ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶
صفحه ٤٧٦ - ٤٦٣

ارزیابی فیزیولوژیک، جداسازی، بررسی بیو انفورماتیک و بیان ژن *NADP*– مالیک آنزیم تحت تنش شوری در آلوروپوس لیتورالیس

Physiological evaluation, isolation and gene expression investigation of *NADP*- malic enzyme undersalinity stress in *Aeluropus littoralis*

الهام یونسی ملردی*[1]، قربانعلی نعمت زاده[2]، احسان شکری[3]

۱- دانشجوی دکتری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- دانشجوی دکتری، دانشگاه تهران

Younesi-Melerdi E*[1], Nematzadeh Gh[2], Shokri E[3]

1- PhD Student, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3- PhD Student, University of Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: eyonesi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹٦/۲/۳۱)

چکیده

در پژوهش حاضر برای بررسی مکانیسم فتوسنتزی گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری، دوسطح بدون نمک (شاهد) و ٦۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl به مدت ۱۰ روز اعمال شده سپس پاسخ‌های گیاه در سطوح فیزیولوژیک و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور توالی کدینگ این ژن برای اولین بار از گیاه آلوروپوس لیتورالیس جداسازی و بررسی‌های بیوانفورماتیک روی آن انجام شد. نتایج نشان داد که میزان کلروفیل، محتوای نشاسته و میزان سدیم خارج شده از برگ در غلظت ٦۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) داشتند. توالی کدکننده ژن *nadp-me* پس از استخراج در پایگاه داده با شماره دسترسی KP122942.1 ثبت شد. نتایج بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی نشان داد که توالی جداسازی شده با توالی گونه شورزی *Megathyrsus maximus* بیش‌ترین همسانی دارد. هم‌چنین تجزیه توالی پروتئینی نیز تایید کرد که قطعه جداشده با طول ۷٤ آمینواسید بخشی از دامین متصل شونده به NAD(P) می‌باشد. نتایج تجزیه بیان نسبی نشان داد که بیان ژن *nadp-me* در غلظت ٦۰۰ میلی‌مولار نمک به‌میزان ۲/۱۹ برابر بیش‌تر از شاهد بوده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر، می‌توان اظهار داشت که افزایش بیان ژن *nadp-me* می‌تواند نقش موثری در ایجاد تحمل در برابر تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس داشته باشد.

واژه‌های کلیدی

آلوروپوس لیتورالیس
بیان ژن
شاخص‌های فیزیولوژیک
NADP-ME

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

مقدمه

شوری به‌عنوان یک تنش غیر زیستی رشد و نمو و عملکرد بسیاری از محصولات کشاورزی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Zhu 2002; Flowers and Colmer 2008; Wang et al. 2015) اغلب محصولات مهم کشاورزی به شوری حساس‌اند (Rohini et al. 2013) مقاومت به شوری صفتی چند ژنی است که به دامنه وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیک مرتبط می‌باشد. گیاهان شورزی که قادرند شوری بین ۱۵۰۰ – ۲۰۰ میلی‌مولار را تحمل کنند، گزینه‌های ایده‌آل برای مطالعه‌ی مکانیسم های پیچیده‌ی مقاومت به شوری به‌شمار می‌روند (Flowers and Colmer 2008; Tada et al. 2014; Bose et al. 2014). از جمله آن‌ها گیاه شورزی آلوروپوس لیتورالیس[1] است که با توجه به محتوای ژنومی کوچک (2n=2X=14)(Kaya et al. 2002) می‌تواند به‌عنوان یکی از مهم‌ترین کاندیداهای مدل ژنتیکی گیاهان شورزی معرفی شود. آلوروپوس لیتورالیس گیاهی علفی چندساله و از تیره گندمیان با سیستم فتوسنتزی C4، می‌باشد که می‌تواند شوری (NaCl) را تا سطح بالاتر از ۶۰۰ میلی‌مولار تحمل کند (Gulzar et al. 2003; Li et al. 1994) فتوسنتز یکی از مهم‌ترین و پیچیده‌ترین فرایندهای فیزیولوژیکی در گیاهان سبز است که با عملکرد رابطه مستقیم دارد (Jeffrey 2007) و به‌شدت تحت تاثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد (Ashraf and haris 2013). در اغلب گونه های گیاهی تنش اسمزی ناشی از شوری باعث بسته شدن روزنه، کاهش غلظت CO_2 بین سلولی و کاهش نرخ فتوسنتز می‌شود (Nardini et al. 2001)، از طرف دیگر شوری بر میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل a و b اثر می‌گذارد. تنش شوری علاوه بر تنش اسمزی، از طریق ایجاد سمیت یونی به گیاه آسیب می‌زند، به طوری‌که غلظت بالای یون Na^+ در سیتوپلاسم سلول‌های گیاهی مانع جذب K^+ به‌عنوان عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاه می شود (James et al. 2011). بنابراین گیاهان با تغییر پارامترهای فیزیولوژیک ازجمله تولید اسمولیت‌های سازگار مانند قندهای ساده و پیچیده که از هیدرولیز نشاسته به‌عنوان محصول ذخیره‌ای فتوسنتز حاصل می‌شوند، با این تغییرات مقابله می‌کنند (Bartels et al. 2005).

درک ما از اساس مولکولی مقاومت به‌شوری بسیار محدود است. یکی از استراتژی‌های مناسب برای درک مکانسیم‌های مولکولی مقاومت به‌شوری، بررسی تغییر بیان رونوشت ژن‌های درگیر در فرآیندهای مهم زیستی از جمله فتوسنتز، در گیاهان شورزی است. گیاهان براساس مسیر فتوسنتزی به سه گروه C3، C4 و CAM تقسیم‌بندی می‌شوند. گیاهان C4 بخش کوچکی از پوشش گیاهی زمین را تشکیل می‌دهند و اکثر گیاهان جهان و عمده گیاهان زراعی جز گیاهان C3 محسوب می‌شوند. مطالعه مکانیسم فتوسنتزی C4 که به‌علت ورود یک سری از ویژگی‌های آناتونومیک و شیمیایی در راستای افزایش کارآیی فتوسنتزی در شرایط نامساعد (شوری، خشکی و دمای بالا) تکامل یافته است، دارای اهمیت می‌باشد.

این سیستم فتوسنتزی با کمک دو گروه مجزای سلولی یعنی سلول های مزوفیل و غلاف آوندی، CO_2 را با غلظت بالا در اختیار روبیسکو[2] قرار می‌دهد (Maier et al. 2011; Edwards et al. 2004). بدین ترتیب که ابتدا CO_2 در سلول‌های مزوفیل برگ به دام افتاده و به‌صورت ترکیب چهار کربنه اگزالو استات[3] تثبیت می‌شود، سپس اگزالو استات به مالات[4] تبدیل شده و مالات به سلول‌های غلاف آوندی منتقل و با تبدیل شدن به پیروات[5]، CO_2 را در اختیار روبیسکو قرار می‌دهد. واکنش تبدیل مالات به پیروات و آزاد سازی CO_2 در کلروپلاست سلول‌های غلاف آوندی توسط آنزیم NADP-ME[6] (EC 1.1.1.40) کاتالیز می‌شود (Edwards et al. 2004). البته مسیری که با حضور این آنزیم انجام می‌شود، یکی از سه مسیر موجود در تغلیظ CO_2 در گیاهان CAM و C4 است. سایر آنزیم‌های که در این مسیرها درگیرند و در تغلیظ CO_2 نقش دارند عبارتند از NAD-ME[7] و PEPCK[8] که به‌ترتیب دکربوکسیلاسیون مالات را به پیروات در میتوکندری و دکربوکسیلاسیون اگزالواستات را به فسفوانول

[1] *Aeluropus littoralis*

[2] *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase(Rubisco)*
[3] Oxaloacetate
[4] Malate
[5] Pyruvate
[6] *NADP-dependent malic enzyme*
[7] *NAD-dependent malic enzyme*
[8] *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

پیروات در سیتوزول کاتالیز می‌کنند (Detarsio et al. 2003) آنزیم NADP-ME این واکنش شیمیایی را در حضور یک فلز دو ظرفیتی و با استفاده از (S)-malate و NADP[1] به‌عنوان سوبسترا کاتالیز می‌کند و در نهایت CO_2، پیروات و NADPH تولید می‌شود. در مقیاس کوتاه مدت فعالیت این آنزیم از طریق مکانیسم آلوستریک و توسط سوبسترای خود (مالات) کنترل می‌شود. در بلند مدت فعالیت NADP-ME به‌وسیله تنظیم بیان ژن کنترل می‌شود (Saigo et al. 2013). بیان ژن nadp-me به‌طور گسترده‌ای توسط تنش‌های محیطی تنظیم می‌شود. پژوهش‌های قبلی نشان دادند که سینگال شوری بیان ژن nadp-me را تحریک می‌کند، Liao et al. (2007) و Sun et al. (2007) گزارش کردند که بیان ژن nadp-me و تجمع پروتیئن‌های آن در دو گونه Aloe vera L، Aloe saponarea Haw به‌وسیله شوری تحریک می‌شود و شدت آن به میزان مقاومت دو گونه در برابر تنش شوری بستگی دارد. هم‌چنین Fu et al. (2009) نیزگزارش کردند در گندم هگزاپلوئید فعالیت ژن nadp-me بعد از ٦ ساعت تحت تیمار نمک ٢٠٠ میلی‌مولار به یک مقدار حداکثر می‌رسد که دو برابر حد نرمال است. بنابراین می‌توان گفت بیان ژن nadp-me و فعالیت آنزیمی آن نقش مهمی در ایجاد مقاومت به شوری ایفا می‌کند.

