ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحه ۲۱۳ - ۲۰۳

بررسی بیان برخی ژن‌های درگیر در مسیر سیگنالینگ آبسیزیک اسید در گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) تحت تنش شوری

Expression of some genes involved in ABA signaling pathway in halophyte *Aeluropus littoralis* under salinity stress

محدثه ابراهیمی[۱]، مهیار گرامی*[۱]، الهام یونسی[۲]، ایوب فرهادی[۲]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، بیوتکنولوژی کشاورزی، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران

۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری تخصصی، دانشیار، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

Ebrahimi M[1], Gerami M*[1], Younesi-Melerdi E[2], Farhadi A[2]

1- MSc Graduated, Assistant Professor, Agricultural Biotechnology, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran
2- PhD Graduated, Associate Professor, Agricultural Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mahyar.gerami@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی پاسخ گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس به تنش شوری است. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه سطح تیمارشامل شاهد (بدون نمک)، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم با سه تکرار اجرا شد. تغییرات در ٦ و ٢٤ ساعت پس از اعمال تنش شوری اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان قند محلول با افزایش زمان و غلظت سدیم کلسیم افزایش یافته است، به‌طوری که در بازه زمانی ٢٤ ساعت در هر دو غلظت افزایش معنی‌دار مشاهده شد. اما در بازه زمانی ٦ ساعت تنها در غلظت ٤٠٠ میلی‌مولار این افزایش معنی‌دار بود. همچنین، محتوای پرولین در بازه زمانی ٢٤ ساعت در هر دو غلظت ٢٠٠ و ٤٠٠ میلی‌مولار، نسبت به زمان ٦ ساعت به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. از سوی دیگر، محتوای پروتئین در زمان ٦ ساعت و غلظت ٢٠٠ میلی‌مولار تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت اما با افزایش میزان تنش به ٤٠٠ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری در محتوای پروتئین در این زمان مشاهده شد و در مقابل در زمان ٢٤ ساعت، در هر دو غلظت محتوای پروتئین به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. نتایج تجزیه بیان نسبی ژن‌ها نشان داد که بیان ژن PYL به‌شدت تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرد و روند معنی‌دار کاهشی را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۵$). به‌طوری که میزان این کاهش در زمان ٦ ساعت به مراتب بیشتر از زمان ٢٤ ساعت می‌باشد. بیان ژن *ABF* به‌طورکلی روند افزایشی را نشان داد به‌طوری که در زمان ٢٤ ساعت در هر دو تیمار به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. بنابراین می‌توان اظهار داشت که قندهای محلول و پرولین به‌عنوان ترکیبات سازگارکننده در پاسخ به تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس افزایش می‌یابند و مسیر سیگنالینگ آبسیزیک اسید نیز به شدت تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی

پروتئین
پرولین
قند محلول
ABF
PYL

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

رشد شهرنشینی، تغییرات اقلیمی از مهم‌ترین عوامل کاهش وسعت زمین‌های قابل کشت در کل دنیاست. و این کاهش امنیت غذایی جمعیت در حال رشد زمین را به مخاطره انداخته است. بیشترین میزان اراضی غیر قابل کشت مربوط به مناطقی است که تحت تاثیر شوریاند. عمده‌ترین عامل شوری در سطح جهان، کلرید سدیم میباشد. شوری حاصل از کلریدسدیم با تغییر روند انتقال آب و یون‌ها در گیاهان، تعادل یونی و دسترسی به عناصر غذایی را دستخوش تغییر می‌کند (Muchate et al. 2019). از آنجائی‌که ایران نیز دارای اقلیم خشک و نیمه‌خشک است، تنش شوری یکی از موانع تولید در کشاورزی محسوب می‌شود (Flowers 2004). یکی از استراتژی‌های مطرح شده توسط مجامع علمی برای کاهش اثرات سوء شوری بر کشاورزی فراهم کردن بستر مناسب برای کشت در زمین‌های متأثر از شوری و غیرقابل کشت است. ازجمله راهکارهای مطرح شده استفاده از پتانسیل ژنتیکی گونه‌ها و ژنوتیپ‌های متحمل به شوری است (Mishra et al. 2017). مکانیسم پاسخ گیاهان به تنش شوری بسیار پیچیده است بسته به گونه گیاهی و میزان تحمل گیاه به‌شدت متغیر است. برهمین اساس گیاهان به دو گونه هالوفیت و گلیکوفیت تقسیم میشوند.هالوفیت‌ها گیاهان متحمل به نمک هستند و مکانیسم‌های متفاوتی را برای تحمل نمک و برقراری توازن یونی به‌کار می‌گیرند (Yildiz et al. 2020). این گیاهان می‌توانند منابع ژنتیکی با ارزشی برای اصلاح گیاهان زراعی باشند (Fan et al. 2013; Inan et al. 2014) گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*)، گیاهی چند ساله از خانواده گرامینه با سیستم فتوسنتزی C4 است که قادر به تحمل سطوح بالای نمک تا ۶۰۰ میلی‌مولار می‌باشد (Younesi melerdi et al. 2017). آلوروپوس لیتورالیس دارای خصوصیات تکاملی مفیدی از قبیل ساختار ریش‌های کارآمد و وجود غدد نمکی در سطح برگ برای تطابق با شرایط شور است. این گیاه به‌دلیل توانایی زیاد آن در تحمل سطوح بالای شوری و همچنین هم‌خانواده بودن با گیاهان زراعی مهم مانند برنج، گندم و ذرت به‌عنوان منابع ژنتیکی ارزشمند در پاسخ به تنش شوری و خشکی مطرح می‌باشد (Torbati-nejad et al. 2001; Golzar et al. 2001).

