیام‌رسانی تنش، تغییر الگوی بیان برخی از ژن‌های درگیر در فسفوریلاسیون پروتئین‌ها ازجمله MAPK، CDPK، CIB/CIPK و غیره است که با میانجی‌گری مولکول‌های پیام‌رسان ثانویه مانند Ca^{2+} اتفاق می‌افتد (Zhu. 2016; Younesi et al., 2020). نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن CIPK20 به‌طور قابل‌توجهی به ترتیب به میزان ۷ و ۱۶ برابر پس از ۷۲ ساعت قرار گرفتن در معرض ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار کلریدسدیم نسبت به شاهد کاهش می‌یابد (جدول ۳؛ شکل b5). این نتایج در توافق با مطالعه پیشین است که روند کاهشی بیان ژن CIPK21 را با گذر زمان پس از یک پیک در ۶ ساعت در *G. soja* گزارش شده است (Pandey et al., 2015)؛ اما در پژوهشی دیگر در گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری ۶۰۰ میلی مولار کلریدسدیم اختلاف معنی‌داری در بیان ژن CIPK20 بین تیمارهای شوری و شاهد مشاهده نشد. این نتایج در کوتاه‌مدت (۶ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار نمک) و هم در درازمدت (۷۲ ساعت بعد از تیمار نمک) مشاهده شده بود (Hashemipetroudi et al., 2014)؛ بنابراین، می‌توان اظهار داشت ازآنجایی‌که CIPK20 در مسیر پیام‌رسانی دخالت دارد و در مراحل اولیه تنش عمل می‌کند، تغییرات بیان آن به‌شدت معلول مدت‌زمان اعمال تنش است. از سوی دیگر در مسیر پیام‌رسانی تنش‌ها، فاکتورهای رونویسی نقش

مهمی را در کنترل بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش ایفا می‌کنند. تحت تنش گرمایی HSFها فاکتورهای انتهایی مسیر انتقال سیگنال هستند که از طریق فعال‌سازی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش گرما فعالیت می‌کنند. پژوهش‌های پیشین نشان دادند که تحت تنش گرمایی زیرخانواده‌های HSFA-1a/1b در چندین مسیر مختلف شامل بیوسنتز پروتئین و پردازش، پیام‌رسانی، متابولیسم، انتقال و تجمع اسمولیت درگیر هستند (Busch et al., 2005). علاوه بر این مشخص شده است که همپوشانی نسبی بین مسیرهای پاسخ‌دهنده به تنش گرمایی و تنش‌های غیرزیستی دیگر مانند خشکی، سرما و شوری وجود دارد (Jiang et al., 2005). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان HSFA1a با غلظت نمک رابطه مستقیم داشت ($P< ۰/۰۵$). به‌طوری‌که در تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار، بیان آن در حدود ۹ و ۱۳ برابر بیشتر از شاهد بود (جدول ۳؛ شکل 5c). این نتایج با مطالعات قبلی در برنج مطابقت دارد که افزایش بیان ژن‌های متعلق به اعضای خانواده ژنی HSF تحت تنش‌های خشکی و شوری گزارش کردند (Busch et al 2005). پژوهش‌های دیگری نیز نقش مهم ژن HSFA1a در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی دیگر علاوه بر تنش گرما را گزارش کرده‌اند. نشان داده شده است که در آرابیدوپسیس، HSFA1a بیان بیش از ۶۵ درصد از ژن‌هایی را که توسط گرما بیان آن‌ها افزایش می‌یابد را کنترل می‌کند و همچنین مشخص شده است که بیان برخی از ژن‌های HSP تحریک‌شده تحت تنش‌های شوری، پراکسید هیدروژن و مانیتول را نیز تنظیم می‌کند (Liu et al., 2013).



شکل ۵. بیان نسبی ژن‌های (a) G-type-LecRLK، (b) CIPK20، (c) HSFA1a و (d) ZF در نمونه‌های برگی گیاه *آلوروپوس لیتورالیس* پس از ۷۲ ساعت اعمال غلظت‌های مختلف نمک کلریدسدیم. GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار بین تیمارها ($P < ۰/۰۵$) را نشان می‌دهد.