گیاهان شورزی مانند آلوروپوس لیتورالیس از یک مکانیسم خودکار و ذاتی برای مقاومت در برابر تنش شوری استفاده می‌کنند بنابراین بررسی این مکانیسم در سطح مولکولی می‌تواند اطلاعات کاربردی‌تر و دقیق‌تری برای طراحی و مهندسی گونه‌های زراعی مقاوم به شوری در اختیار پژوهشگران قرار دهد. هدف از پژوهش حاضر سنجش برخی از پارامترهای فیزیولوژیک، جداسازی توالی کدشونده ایزوفرم فتوسنتزی ژن *nadp-me*، مطالعات بیو انفورماتیکی و بررسی تغییرات کمی بیان رونوشت‌های این ژن تحت تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از روش Real-time PCR بوده است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر بذور گیاه آلوروپوس لیتورالیس در ماسه کشت شده و با محلول مغذی هوگلند ١٠٠ درصد که حاوی عناصر ماکرو و میکرو می‌باشد، آبیاری شد. پس از گذشت دو ماه از رشد رویشی، به‌منظور جلوگیری از وارد آمدن شوک اسمزی ناگهانی به گیاهان، ابتدا گلدان‌ها به مدت ٦ روز و در سه نوبت با ١٥٠ میلی‌مولار نمک به‌همراه محلول هوگلند آبیاری شدند (Amira and Abdul 2011). سپس تیمار کلرید سدیم (برای اعمال تنش) در دو سطح بدون نمک (شاهد) و ٦٠٠ میلی‌مولار به مدت ده روز در سه تکرار بیولوژیک اعمال شد. بعد از اعمال تنش به‌منظور بررسی‌های فیزیولوژیک و مطالعات مولکولی نمونه‌گیری از برگ‌های بالغ و میانی گیاهان صورت گرفت. پژوهش‌های پیشین نشان دادند که آلوروپوس می‌تواند غلظت نمک تا ٦٠٠ میلی‌مولار را تحمل کند (Gulzar et al. 2003; Li et al. 1994).

برای اندازه‌گیری یون سدیم که از طریق غده‌های نمکی از برگ خارج و در سطح برگ تجمع یافتند، برگ‌های گیاه به آرامی بریده شده و پس از شستشو در ٣٠ میلی‌لیتر آب‌مقطر، جذب یون با استفاده از دستگاه نشر شعله‌ای مدل CORNING.EEL قرائت شد. بدین منظور منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول سدیم تعیین شد (Ding et al. 2010; Suarez et al. 2008; Warwick et al. 1992).

میزان کلروفیل برگ‌ها با کمک روش Hiscox and Israelsta (1979) تعیین شد (Ayeni et al. 2012). به ازای هر ٠/٠١ گرم بافت گیاهی پودر شده ١/٥ میلی‌لیتر محلول DMSO اضافه شد، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ٧٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس میزان جذب در طول موج‌های ٦٦٣ (کلروفیل a)، ٦٤٥ (کلروفیل b) نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد با قرار دادن در فرمول شماره (١) (Arnon 1949) میزان کلروفیل‌ها برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شدند (Ayeni et al. 2012).

(فرمول ١)

کلروفیل a $(mg.l^{-1})$: $(12.25*A_{663} - 2.79*A_{647})*D$

کلروفیل b $(mg.l^{-1})$: $(21.5*A_{647} – 5.1*A_{663})*D$

[1] Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

a+b کلروفیل (mg.l^{-1}) : (7.15*A_{663} + 18.71*A_{647})*D

که در این معادلات A جذب نور در طول موج‌های ٦٦٣، ٦٤٧، D قطر خارجی کووت اسپکترو فتومتر (cm) می‌باشد.

میزان نشاسته نمونه‌های گیاهی طی مراحل زیر اندازه‌گیری شد (Scott and Melvin 1953). ماده گیاهی با استفاده از ازت مایع پودر شده و ۱/۵ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰ درصد به ۰/۰۱ گرم از آن اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه با یکدیگر مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه و با دور g × ٦٠٠٠ سانتریفوژ شدند و پس از انتقال مایع رویی به لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری (این مرحله دوبار تکرار شد)، در آون ٤٥ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا اتانول کاملاً از ظرف خارج شود. سپس ٦٥٠ میکرولیتر اسید پرکلریک ۵۲ درصد و۵۰۰ میکرولیتر آب اتوکلاو شده به رسوب باقی‌مانده از مرحله قبل اضافه و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با دور g× ٦٠٠٠، مایع رویی به لوله آزمایش ۱۵منتقل (این مرحله دوبار تکرار شد) و با افزودن آب به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از مایع اخیر به یک تیوپ ۲ میلی‌لیتر انتقال داده و با افزودن آب به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. در مرحله بعد ٤٠٠ میکرولیتر از محلول آنترون تهیه شده (محلول ۰/۰۲ گرم آنترون در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک خنک) به نمونه‌ها اضافه شده و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها بلافاصله روی یخ قرار گرفتند. در پایان با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و قرائت طول موج ٦٣٠ نانومتر و با استفاده از فرمول زیر مقدار عددی نشاسته محاسبه شد:

(فرمول ۲)

$C_{un} = A_{un}/A_{st}*C_{st}$

که در این رابطه C_{un} غلظت نمونه مورد نظر، A_{un} طول موج جذب نمونه مورد نظر، A_{st} طول موج جذب نمونه استاندارد (محلول‌های استاندارد گلوکز) و C_{st} غلظت نمونه استاندارد می‌باشند.

از آن‌جا که توالی رمزکننده (CDS) ژن *nadp-me* برای گونه آلوروپوس لیتورالیس در بانک ژن موجود نبود، با استفاده از شماره دسترسی‌های HQ697600، AY274836.1، XM_003568737.، D16499.1، EU977179، FN397881.1 و براساس نواحی حفظ شده بین گونه‌ای، آغازگرهای مناسب برای تکثیر قطعه‌ای با طول ٦٠٠ جفت‌باز با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 طراحی شدند (جدول۱). برای بررسی بیان ژن *nadp-me* (Real-time PCR) براساس توالی جداسازی شده و بعد از تایید صحت توالی، آغازگرهای داخلی با طول و شرایط مناسب طراحی شدند. طول قطعه تکثیر ۹۰ جفت باز در نظر گرفته شد. در پژوهش حاضر بیان نسبی ژن *nadp-me* با ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی مقایسه شد آغازگرهای مناسب برای تکثیر قطعه‌ای با طول ۹۰ جفت‌باز برای ژن بتا اکتین نیز طراحی شد (جدول ۱)

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر، جداسازی و بررسی بیان ژن nadp-me در گیاه آلوروپوس لیتورالیس

نوع آغازگر	ژن	توالی (′۳→′۵)	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (^{0}C)
جداسازی (*ISO*)	*nadp-me*	F-ACACTGCTCTTGGAGGAGTTG R-CAACTCCAGATGTCCCAATCAG	٦٠٠	٦٥
بیان ژن (*GE*)	*nadp-me*	F- CGCAGAACTCATTGCTCTTG R- TCGGGAGTCAACAATCAGAC	۹۰	۵۹
رفرنس (*RE*)	*β actin*	F- GTCCGAGTACCCGACCATG R- GTGGTGCCGCTGTTCGAGA	۹۰	۵۹

جدول ۲- نتایج بلاست توالی پروتئینی قطعه‌ی ژنی *nadp-me* با سایر گونه‌ها

شماره دسترسی	نام گونه	میزان پوشش (%)	ارزش E	درصدهمسانی
CAZ48717.1	*Megathyrsus maximus*	۱۰۰	1E-41	۹٦
CAZ48489.1	*Aristida rhiniochloa*	۱۰۰	2E-41	۹۳
CAZ485514.1	*Panicum miliaceum*	۱۰۰	4E-41	۹۵
BAS70802.1	*Oryza sativa*	۱۰۰	8E-39	۸٦
AFL65183.1	*Sorghum bicolor*	۱۰۰	2E-38	۸۹
XP008648302.1	*Zea mays*	۱۰۰	5E-38	۸٦

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

به‌منظور جداسازی بخشی از ناحیه کدکننده ژن *nadp-me* استخراج RNA با کمک معرف ترایزول انجام شد. پس از حذف آلودگی احتمالی DNA از RNA استخراج شده با استفاده از دستوالعمل تیمار با آنزیم DNAase I شرکت فرمنتاز، RNA استخراج شده با کمک آنزیم Reverse transcriptase به cDNA تبدیل شد. به‌منظور تکثیر توالی ژن مورد نظر، ازcDNA سنتز شده و آغازگرهای رفت و برگشت (ISO) در واکنش PCR استفاده شد. چرخه‌های حرارتی PCR به‌صورت واسرشته‌سازی آغازین در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۳ دقیقه)، ۳۵ چرخه شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد (٤٥ ثانیه)، دمای اتصال آغازگر (٤٥ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱ دقیقه) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۷ دقیقه) اعمال شد. پس از حصول اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، حدود ۱۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۲/۵ درصد و با بافر TAE الکترفورز شد قطعه مورد نظر از روی ژل بریده و پس از خالص‌سازی، برای توالی‌یابی دو طرفه با آغازگرهای رفت و برگشت به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد.