شناخت پیچیدگی‌ها و اساس مولکولی مکانسیم‌های تحمل شوری می‌تواند منبع اطلاعاتی ارزشمند در اختیار متخصصین اصلاح گیاهان قرار دهد. در سطح مولکولی تحمل شوری بسیار پیچیده است به‌طوری که در پاسخ به تنش شوری شبکه‌ای از ژن‌ها به‌طور هماهنگ بیان‌شان تغییر کرده و در نهایت مسیرهای مختلف تحمل را تحریک می‌کنند (Younesi melerdi et al. 2020)

یکی از مهم‌ترین عناصر مولکولی درگیر در تحمل شوری فیتوهورمونی آبسزیک اسید (ABA) است. آبسزیک اسید یک هورمون پیام‌رسان مهم است که به‌عنوان واسطه انتقال سیگنال تنش از محیط خارجی به محیط داخل گیاه عمل میکند. مطالعات ژنومیک مقایس‌های نشان داد که هسته مرکزی مسیر سیگنالینگ هورمون آبسیزیک اسید از سه جزء اصلی تشکیل شده است که شامل PYR/PYL ، PP2C و SnRK2 می‌باشد. به‌طور خلاصه این مسیر با اتصال هورمون به گیرنده‌های PYL آغاز می‌شود و پس از تحریک تنظیم‌کننده‌های منفی PP2C و تشکیل کمپلکس ABA-PYL-PP2C، فسفریلاسیون تنظیم کننده مثبت (SnRK2) افزایش یافته و با فسفریله شدن فاکتورهای رونویسی پاسخ دهنده به آبسیزیک اسید (ABF) این مسیر خاتمه مییابد. در نهایت بیان ژن‌های پایین دستی پاسخ‌دهنده به آبسیزیک اسید تحت تاثیر فاکتور رونویسی کنترل می‌شوند. پژوهش‌های مختلفی پروفایل بیانی ژن‌های کدکننده اجزای اصلی مسیر سیگنالینگ آبسیزیک اسید در گونه‌های مختلف بررسی کرده و مسیر ذکر شده در بالا را تایید کردند (Duarte et al. 2019; Yadav et al. 2020).

Song et al. (2016) گزارش کردند که بیشبیانی ژن SnRK2 Poplar منجر به افزایش مقاومت ارابیدوپسیس تالیانا به تنش شوری می‌شود. همچنین افزایش تحمل تنش خشکی و شوری در برنج با بیش بیانی ژن PYL10 گزارش شده است (Verma et al. 2019).

هدف از پژوهش حاضر بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس به غلظت‌های مختلف تنش شوری و بررسی روند تغییر کمی سطوح ترانسکریپت دو ژن کلیدی ABF و PYL درگیر در مسیر انتقال پیام هورمون آبسیزیک اسید در زمان‌های اولیه اعمال تنش است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی با استفاده از قلمه و شرایط گلخانه‌ای دمای ۳۲-۲۸ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰-۶۰ درصد و طول روز ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت با روش هیدروپونیک کشت شدند. بستر کشت و تأمین کننده عناصر ماکرو و میکرو محلول هوگلند در نظر گرفته شد (شکل ۱). پس از گذشت یک ماه، گیاهچه‌ها تحت سه سطح تیمار شاهد (بدون نمک کلرید سدیم) و سطوح ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک کلریدسدیم با در نظر گرفتن ۳ تکرار بیولوژیکال قرار گرفتند. در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش از بافت برگی نمونه‌گیری انجام شد.



شکل ۱- گیاهان آلوروپوس لیتورالیس کشت شده در گلدان‌ها در گلخانه

به‌منظور بررسی سنجش قند تام، ۵ میلی‌لیتر استون بر ۰/۵ گرم از بافت برگی خالص افزوده شد و هموژن شد. سپس در سانتریفیوژ ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و محلول رویی به‌دست آمده فیلتر شد و بر باقی مانده نمونه گیاهی ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه به‌خوبی مخلوط شد. پس از سانترفیوژ بر ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول آنترون (انحلال ۱۰۰ میلی‌گرم آنترون در اسیدسولفوریک ۷۰٪ سود) افزوده شد.

این مخلوط به‌همراه محلول‌های استاندارد از قند که به آن‌ها هم محلول آنترون اضافه شده است در حمام آب‌گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از سرد شدن، جذب آن‌ها در برابر بلانک (آب‌مقطر و محلول آنترون) در ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و بر اساس منحنی استاندارد، مقدار قند کل ارزیابی شد و براساس میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد (Yemm et al. 1954).