Fig. 5. Relative expression of (a) G-type-LecRLK gene, (b) CIPK20 gene, (c) HSFA1a gene and, (d) ZF gene, in the leaves of *A. littoralis* after 72 h salt treatment with different concentrations of NaCl (0, 200 and 400 mM) GAPDH was used as an internal control. Different letters above bars indicate significant differences (P < 005) among treatments

همچنین گزارش شده است که بیش بیان ژن AtHSFA2 تحمل تنش شوری را در آرابیدوپسیس افزایش داد (Ogawa et al., 2007). بهبود تحمل شوری در آرابیدوپسیس تراریخت با بیان بیش‌ازحد HSFA2e برنج نیز گزارش شد (Yokotani et al., 2008). در گونه‌های مختلف گیاهی، برخی از اعضای خانواده HSF نقش‌های انحصاری و متفاوتی را در تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش بر عهده دارند. تجزیه‌وتحلیل گیاه تراریخته گوجه‌فرنگی نشان داد که HSFA1 با سنتز دیگر HSFs مانند HSFA2 و B1 و همچنین HSP نقش منحصربه‌فردی را به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اصلی برای شروع پاسخ تحمل گرما بر عهده دارد. در مقابل، هیچ تنظیم‌کننده اصلی از این خانواده در آرابیدوپسیس یافت نشد (Mishra et al., 2001). واکنش-های همپوشان و گسترده‌ای از اعضای مختلف خانواده‌های HSPها و HSFها برای تحمل گرما و دیگر تنش‌های غیر زیستی گزارش شده است که نشان می‌دهد آن‌ها عناصر مهم در شبکه‌های مختلف انتقال پیام و تحمل تنش‌های مختلف هستند (Liu et al., 2013). فاکتورهای رونویسی ZF نوع C3H پروتئین‌های متصل شونده به RNA-binding را بیان می‌کنند که در پردازش RNA نقش دارند (Bogamuwa and Jang, 2016). علاوه بر این، پروفایل بیانی این زیرخانواده ژنی از ZFها نشان داد بیان آن‌ها تحت تأثیر تنش-های غیرزیستی و زیستی قرار می‌گیرد و ازاین‌رو می‌توانند نقش مؤثری در تحمل تنش‌ها داشته باشند (Bogamuwa and Jang, 2016). در پژوهش حاضر، بیان ژن C3H-typeZF در هر دو تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار کلریدسدیم به میزان حدود ۲ برابر کاهش یافت (جدول ۳؛ شکل ۵d).

نشان داده شده است که ژن AtTZF1 از اعضای زیرخانواده ZF–C3H در گیاه آرابیدوپسیس با تأثیر بر رشد و تکامل گیاه، تحمل تنش را افزایش می‌دهد و تنظیم‌کننده بسیار مؤثر برای کنترل بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های اسیدآبسیزیک، اسیدجیبرلیک و قند است، به‌طوری‌که به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت برای تنش اسیدآبسیزیک و یک تنظیم‌کننده منفی برای تنش اسیدجیبرلیک عمل می-کند (Lee et al., 2012). همچنین تغییر بیان سریع و ماندگار دو ژن AtSZF1 و AtSZF2nv آرابیدوپسیس تحت تنش شوری نشان داده شده است. تجمع رونوشت‌های ژن OsTZF1 در گیاه برنج طی ۲ ساعت پس از تیمار با کلریدسدیم گزارش شده است (Jan et al., 2013). به‌طورکلی، بیان تعداد زیادی از ژن‌ها در گیاهان پس از قرار گرفتن در معرض تنش‌های مختلف تحریک می‌شود و تغییرات با تغییر مسیرهای مختلف باعث ایجاد پاسخ‌های تحمل در گیاه می‌شود. بیان ژن‌های دخیل در انتقال سیگنال‌های تنش شوری در مراحل اولیه پاسخ استرس القا می‌شود. پژوهش حاضر نشان داد که زمان و شدت اعمال تنش دو فاکتور مهم در تعیین نوع پاسخ‌های تنظیمی است. نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند به درک مکانیسم‌های مولکولی تحمل تنش شوری در آلوروپوس لیتورالیس کمک کرده و اطلاعات ارزشمندی را برای طراحی آزمایش‌های بعدی و مهندسی مکانیسم تحمل در گیاهان هم‌خانواده این گیاه فراهم کند.

منابع

Bogamuwa, S., Jang, J.C., 2016. Plant tandem CCCH zinc finger proteins interact with ABA, drought, and stress response regulators in processing-bodies and stress granules. PLoS One, 11, e0151574.

Busch, W., Wunderlich, M., Schöffl, F., 2005.Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal. 41, 1-14.

Cai-Hong, P., Su-Jun, Z., Zhi-Zhong, G. and Bao-Shan, W., 2005. NaCl treatment markedly enhances H2O2-scavenging system in leaves of halophyte *Suaeda salsa*. Physiologia Plantarum. 125, 490-499.

Chen, L., Wang, Q.Q., Zhou, L., Ren, F., Li, D.D., Li, X.B., 2013. Arabidopsis CBL-interacting protein kinase (CIPK6) is involved in plant response to salt/osmotic stress and ABA. Molecular Biology Reports. 40, 4759-4767.

Dazy, M., Jung, V., Férard, J.F., Masfaraud, J.F., 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. Chemosphere. 74, 57-63.