بعد از دریافت نتایج توالی‌یابی، فایل حاوی توالی خام توسط نرم‌افزارهای Chromas و BioEdite مورد بررسی قرار گرفت. پس از تعیین و جستجوی ORF تجزیه بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی برای تایید توالی و مقایسه همولوژی در بانک داده‌ها انجام شد. هم‌چنین با رسم درخت فیلوژنتیک توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 و روش اتصال مجاور[1]، رابطه خویشاوندی توالی رمزکننده *nadp-me* آلوروپوس لیتورالیس با تعدادی از گیاهان C4، C3 و CAM مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین با استفاده از ابزار CAIcalculater (Puigbo et al., 2008) متغیرهای درصد GC و هم‌چنین شاخص تمایل کدونی (CAI[2]) برای توالی مورد نظر محاسبه شد. تجزیه توالی پروتئینی NADP-ME در پژوهش حاضر با استفاده از نرم‌افزار Interpro انجام شد.

تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان کلروفیل، میزان سدیم خروجی، میزان نشاسته، با فرایند GLM[3] نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ و با استفاده از مدل آماری زیر مورد بررسی قرار گرفت:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در این مدل Y_{ij} مقدار صفت مورد نظر، μ میانگین صفت مورد نظر در جامعه، T_i اثر تیمارهای اعمال شده (غلظت‌های صفر و ٦۰۰ میلی‌مولار نمک) و e_{ij} اثر خطای تصادفی می‌باشند. میانگین تیمارهای مورد نظر با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

به‌منظور تجزیه کمی بیان ژن مورد نظر، غلظت یکسانی از RNA (دو میکروگرم) برای سنتز cDNA در هر تکرار مورد استفاده قرار گرفت. cDNA تک رشته‌ای با کمک دستورالعمل شرکت فرمنتاز و آنزیم Revarse transcriptase سنتز شد. بعد از سنتز cDNA برای حصول اطمینان از صحت توالی و دمای اتصال آغازگرهای طراحی شده و تعیین دقیق شرایط تکثیر بهینه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برای انجام مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real time PCR) از مخلوط واکنش Syber Green1 شرکت فرمنتاز در حجم ۱۵ میکرولیتر و درحضور ژن β-actin به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. هم‌چنین برای افزایش دقت آزمایش سه تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی برای هر تیمار آزمایشی مد نظر قرار گرفت. در کنار تکثیر نمونه‌های اصلی چاهک‌هایی به نمونه‌های کنترل منفی (NTC) و کنترل مثبت اختصاص داده شد. چرخه‌های حرارتی PCR به‌صورت واسرشته سازی آغازین در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۱۵ دقیقه)، ٤۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۱۵ ثانیه)، دمای اتصال آغازگر ۵۹ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و بسط نهایی در ٦۰ درجه سانتی‌گراد (۵ ثانیه) اعمال شد. در نهایت، از روش تصحیح کارآیی طبق فرمول شماره ۳ برای تعیین بیان ژن *nadp-me* استفاده شد (Pfaffl 2004):

(فرمول ۳)

کارآیی تکثیر E:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct\ target\ (control-treated)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct\ ref\ (control-treated)}}$$

[1] Neighbor joining
[2] Codon Adaptation Index
[3] Genereized linear Model

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

ژن هدف: *nadp-me*

ژن رفرنس: *β actin*

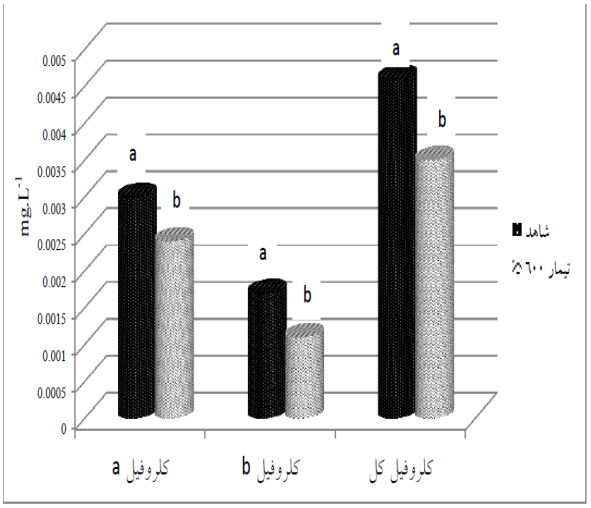
نتایج

میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل در تیمار ۶۰۰ میلی‌مولار نمک به‌ترتیب ۰/۰۰۲٤، ۰/۰۰۱۱، ۰/۰۰۳۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد، نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که این مقادیر نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار آماری ($P< 0.05$)را نشان می‌دهند (شکل ۱). میزان نشاسته به‌طور معنی‌داری ($P< 0.05$) تحت تاثیر تیمار ۶۰۰ میلی‌مولار نمک قرار گرفت. به‌طوری که در این تیمار میزان نشاسته ٤/٦٩ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۲ الف). هم‌چنین سدیم خارج شده از برگ در تیمار ۶۰۰ میلی‌مولار نمک ۰/۲۲۸ ppm به‌دست آمد که این مقدار افزایش ٤/٤٧ برابری و معنی‌دار آماری را ($P< 0.05$) نسبت به نمونه شاهد (ppm ۰/۰۵۱) نشان می‌دهد (شکل ۲ ب).

پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، قطعه مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (ISO) تکثیر شد. الکتروفورز محصول PCR وجود یک باند با اندازه تقریبی ۶۰۰ جفت‌باز را مربوط به ژن *nadp-me* در آلوروپوس لیتورالیس نشان داد (شکل٤ الف). نتایج تجزیه و تحلیل بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی (جدول ۲)، صحت قطعه جداسازی شده را تایید نمود. هم‌چنین این نتایج نشان داد که در سطح نوکلئوتیدی توالی به‌دست آمده از آلوروپوس لیتورالیس با *nadp-me* گونه‌های (FN397868.1) *Megathyrsus maximus* و (FN397882.1) *Phragmites australis* به‌ترتیب ۹۳ و ۹۱ درصد تشابه و در سطح پروتئینی با گونه‌های (CAZ48717.1) *Megathyrsus maximus* و (CAZ48489.1) *Aristida rhiniochloa* به‌ترتیب ۹۶ و ۹۳ درصد همسانی دارد. هم‌چنین به‌منظور تعیین روابط خویشاوندی قطعه ژنی جداسازی شده، درخت فیلوژنیک، براساس توالی پروتئینی و نوکلئوتیدی به‌دست آمده و در مقایسه با برخی گونه‌های گیاهی دیگر موجود در پایگاه داده‌ها ترسیم شد. نتایج گروه‌بندی براساس توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی به‌ترتیب در شکل ۵ نشان داد که توالی رمزکننده *nadp-me* آلوروپوس لیتورالیس قرابت نزدیکی با ژن *nadp-me* دو گونه *Eleusine coracan* و *Phragmites australis* دارد و در سطح پروتئینی نیز قرابت نزدیکی با توالی پروتئینی گونه‌های *Eleusine coracan* و *Panicum miliaceum* نشان داد.

با بررسی تمایل کدونی قطعه جداسازی شده ژن *nadp-me* از آلوروپوس لیتورالیس میزان درصد GC کل توالی، درصد GC در جایگاه نوکلئوتید سوم و هم‌چنین میزان CAI به‌ترتیب ۵۰ درصد، ٤٧,٢٪، ۰/٦٦٦ به‌دست آمد. تجزیه و تحلیل توالی پروتئینی NADP-ME آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از نرم‌افزار Interpro نشان داد که توالی جدا شده دارای ٧٤ آمینو اسید بوده که بخشی از دمین متصل شونده به NAD(P) (NAD(P)-binding domain) را تشکیل می‌دهد (شکل٤ ج). توالی کامل پروتئینی این ژن در *Zea mays* دارای طول ٦٣٦ امینواسید است که دو دامین Malic enzyme, N-terminal domain و NAD(P)- domain را شامل می‌شود (شکل٤ ب)

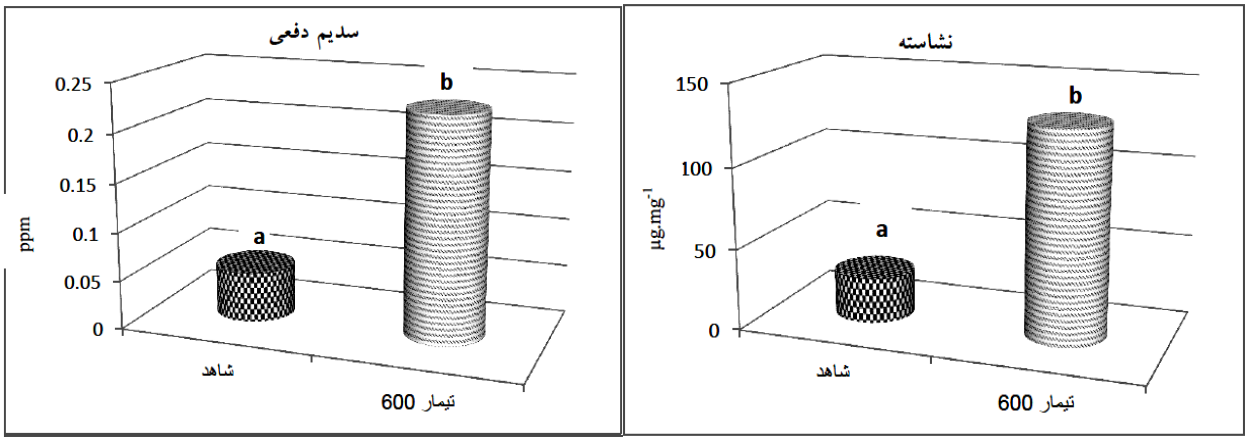
به‌منظور تعیین شرایط بهینه تکثیر، تایید صحت عملکرد آغازگرها (GE, RE) و بررسی کیفیت cDNA تهیه شده، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. به‌دست آمدن تک باند با اندازه ۹۰ جفت‌باز، صحت تکثیر ژن مورد بررسی را تایید کرد (شکل ٦).



شکل ۱- مقایسه میزان کلروفیل a، b، کل بر حسب میلی‌گرم بر لیتر در برگ‌های گیاه آلوروپوس لیتورالیس در غلظت صفر (شاهد) و ۶۰۰ میلی‌مولار نمک ده روز بعد از اعمال تنش.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]



شکل ۲- الف) مقایسه میزان نشاسته بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم در برگ‌های گیاه آلوروپوس لیتورالیس در غلظت صفر (شاهد) و ۶۰۰ میلی‌مولار نمک ده روز بعد از اعمال تنش، ب) مقایسه میزان سدیم دفعی بر حسب ppm از برگ‌های گیاه آلوروپوس لیتورالیس در غلظت صفر (شاهد) و ۶۰۰ میلی‌مولار نمک ده روز بعد از اعمال تنش.

>HQ697600.1:116-2026 Zea mays NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME) mRNA, complete cds
ATGCTGTCCACGCGCACCGCCGCCGTCGCCGCCTCCGCGTCCCCCGCCTCCCCGTGGAAGCTGGGAGGAC
GGAGCGAGGGCGGCGCCAGCTGCGACGGATGCCGGACCTACAGGAACACCCTGCGGAGGAGGGCCGCGCC
CGCCAAGGTGCGCGCCTTGCCGCCCAGGCGGGTGGACGCGGTCGCGATGGCCTCCAACGCGGAGACGGAG
ACGGAGAAGGAGCAGGAGGAGGCGGCGGCCGCCAGCGAGGAGCTGCCCGTCATGCCCTGGGCCACCTCCG
TCGCAAGCGGTTACACCCTTTTGAGGGATCCACACCACAACAAGGGTCTTGCTTTCACAGAGGAGGAAAG
GGATGGACACTACTTGCGTGGACTGCTTCCTCCGGCAGTACTATCTCAGGAACTCCAAATTAAGAAGTTC
ATGAACACCCTGCGGCAGTACCAGACCCCTTTGCAGCGGTATATAGCTATGATGAACCTTCAGGAAACGG
ACGAGAGGCTTTTCTACAAGCTTTTAATTGATAATGTGGTGGAGCTGCTTCCTTTTGTTTACACACCAAC
TGTAGGTGAGGCCTGCCAGAAGTATGGGTCCATCTTTGGACGACCACAGGGTCTGTATGTCAGCCTGAAG
GACAAGGGGAAGGTCCTAGAAGTTCTAAGGAACTGGCCACATAGGAACATTCAAGTTATCTGTGTTACTG
ATGGTGAGCGAATCTTGGGACTTGGAGATTTGGGTTGTCAGGGAATGGGAATTCCTGTAGGCAAACTTGC
TCTATACACTGCTCTTGGAGGAGTTGACCCATCAGTTTGCTTGCCTATCACAATTGATGTTGGTACAAAT
AACGAGAAACTGCTTAATGATGAGTTCTACATTGGACTCCGCCAAAAACGTGCGACCGGCGAGGAGTATG
ATGAGCTTATTGAAGAGTTCATGGCTGCTGTTAAGCAGTTCTATGGTGAGAAAGTCCTCATTCAGTTTGA
GGACTTTGCCAATCATAATGCCTTTGATTTGCTTGAAAAATATAGCAAGAGCCATCTTGTTTTCAATGAT
GATATCCAGGGCACAGCATCAGTGGTCCTTGCAGGTTTGTTAGCAGCACTCAAGATGGTTGGTGGGACCC
TGGCAGAGCAGACTTATTTGTTCCTTGGTGCTGGGGAGGCTGGAACTGGTATTGCAGAACTTATTGCTCT
TGAGATTTCGAAACAGACGAATGCTCCAATTGAAGAGTGCCGCAAGAAGGTTTGGCTGGTGGACTCAAAG
GGTTTGATTGTTGACTCTCGTAAAGGCTCTCTTCAGCCATTCAAGAAACCTTGGGCGCATGAGCGCGAGC
CCTTGAAAACCTTGTATGATGCTGTTCAGTCCATCAAACCTACAGTTCTGATCGGGACATCTGGAGTTGG
AAGAACATTCACAAAAGAAATCATTGAGGCCATGTCTTCCTTCAACGAGAGGCCTATCATCTTTTCACTG
TCAAACCCAACCTCGCATTCTGAATGCACTGCTGAACAAGCATATACATGGAGTCAGGGCCGTTCAATCT
TTGCCAGTGGCAGTCCATTTGCCCCCGTGGAGTACGAAGGAAAGACTTTTGTGCCTGGGCAGTCGAACAA
TGCCTACATTTTCCCTGGACTCGGCCTCGGTCTTGTGATCTCTGGAGCCGTCCGTGTCCACGAGGACATG
CTCCTCGCCGCCTCGAAAGCGCTAGCTGATCAGGCCACACAGGACAACTTCGAGAAGGGCTCCATCTTCC
CACCCTTCACCAGCATCAGAAAGATCTCTGCGCACATCGCTGCAGCCGTGGCTGCAAAAGCCTACGAGCT
CGGTCTGGCGACCCGTCTGCCTCCCCCCAGCGACCTGATGAAATATGCAGAGAACTGCATGTACACTCCC
GTCTACCGCAACTACCGGTAG

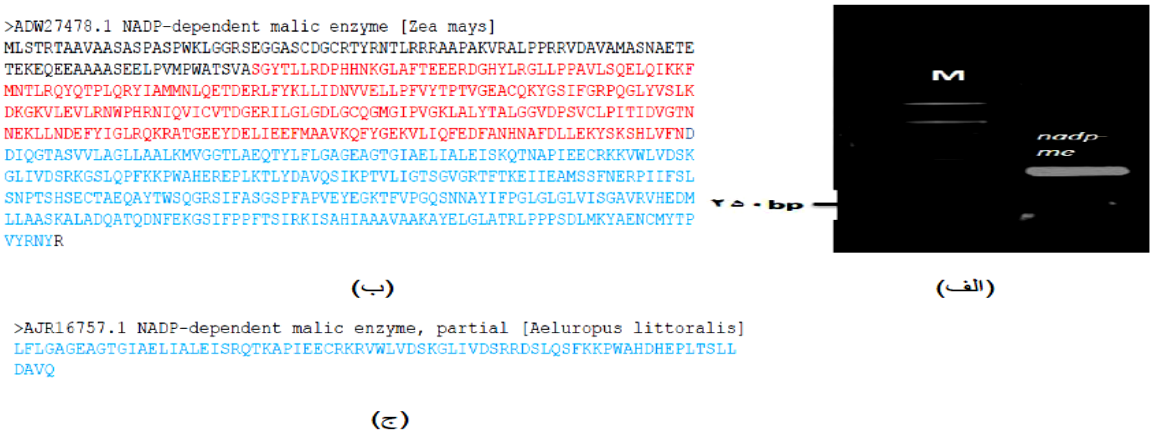
(الف)