Deng, K., Wang, Q., Zeng, J., Guo, X., Zhao, X., Tang, D., Liu, X., 2009. A lectin receptor kinase positively regulates ABA response during seed germination and is involved in salt and osmotic stress response. Journal of Plant Biology. 52, 493-500.

Ganie, S.A., Ahammed, G.J. and Wani, S.H., 2020. Vascular plant one zinc-finger (VOZ) transcription factors: novel regulators of abiotic stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Genetics Resource Crop and Evolution. 67**,** 799–807.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology. 59, 309-314.

Golldack, D., Li, C., Mohan, H., Probst, N., 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. Frontiers in Plant Science. 5, 151. doi:10.3389/fpls.2014.00151. eCollection.

Guo, M., Liu, J.H., Ma, X., Luo, D.X., Gong, Z.H., Lu, M.H., 2016. The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. Frontiers in Plant Science. 7, 114. doi: 10.3389/fpls.2016.00114. eCollection.

Guo, Z., Ou, W.Z., Lu, S.Y., Zhong, Q., 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Plant Physiology and Biochemistry. 44, 828-836.

Hashemipetroudi, S.H., Nematzadeh, G., Ahmadian, G., Yamchi, A., Kuhlmann, M., 2014. Expression analysis of salt stress related expressed sequence tags (ESTs) from Aeluropus littoralis by quantitative real-time PCR. Bioscience Biotechnology Research Communications. 9, 445-456.

HediyeSekmen, A., Türkan, İ., Takio, S., 2007. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant Plantago maritima and salt-sensitive Plantago media. Physiologia Plantarum. 131, 399-411.

Hoagland, M. B., Stephenson, M. L., Scott, J. F., Hecht, L. I., Zamecnik, P. C., 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. Journal of Biological Chemistry, 231, 241-257.

Jan, A., Maruyama, K., Todaka, D., Kidokoro, S., Abo, M., Yoshimura, E., Shinozaki, K., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2013. OsTZF1, a CCCH-tandem zinc finger protein, confers delayed senescence and stress tolerance in rice by regulating stress-related genes. Plant Physiology. 161, 1202-1216.

Jiang, M., Jiang, J.J., Miao, L.X., He, C.M., 2017. Over-expression of a C3H-type zinc finger gene contributes to salt stress tolerance in transgenic broccoli plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 130, 239-254.

Jithesh, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R., Parida, A., 2006. Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, Avicennia marina (Forsk) Vierh by mRNA analysis. Plant Cell Reports. 25, 865-876.

Khaliq, A., Zia-ul-Haq, M., Ali, F., Aslam, F., Matloob, A., Navab, A., Hussain, S., 2015. Salinity tolerance in wheat cultivars is related to enhanced activities of enzymatic antioxidants and reduced lipid peroxidation. CLEAN–Soil, Air, Water43, 1248-1258.

Kumar, R.R., Sharma, S.K., Gadpayle, K.A., Singh, K., Sivaranjani, R., Goswami, S., Raj, D.R., 2012.Mechanism of action of hydrogen peroxide in wheat thermotolerance-interaction between antioxidant isoenzymes, proline and cell membrane. African Journal of Biotechnology. 11, 14368-14379.

Lee, S.J., Jung, H.J., Kang, H., Kim, S.Y., 2012. Arabidopsis zinc finger proteins AtC3H49/AtTZF3 and AtC3H20/AtTZF2 are involved in ABA and JA responses. Plant and Cell Physiology. 53, 673-686.

Li, C.H., Wang, G., Zhao, J.L., Zhang, L.Q., Ai, L.F., Han, Y.F., Sun, Y., 2014. The receptor-like kinase SIT1 mediates salt sensitivity by activating MAPK3/6 and regulating ethylene homeostasis in rice. The Plant Cell. 26, 2538-2553.

Liu, Y., Zhang, C., Chen, J., Guo, L., Li, X., Li, W., Yu, Z., Deng, J., Zhang, P., Zhang, K., Zhang, L., 2013. Arabidopsis heat shock factor HSFA1a directly senses heat stress, pH changes, and hydrogen peroxide via the engagement of redox state. Plant Physiology and Biochemistry. 64, 92-98.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods. 4, 402-408.

Loreto, F., Velikova, V., 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus againstozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant Physiology, 127, 1781-1787.

Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J., 2003.Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. Environmental and Experimental Botany 49, 69-76.

Mishra, S.K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., Nover, L., Scharf, K.D., 2001. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. Genes & Development, 16, 1555-1567.

Modarresi, M., Moradian, F., and Nematzadeh, G.A., 2014. Antioxidant responses of halophyte plant Aeluropus littoralis under long-term salinity stress. Biologia 69: 478-483.