>KP122942.1 Aeluropus littoralis NADP-dependent malic enzyme mRNA, partial cds
TTGTTCCTTGGTGCTGGCGAGGCTGGAACTGGCATCGCAGAACTCATTGCTCTTGAGATTTCAAGACAGA
CAAAGGCTCCGATCGAAGAGTGTCGCAAGAGGGTTTGGCTGGTGGATTCAAAGGGTCTGATTGTTGACTC
CCGAAGAGACTCCCTTCAGTCATTCAAAAAACCTTGGGCACATGACCATGAGCCTTTGACGTCCTTGTTA
GATGCTGTCCAG

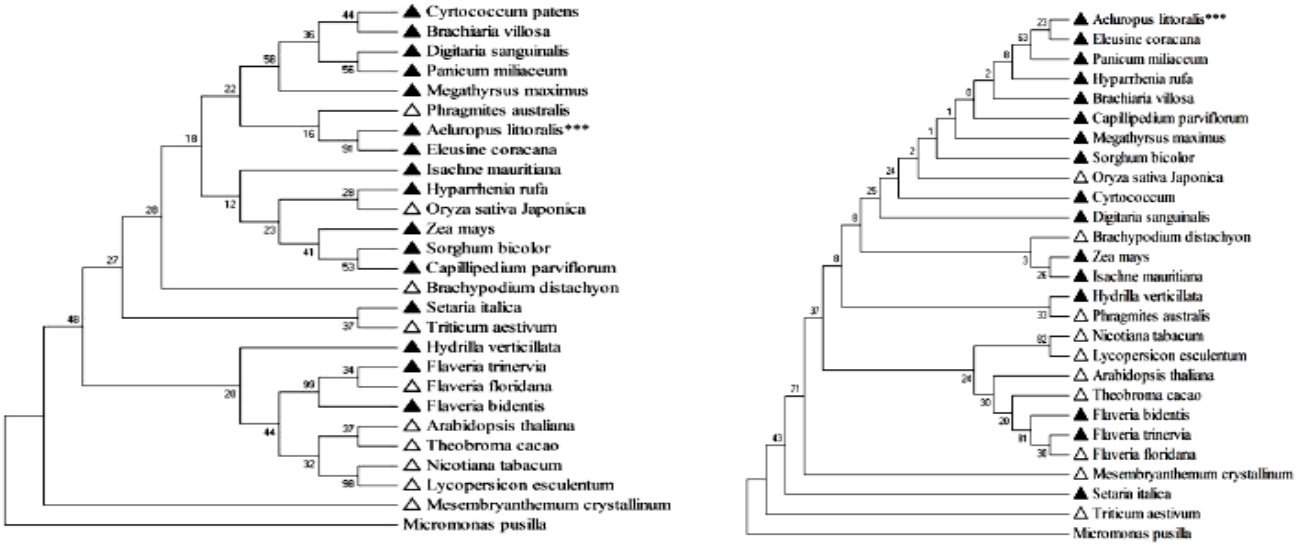
(ب)

شکل ۳- الف) کل توالی نوکلئوتیدی *Zea mays* NADP- ME (شماره دسترسی: HQ697600) به‌عنوان یکی از توالی‌هایی که برای طراحی آغازگر استفاده شد و محل آغازگر بر روی توالی با رنگ قرمز مشخص شد. ب) توالی نوکلئوتیدی *nadp_me* جداسازی شده از گیاه آلوروپوس لیتورالیس ثبت شده در پایگاه داده با شماره دسترسی: KP122942.1 و طول ۲۲۲ نوکلئوتید. محل آغازگر طراحی شده به‌منظور انجام واکنش Real time PCR با رنگ قرمز مشخص شد.

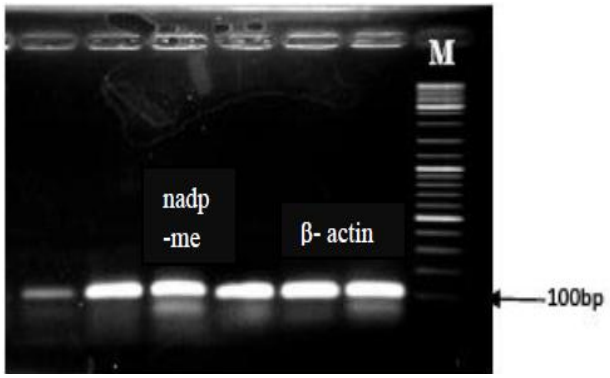
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]



شکل ٤- الف) نمونه‌ای از توالی تکثیر شده ژن *nadp-me* همراه با نشانگر وزن مولکولی شرکت فرمنتاز (M: SM0311.#) ب) توالی کامل پروتئینی *Zea NADP-* ME *mays* (شماره دسترسی: KP122942.1) با طول ٦٣٦ آمینواسید. محل دو دمین پروتئینی Malic enzyme, N-terminal domain (از نوکلئوتید ٩٦ تا ٣٤٩) و NAD(P)-binding domain (از نوکلئوتید ٣٥٠ تا ٦٣٥) که به‌ترتیب بارنگ قرمز و رنگ آبی در تصویر نشان داده شد. ج) توالی پروتئینی *NADP- ME* آلوروپوس (شماره دسترسی: .AJR16757) با طول ٧٤ آمینو اسید که بخشی از دمین NAD(P)-binding domain این پروتئین می‌باشد.



شکل ٥- مقایسه قرابت توالی نوکلئوتیدی nadp-me (راست)، توالی پروتئینی NADP-ME، آلوروپوس لیتورالیس با سایر گونه‌ها (چپ). درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 و روش اتصال مجاور (Neighborjoining) ترسیم شد. و فراسنجه تکرار در ترسیم، ١٠٠٠ در نظر گرفته شد.



شکل ٦- نمونه‌هایی از محصول PCR برای تایید صحت عملکرد آغازگرهای GE و RE. طول قطعه تکثیر شده ٩٠ جفت‌باز است. M: نشانگر وزن مولکولی #SM1153.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

هم‌چنین پس از خاتمه چرخه‌های تکثیر Real-time PCR اختصاصی بودن محصولات تکثیر یافته با تجزیه منحنی ذوب بررسی شد. پیک اختصاصی محصول برای ژن *nadp-me* در دمای ۷۸/۵ درجه سانتی‌گراد و ژن کنترل داخلی بتا اکتین در دمای ۸۱ درجه سانتی‌گراد در شکل ۷ نشان داده شده‌است که عدم حضور پرایمر دایمر و تکثیر غیراختصاصی را تایید می‌کند.

بررسی میزان تغییر در بیان ژن *nadp-me* تحت تیمار با تنش شوری نشان داد که پس از ۱۰ روز اعمال تنش (غلظت نمک ۶۰۰ میلی‌مولار)، بیان ژن مورد نظر در آلوروپوس لیتورالیس به میزان ۲/۱۹ برابر نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت (شکل۸).

بحث

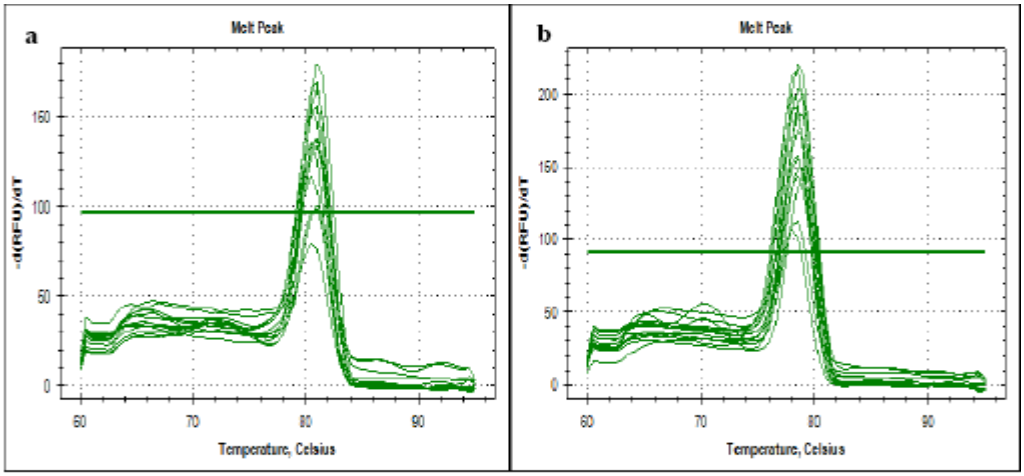
نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که محتوای کلروفیل در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl نسبت به شاهد به‌طور معنی‌دار کاهش یافته است (شکل ۱). دو عامل مهم یعنی نرخ سنتز از پیش ماده‌ی گلوتامات و میزان تخریب توسط آنزیم کلروفیلاز محتوای کلروفیل برگ را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که با توجه به آنکه گلوتامات علاوه بر کلروفیل پیش ماده پرولین به‌عنوان یک اسمولیت سازگارکننده نیز می‌باشد، در نتیجه احتمالاً در تنش شوری با رقابت ایجاد شده بین سنتز کلروفیل و پرولین، سهم سنتز کلروفیل و محتوای آن در برگ کاهش می‌یابد (Le Dily et al. 1993). از دلایل احتمالی دیگر برای کاهش محتوای کلروفیل می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم تخریب کننده‌ی کلروفیل (کلروفیلاز) در اثر افزایش موادی نظیر آبسیزیک اسید تحت تنش شوری اشاره کرد (Bertrand and Schoefs 1999). در پژوهش حاضر میزان نشاسته برگ نسبت به شاهد افزایش بسیار معنی‌داری را نشان داد (شکل۲ الف). نشاسته محصول ذخیره‌ای فتوسنتز بوده که اگرچه به‌طور مستقیم در مکانیسم تحمل تنش شوری دخالت ندارد ولی تبدیل قندهای محلول (به‌عنوان محصول اولیه فتوسنتز) به نشاسته از مهار فتوسنتز از طریق فیدبک منفی قندهای محلول جلوگیری کرده و لذا باعث تداوم چرخه فتوسنتزی می‌شود (Roitsch 1999).

در تنش شوری حفظ تعادل k^+ و Na^+ بسیار حیاتی است (Anschütz et al. 2014). گونه آلوروپوس لیتورالیس در گروه رکرتوهالوفیت‌ها (Recretohalophytes) که قادر به ترشح نمک از طریق غده‌ها و پرزهای نمکی به خارج از برگ هستند دسته‌بندی می‌شود (Flowers et al. 2015). دفع مقادیر زیادی سدیم در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار NaCl کارآمدی این گیاه را در دفع سدیم از طریق غده‌های نمکی نشان می‌دهد (شکل ۲ ب)، با توجه به آنکه داده‌های فیزیولوژیکی مختلف نشان می‌دهد که فرایند ترشح نمک به مقدار زیادی انرژ ی نیاز دارد (Yuan et al. 2015)، می‌توان پیش‌بینی کرد که یکی از دلایل ضعف گیاه در غلظت‌های بالای نمک مصرف انرژی زیاد طی پروسه‌ی حذف نمک است.

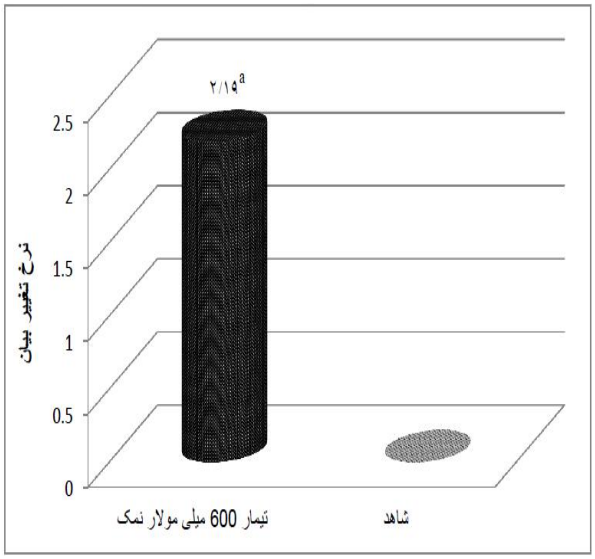
پاسخ سازگاری یا مقاومت به تنش شوری در گیاه شامل کمپلکس پیچیده‌ای از ویژگی‌های فیزیولوژیک، مسیرهای متابولیکی، شبکه‌های ژنی یا مولکولی است. در نتیجه به‌منظور بررسی پاسخ فتوسنتزی گیاه آلوروپوس لیتورالیس در سطح مولکولی توالی نوکلئوتیدی ژن *nadp-me* به‌صورت ناقص جداسازی شد و بعد از بررسی‌های بیو انفورماتیک و تایید توالی در پایگاه داده با شماره دسترسی KP122942.1 ثبت و سپس تغییرات بیان آن در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار نمک مورد بررسی قرار گرفت.

توالی نوکلئوتیدی *nadp-me* آلوروپوس لیتورالیس به‌ترتیب ۹۳ و ۹۱ درصد با *nadp-me* گونه‌های *Megathyrsus maximus* (FN397868.1) و *Phragmites australis* (FN397882.1) و در سطح پروتئینی به‌ترتیب ۹۶ و ۹۳ درصد با گونه‌های *Megathyrsus maximus* (CAZ48717.1) و *Aristida rhiniochloa* (CAZ48489.1) همسانی داشت (جدول ۲). تجزیه‌های فیلوژنتیک تخمینی از چگونگی اشتقاق اعضای یک خانواده در طی تکامل هستند. این روابط به‌وسیله مطالعه جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد و جهش با آرایش مجدد که در معرض انتخاب طبیعی می‌باشد تعیین می‌شوند (Golovnina et al. 2007). در پژوهش حاضر با ترسیم درخت فیلوژنتیک نمونه‌های مورد نظر در سطح پروتئینی و نوکلئوتیدی به‌طور نسبی به دو گروه عمده تقسیم شدند (شکل ۵).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]



شکل ۷- آنالیزمنحنی ذوب ژن‌های *nadp-me* (راست) و بتا اکتین در پژوهش حاضر (چپ). دمای ذوب محصولات واکنش ژن‌های *nadp-me* و بتا اکتین به‌ترتیب ۷۸/۵ و ۸۱ درجه سانتی‌گراد بود.



شکل ۸- مقایسه بیان ژن *nadp-me* در تیمارهای مختلف. سطح پایه (صفر) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شده‌است. محور طولی: تیمارهای اعمال شده، محور عرضی: میزان تغییر بیان تیمارها نسبت به شاهد نشان می‌دهد. نرمال سازی داده‌ها با استفاده از ژن بتا-اکتین انجام شد. a: بیان ژن nadp-me در تیمار ۶۰۰ میلی‌مولار نمک ۲/۱۹ برابر تیمار شاهد بود.

بنابراین با توجه به آنکه این تقسیم‌بندی به‌طور کامل انجام نشد می‌توان احتمال داد که این پروتئین در سطح تکامل به‌طورکامل بین گونه‌ها تفرق حاصل نکرده است. نتایج نشان دادند که توالی موردنظر در آلوروپوس در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی با گونه C4 و گیاه شورزی *Eleusine coracan* بیش‌ترین نزدیکی را داشت، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تغییر در توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی کارآیی این گونه‌ها را برای زندگی در محیط شور افزایش داده است.

در این پژوهش در راستای بررسی‌های بیوانفورماتیک، شاخص تمایل کدونی و درصد GC قطعه ژنی جداسازی شده از *nadp-me* آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از ابزار CAIcalculator محاسبه شد. درصد GC کل توالی، درصد GC نوکلئوتید سوم و شاخص تمایل کدونی قطعه ژنی جداسازی شده برابر ۵۰، ۴۷/۲ و ۰/۶۶ برآورد شد. این مقادیر می‌توانند نشان دهنده سطح بالای بیان این ژن و نیاز به استفاده از کدون‌های بهینه در آن باشد. نشان داده شده‌است که تمایل کدونی در ژن‌های با سطح بیان بالا

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

شدیدتر است و در این ژن ها برخی کدون‌ها نسبت به کدون‌های دیگر ترجیح داده می‌شوند (Harrison et al. 2011).

نتایج تجزیه توالی پروتئینی NADP-ME آلوروپوس با استفاده از نرم‌افزار Interpro نشان داد که توالی جداشده دارای ۷٤ آمینو اسید می‌باشد (شکل٤ ج) که بخشی از دامین متصل شونده به NAD(P) را تشکیل می‌دهد. این دمین از اعضای خانواده بزرگ Rossmann type fold بوده که شامل سه پیچش آلفا / بتا / آلفا می‌باشد. پروتئین‌های مختلفی از جمله مالیک آنزیم‌ها این دمین را دارا می‌باشند. با بررسی توالی این دمین در گونه‌های نزدیک مانند ذرت و توتون مشخص شد طول کامل این دامین در این آنزیم ۱۸۱جفت‌باز است (Li et al. 2009).