Ogawa, D., Yamaguchi, K., Nishiuchi, T., 2007. High-level overexpression of the Arabidopsis HSFA2 gene confers not only increased themotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. Journal of Experimental Botany, 58, 3373-3383.

Pandey, G.K., Kanwar, P., Singh, A., Steinhorst, L., Pandey, A., Yadav, A.K., Tokas, I., Sanyal, S.k., Kim, B.G., Lee, S.C., Cheong, Y.H., 2015. CBL-interacting protein kinase, CIPK21, regulates osmotic and salt stress responses in Arabidopsis. Plant Physiology. 169, 780-792.

Sun, X.L., Yu, Q.Y., Tang, L.L., Ji, W., Bai, X., Cai, H., Liu, X.F., Ding, X.D., Zhu, Y.M., 2012. GsSRK, a G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt stress. Journal of Plant Physiology. 170, 505-515.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. and Vitti, A., 2015. Ascorbate Peroxidase and catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. International Journal of Molecular Sciences. 12, 13561-13578.

Vaid, N., Pandey, P., Srivastava, V.K., Tuteja, N., 2008. Pea lectin receptor-like kinase functions in salinity adaptation without yield penalty, by alleviating osmotic and ionic stresses and upregulating stress-responsive genes. Plant Molecular Biology. 88, 193-206.

Wang, D., Guo, Y., Wu, C., Yang, G., Li, Y., Zheng, C., 2008. Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice. BMC Genomics. 9, 44. Doi: 10.1186/1471-2164-9- 44

Xiong, L., Schumaker, K. S., Zhu, J.K., 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. The Plant cell. 14, 165-183.

Yokotani, N., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, M., Hirochika, H., Iwabuchi, M., Oda, K., [2008. Expression of rice heat stress transcription factor OsHSFA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic Arabidopsis. Planta. 227, 957-967.

Younesi-Melerdi, E., Nematzadeh, G. A., Pakdin-Parizi, A., Bakhtiarizadeh, M. R. Motahari, S. A., 2020. De novo RNA sequencing analysis of Aeluropus littoralis halophyte plant under salinity stress. Scientific Reports. 10, 1-14.

Zhu, J. K., 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell. 167, 313-324

Zouari, N., Saad, R.B., Legavre, T., Azaza, J., Sabau, X., Jaoua, M., Masmoudi, K., Hassairi, A., 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass Aeluropuslittoralis, Gene. 404, 61-69.

University of Birjand

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences
Vol. 13, No. 4, pp. 1259-1270
Winter 2021
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.2443.1646

Original article

Expression analysis of some genes involved in signaling networks of *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. under salinity stress

E. Younesi-Melerdi[1], Gh. A. Nematzadeh[2], A. Pakdin-Parizi[3*]

1. *Ph.D. Student of Plant Biotechnology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran*
2. *Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, PhD in Genetics, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran*
3. *Assistant Professor of Genetics and Agricultural Biotechnology, PhD in Biotechnology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran*

Received 5 May 2019; Accepted 9 July 2019

Abstract

Plants respond to the destructive effects of salinity through changes in physiological and molecular processes. In the present study, the activity of SOD and APX antioxidant enzymes and changes in the expression of G-types-LecRLK, CIPK20, HSFA1a and C3H-ZF genes, involved in signaling and regulatory networks of *Aeluropus littoralis*, under salt stress has been investigated. The plant cuttings were cultured hydroponically under controlled conditions. The experimental design was consisted of a control (Hoagland's solution without NaCl addition) and two treatments (200 and 400 mM NaCl). After 72 h of salt treatment, leaf samples were harvested and H_2O_2 content, SOD and APX enzymes activity and also changes in gene expression were measured by qRT-PCR. The results showed that the activity of antioxidant enzymes in both 200 and 400 mM NaCl concentration was significantly increased ($P<0.05$). The lecRLK gene expression was not significantly changed among different treatments. The expression of CIPK20 gene were decreased 7 and 16 folds lower than control at 200 and 400 mM of NaCl treatments, respectively. The obtained results revealed that expression of HSFA1a gene was positively associated with salt concentration ($P<0.05$). So that, the expression of HSFA1a in 200 and 400 mM NaCl was 11 and 13 folds more than control, respectively. The expression of ZF30 gene was decreased significantly in both 200 and 400 mM NaCl treatments ($P<0.05$). The results showed that the expression pattern of studied genes is different under salt stress conditions that can be related to the role of each gene, salt concentration and stress duration.

Keywords**:** *Aeluropus littoralis,* Abiotic stress, Gene expression, Halophyte, Salt tolerance.

[*]Correspondent author: Ali Pakdin-Parizi; E-Mail: a.pakdin@sanru.ac.ir.