در پژوهش حاضر بیان نسبی ژن *nadp-me* در مقایسه با ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی اندازه‌گیری شد. بتا اکتین یکی از پر کاربردترین ژن‌های مرجع در مطالعات بیان ژن می‌باشد. Tian et al. (2015) با بررسی پروفایل بیانی ۹ ژن رفرنس *GAPDH*، *ACTIN*، *eIF-4α*، *PP2A*، *SAND*، *TIP41*، *UBQ* ، *EF-1α* و *TUB* در هویج تحت تنش‌های مختلف گرمایی، سرمایی، شوری و خشکی نشان دادند که ژن‌های *ACTIN* و *TUB* پایدارترین ژن‌ها در بین ژن‌های مورد مطالعه بودند. نتایج بررسی بیان ژن *nadp-me* افزایش بیان در سطح رونوشت در تیمار ٦۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۸).

تنش شوری سطح بیان بسیاری از ژن‌هایی را که به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم با محافظت گیاه ارتباط دارند تغییر می‌دهد (Carillo et al. 2003). بررسی پژوهش‌های پیشین نشان داد که مطالعات زیادی در مورد مکانیسم تنظیم بیان ژن *nadp-me* تحت تنش شوری انجام نشده است. احتمالاً مکانیسم‌های تنظیمی مختلفی به منظور تحمل تنش شوری با یکدیگر همکاری می‌کنند. که در این میان فیتو هورمون آبسیزیک اسید تنظیم کننده‌های مرکزی در مقاومت به تنش‌ها در گیاهان به شمار می‌رود (Cutler et al. 2010; Kim et al. 2010) و اثر خود را بر بیان ژن‌های موجود در یک رگولان توسط فاکتورهای رونویسی اعمال می‌کند (Abe et al. 1997; Busk and Pagés 1998; Saibo et al. 2009). هم‌چنین نشان داده شده‌است که غلظت NADP-ME با افزایش محتوای آبسیزیک اسید در سلول‌های محافظ روزنه تحت تنش شوری افزایش می‌یابد (Cushman 1992). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تنظیم فرادستی ژن *nadp-me* تحت تنش شوری احتمالاً به‌وسیله فاکتورهای رونویسی وابسته به آبسیزیک اسید میانجی‌گری می‌شود.

ازطرف دیگر بستن شدن روزنه‌ها می‌تواند NADP-ME را تحت تاثیر قرار دهد (Turner et al. 2001; Schroeder et al. 2001). با بسته شدن روزنه‌ها جذب CO_2 کاهش می‌یابد از آنجا که عملکرد NADP-ME تحویل CO_2 به روبیسکو سلول‌های غلاف آوندی است (Zhang 2003)، گیاه با افزایش محتوای NADP-ME کارایی تحویل و تثبیت CO_2 را در سطح مطلوب حفظ می‌کند.

Sun et al. (2003) گزارش کردند که mRNA و فعالیت آنزیم NADP-ME در گیاهان *Aloe vera L.* و *Aloe saponarea Haw* در دوره‌های زمانی مشخص، تحت تنش شوری افزایش می‌یابد. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده افزایش بیان ژن *nadp-me* و تجمع پروتئین آن به‌وسیله‌ی شوری را تایید کردند. بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که افزایش بیان ژن *nadp-me* در این پژوهش می‌تواند با هدف افزایش احتمالی تجمع پروتئین و در نهایت افزایش فعالیت آنزیم رخ داده باشد. از سوی دیگر با توجه به آن‌که پروتئین NADP-ME پروتئینی آبدوست است (Schroeder et al. 2001; Li et al. 2009) می‌توان پیش‌بینی کرد که یکی از دلایل افزایش بیان در سطح mRNA این است که گیاه با افزایش تولید پروتئین‌های آبدوست فشار اسمزی سلول را افزایش داده و اثر نامطلوب کمبود آب را کنترل می‌کند.

مالات ماده اولیه‌ی آنزیم NADP-ME است، که افزایش تجمع آن و دیگر یون‌های منفی مانند Cl^- با ورود یون Na^+ به سلول در طول تنش شوری به‌منظور برقراری توازن یونی گزارش شده‌است (Li et al. 1999; Cushman 1992; Zhang et al. 2009). اما سرنوشت مالات تولید شده در این مرحله کاملاً روشن نیست. از سوی دیگر برخی از مطالعات تایید کرده‌اند که افزایش سنتز NADP-ME نیز در همین مرحله اتفاق می‌افتد، در نتیجه می‌توان گفت احتمالاً این آنزیم در متابولیسم مالات تولید شده در این مرحله نیز مشارکت دارد (Wu et al. 2008; Shao et al. 2009) و بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که یکی از دلایل افزایش بیان NADP-ME افزایش تولید مالات در سلول است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

بنابراین پیشنهاد می‌شود که برای بررسی بیشتر اساس مولکولی تنظیم بیان این ژن تحت تنش شوری، مکانیسم‌های تنظیم کننده بیان ژن درسطح رونوشت و پروتئین مورد بررسی قرار گیرد. تا با در دسترس داشتن اطلاعات جامع‌تری درباره مکانیسم‌های مولکولی مقاومت در برابر تنش شوری در گیاه C4 و شورزی مثل آلوروپوس لیتورالیس بتوان رهیافت‌های مهندسی ژنتیک صحیح‌تری را برای انتقال ویژگی‌های مثبت این گیاه به برخی از گیاهان استراتژیک مثل برنج، ذرت و گندم طراحی کرد.

منابع

Abe H, Yamaguchi Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acidregulated gene expression. Plant Cell 9: 1859-1868.

Amira MS, Abdul Q (2011) Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 10: 7-15.

Anschütz U, Becker D, Shabala S *(*2014*)* Going beyond nutrition: regulation of potassium homoeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. Journal of Plant Physiology 171:670-687.

Arnon DI (1949) copper enzymes in isolated chloroplast; polyphenol-oxidase in Beta vulgaris. Plant physiology 24:1-15.

Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. Photosynthetica 51: 163.

AyeniO, Ndakidemi P, Snyman R, Odendaal J (2012) Assessment of Metal Concentrations, Chlorophyll Content and Photosynthesis in *Phragmites australis* along the Lower Diep River,CapeTown, South Africa. Energy and Environment Research 2 : 128-139.

Bartels D, Sunkars R (2005) Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Science 24:23-58.

Bertrand M, Schoefs B (1999) Photosyntheticpigment metabolism in plants during stress. In:Handbook of plant and crop stress (ed.Pessarakli, M.) Marcel Dekker, New York 527- 543.

Bose J, Rodrigo-Moreno A, Shabala S (2014) ROS homeostasis in halophytes context of salinity stress tolerance. Journal of Experimental Botany 65:1241-57.

Busk PK, Pages M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. Plant Molecular Biology 37: 425-435.

Carillo P, Annunziata MG, Pontecorvo G, Fuggi A, Woodrow P (2011) Salinity stress and salt tolerance. In: Arun S, editor. Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations Croatia: InTech. pp. 22-38.

Cushman JC (1992) Characterization and expression of a NADP-malic enzyme cDNA induced by salt stress from the facultative crassulacean acid metabolism plant, Mesernbryantliernumcrystallinurn. European Journal of Biochemistry 208: 259-26.

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR *(*2010) Abscisic acid*:* Emergence of a core signaling network. Annual Review of Plant Biology 61*:* 651-679.

Detarsio E, Gerrard Wheeler MC, Campos Bermudez VA, Andreo CS, Drincovich MF (2003) Maize CNADP-malic enzyme Expression in Escherichia coli and characterization of site-directedmutants at the putative nucleotide-binding sites. Journal of Biological Chemistry 278: 13757-13764.

Ding F, Chen M, Sui N, Wang BS (2010) Ca^{2+} significantly enhanced development and salt-secretion rate of salt glands of *Limonium bicolor* under NaCl treatment. South African Journal of Botany 76: 95-101.

Echevarrı´a C, Garcı a-Maurin˜o S, Alvarez R, Soler A, Vidal j (2001) Salt stress increases the Ca2+-independent phosphoenolpyruvatecarboxylase kinase activity in Sorghum plants. Planta 214:283-287.

Edwards GE, Franceschi VR, Voznesenskaya EV (2004) Singlecell C(4) photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. Annual Review of Plant Biology 55: 173-196.

Flowers TJ, Colmer TD (2008) Salinity tolerance in halophytes. The New phytologist 179:945-963.

Flowers TJ., Munns R, Colmer TD (2015) Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. Annals of Botany 115: 419-431.

Furumoto T, Hata S, Izui K (1999) cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase, a bundle sheath cell-specific enzyme. Plant Molecular Biology 41: 301-11

Fu ZY, Zhang ZB, Hu XJ, Shao HB, Xu P (2009) Cloning, identification,expression analysis and phylogenetic relevance of two NADP-dependent malic enzyme genes from hexaploid wheat.Comptes Rendus Biologies 332: 591-602.

Gulzar S, Khan MA, Ungar IA (2003) Salt tolerance of a coastal salt marsh grass. Communications in Soil Science and Plant Analysis 34: 2595-2605.

Harrison RJ, Charlesworth B (2011) Biased gene conversion affects patterns of codon usage and amino acid usage in the Saccharomyces sensu stricto group of yeasts. Molecular biology and evolution 28: 117-129.

Hasegawa PBR, Zhu J, Bohnert H (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 51:463-99.

Hibberd JM, Sheehy JE, Langdale JA (2008) Using C photosynthesisto increase the yield of rice rationale and feasibility. Current Opinion in Plant Biology 11: 228-231.

Hiscox JD, Israalstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian Journal of Botanyv 57: 1332-1334.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

Hong SY, Kim OK, Kim SG, Yang MS, Park CM. Nuclear import and DNA binding of the ZHD5 transcription factor is modulated by a competitive peptide inhibitor in *Arabidopsis*. The Journal of Biological Chemistry 286: 1659-1668.

Garg R, Verma M, Agrawal S, Shankar R, Majee M, Jain M (2013) Deep Transcriptome Sequencing of Wild Halophyte Rice, Porteresia coarctata, Provides Novel Insights into the Salinity and Submergence Tolerance Factors. DNA Reseach 21:69-84.

Golovnina KA, Glushkov SA, Blinov AG, Adkison LR Goncharov NP (2007) Molecula phylogeny of the genus *Triticum*. Plant Ecology, Evolution and Systematics 264: 195-216.

Iglesias AA, Andreo CS (1990) Kinetic and structural properties of NADP-malic enzyme from sugarcane leaves. Plant Physiology 92: 66-72.

James RA, Blake C, Byrt C S, Munns R (2011). Major genes for Na^+ exclusion, *Nax1* and *Nax2* (wheat *HKT1;4* and *HKT1;5*), decrease Na^+ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. Journal of Experimental Botany 62: 2939-2947.

Jeffrey SA (2007) Improving photosynthesis and yield potential**.** Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses 27-58.

Le-Dily F, Billard JP, Le-Saos J and Huault C (1993) Effects of NaCl and gabaculine on chlorophyll and proline levels during growth of radish cotyledons. Plant physiology and biochemistry 31:303-310.

Liao Y, Peng YG, Chen GZ (2007). Research advances in plant salt tolerance mechanism. Acta Ecologica Sinica 27: 2077-2089

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

Li WH, Hao NB, Ge QY, Zhang QD (1999) Advance in Study on CPathway in CPlant. Chinese Bulletin Botanical 16: 97-106.

Li ZH, Zhang LJ, Cui ZH, Zhu YS, Fan JJ, Ruan YY, Wang C (2009) Bioinformatical Analysis on C NADP-ME from Maize. Biotechnology Bulletin 3: 61-64.

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improvingplant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature biotechnology 17:287-91.

Kaya C, Kirnak H, Higgs D and Saltali K (2002) Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. Scientia horticulturae 93: 65-74.

Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO_2, and Ca^{2+} signaling. Annual Review of Plant Biology 61*:* 561-591.

Maier A, Zell MB, and Maurino VG (2011) Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C4 and C3 photosynthesis. Journal of Experimental- Botany 62: 3061-3069.

Maurino VG, Drincovich MF, Andreo CS (1996) NADP-malic enzyme isoforms in maize leaves. Biochemistry and Molecular Biology International 38: 239-250.

Maurino VG, Weber APM (2013) Engineering photosynthesis in plants and synthetic microorganisms. Journal of Experimental Botany 64: 743-751.

Nilsen ET, Orcutt DM (1996) The physiology of plants under stress: abiotic factors volum 1. Wiley, New York.

Nardini A, Tyree MT, Salleo S (2001) Xylem cavitation in the leaf of *Prunus laurocerasus* and its impact on leaf hydraulics. Plant Physiology 125:1700-1709.

Palidwor GA, Perkins TJ, Xia X (2010) A general model of codon bias due to GC mutational bias. PLoS One 5: e13431.

Parida Ak, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: A review Ecotoxicology and Environmental Safety 60:324-349.

Pfaffle MW (2004) Quantification strategies in real-time PCR. Chaper 3 pages 87 - 112 in: A-Z of quantitative PCR (Editor: S.A. Bustin) International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA publication.

Puigbo P, Bravo IG, Garcia-Vallve S (2008) E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI) BMC Bioinformatics 9:65.

Roitsch T(1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin*. Plant Biology 2: 198-206

Saibo NJ, Lourenco T, Oliveira MM (2009) Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. Annals of botany 103: 609 - 623.

Saigo M, Bologna FP, Maurino VG, Detarsio E, Andreo CS an Drincovich MF (2004) Maize recombinant non-C NADP-malic enzyme: a novel dimeric malic enzyme with high specific activity. Plant Molecular Biology 55: 97-107.

Saigo M, Tronconi MA, Gerrard Wheeler MC, Alvarez CE, Drincovich MF, Andreo CS (2013) Biochemical approaches to C4 photosynthesis evolution studies: the case of malic enzymes decarboxylases. Photosynthesis Research 117: 177-87.

Scott TA, Melvin EH (1953) Determination of dextran with anthrone. Analytical Chemistry. 25:1656-1661.

Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Manivannan P, Panneerselvam R, ShaoMA (2009). Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants–biotechnologically and sustainably improving agriculture and the eco-environment in arid regions of the globe. Critical Reviews in Biotechnology 29: 131-151. 27.

Shao HB, Liu ZH, Zhang ZB, Chen QJ, Chu LY, Brestic M (2011) Biological roles of crop NADP-malic enzymes and molecular mechanisms involved in abiotic stress. African Journal of Biotechnology 10: 4947-4953.

Shi H, Lee Bh WSJ, Zhu JK (2003) Overexpression of a plasma membrane Na+/H+ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. Nature biotechnology 21:81-5.

Sun SB, Shen QR, Wan JM, Liu ZP (2003). Induced Expression of the Gene for NADP-malic Enzyme in Leaves of Aloe vera L. under Salt Stress. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 35: 423-429.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]

Suarez N; Medina E (2008) Salinity effects on leaf ion composition and salt secretion rate in *Avicennia germinans* (L.) L. Brazilian Journal of Plant Physiology 20:131-140.

Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ (2001) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. Nature 410:327-330.

TadaY, Komatsubara S, and Kurusu T (2014) Growth and physiological adaptation of whole plants and cultured cells from a halophyte turfgrass under salt stress. AoB Plants 6: plu041.

Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang G, Xu Z, Xiong Ai (2015) Selection of Suitable Reference Genes for qPCR Normalization under Abiotic Stresses and Hormone Stimuli in Carrot Leaves. Plos One 10: e0117569.

Turner NC, Wright GC, Siddique KHM (2001) Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. Advances in Agronomy 71:193-231.

Udvardi MK, Kakar K, Wandrey M, Montanri O, Murray J, Andraiankaja A, Zhang J-Y, Benedito V, Hofer JMI, Cheng F, Town CD. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. Plant Physiology 144: 538-549.

Wang J, Baochun L, Yaxiong M, Xiaole M, Yong L, Erjing S, Ke Y, Panrong R, Xunwu Sh, Huajun W (2015). Transcriptomic profiling of the salt-stress response in the halophyte *Halogeton glomeratus.* BMC Genomics 16:169.

Warwick NWM, Halloran GM (1992)Accumulation and excretion ofsodium, potassium And chloride from leaves of two accessions of *Diplachne fusca* (L.) Beauv. New Phytologist 121: 53-61.

Wu YM, Lv JZ, Wang SJ, Li RZ (2008). Research Progress on Eco-physiological Res ponses of Plants to Drought Conditions. Rain Fed Crops 28: 90-93.

Yuan F, Lyv M J, Leng BY, Zheng GY, Feng ZT, Li PH and et al (2015) Comparative transcriptome analysis of developmental stages of the *Limonium bicolor* leaf generates insights into salt gland differentiation. Plant Cell Environ 38: 1637-1657.

Zhang F, Chi W,Wang Q, Zhang QD, Wu NH(2003).Molecular cloning of C4-specific Ppc gene of sorghum and its high level expression in transgenic rice. Chinese Science Bulletin. 48: 1835-1840.

Zhang ZB, Shao HB, Xu P, Hu MY, Song WY, Hu XJ (2009). Focus on Agricultural Biotechnology: Prospective for Bio-watersaving Theoriesand their Applications in the Semi-arid and Arid Areas. African Journal of Biotechnology 8: 2779-2789.

Zhifang G, Loescher WH (2003) Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in Arabidopsis thaliana enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. Plant, Cell and Environment 26:275-83.

Zhu J. Salt and drought stress signal transduction in plants (2002) Annual Review of Plant Biology 53:247.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.14.8]