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل در نمونه‌های گیاهی از روش برد فورد (۱۹۷۶) و با رسم نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) در غلظت‌های ۵۰ تا ۸۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه گیاهی در ۱۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) همگن شده و پس از سانتریفیوژ محلول رویی به‌عنوان عصاره استفاده شد. مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری پروتئین شامل ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۸۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر و ۵۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد بود. میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانش و مقدار پروتئین برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر بیان شد (Bradford 1976). به‌منظور اندازه‌گیری میزان پرولین ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت‌های گیاهی فریز شده با ۲۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۳ درصد هموژن شد. سپس نمونه آماده شده با ۱۵۰۰۰ دور در در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا مواد اضافی از محلول جدا شوند. سپس یک میلی‌لیتر از عصاره به‌دست آمده در لوله آزمایش با یک میلی‌لیتر اسید نین هیدرین و یک میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال مخلوط شد و محلول حاصل به مدت یک ساعت در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در پایان جهت خاتمه واکنش، لوله آزمایش به حمام آب یخ منتقل شد و پس از سرد شدن لوله، دو میلی‌لیتر تولوئن به لوله آزمایش اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و با تشکیل دو فاز مجزا، قسمت رنگی آن برداشته شد و میزان جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Bates 1973).

در این تحقیق از آن جائی‌که توالی رمزکننده ژن‌های (ABF, PYL) برای گونه آلوروپوس لیتورالیس در بانک ژن موجود نبود، از نتایج آنالیز ترانسکریپتوم (RNAseq) در این گیاه استفاده شد (Yonesi-melerdi et al. 2020). برای اطمینان از صحت تشابه، توالی‌ها موجود با استفاده از ابزار BLASTN وب سایت NCBI در برابر پایگاه داده نوکلئوتیدی مورد جستجوی همولوژی قرار گرفتند. به‌منظور طراحی آغازگر از نرم‌افزار PRIMER 3 استفاده شد (جدول ۱).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

جدول ۱- توالی و خصوصیات آغازگرهای طراحی شده برای واکنش Real time PCR

نام ژن	توالی آغازگر	طول آغازگر	دمای اتصال	طول محصول
ABF	F- GAAATGGCTTGGTGAGGGGA	20	60	156
	R- CCAGGCCACCATTGAAAACG	20	60	
PYL	F- CTGGAGGTTGCACTTGACGA	20	60	102
	R- TCGGCTCCACAACTACCTCT	20	60	
GAPDH	F- TGGGCAAGATTAAGATCGGAAT	22	59	118
	R- TTGATGTCGCTGTGCTTCCA	20	59	

در این پژوهش به‌منظور استخراج RNA از نمونه‌های برگی از کیت و بافر استخراج RNAX- plus شرکت سیناکلون (روش ترایزول) استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج با استفاده از الکترفورز روی ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین شد. به‌منظور حذف آلودگی احتمالی DNA از RNA استخراج شده از دستوالعمل تیمار با آنزیم DNAase I شرکت فرمنتاز استفاده شد. سپس واکنش نسخه‌برداری معکوس به‌منظور سنتز cDNA تک رشته‌ای از نمونه‌های مختلف RNA با کمک آنزیم نسخه‌برداری معکوس انجام شد. به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها میزان یکسان از غلظت RNAها (۳ میکروگرم) در هر تکرار مورد استفاده قرارگرفت. بعد از سنتز cDNA برای حصول اطمینان از صحت عملکرد آغازگرهای طراحی شده و تعیین دقیق شرایط تکثیر بهینه و دمای اتصال آغازگرها، واکنش PCR برای هر ژن انجام شد. برای انجام مراحل Real time PCR از Syber green Master mix شرکت فرمنتاز استفاده شد. مخلوط واکنش در حجم ۱۵ میکرولیتر تهیه شده (جدول ۲) و برای افزایش دقت آزمایش از ۳ تکرار بیولوژیک و ۲ تکرار تکنیکال برای هر تیمار آزمایشی استفاده شد. چرخه‌های حرارتی PCR شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۱۵ دقیقه واسرشته‌سازی آغازین، ۳۵ چرخه شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد در ۱۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه اعمال شد. در این پژوهش بیان نسبی ژن‌های *ABF, PYL* با ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی مقایسه شد. در نهایت برای اطمینان از صحت تکثیر، محصولات واکنش Real time PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شدند. میزان بیان با استفاده از روش لیواک و همکاران محاسبه شد (Livak et al. 2001). تاثیر تیمارهای مختلف بر پارامترهای بررسی شده با در نظرگرفتن سه تکرار بیولوژیک و با استفاده از پروسه GLM نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ و با استفاده از مدل آماری زیر مورد بررسی قرار گرفت:

$$Yij= \mu + Ti + eij$$

که در این مدل Yij مقدار صفت مورد نظر، μ میانگین صفت مورد نظر در جامعه، Ti اثر تیمارهای اعمال شده) غلظت های صفر و 200 و 400 میلی‌مولار نمک (و eij اثر خطای تصادفی می‌باشند. میانگین تیمارهای مورد نظر با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

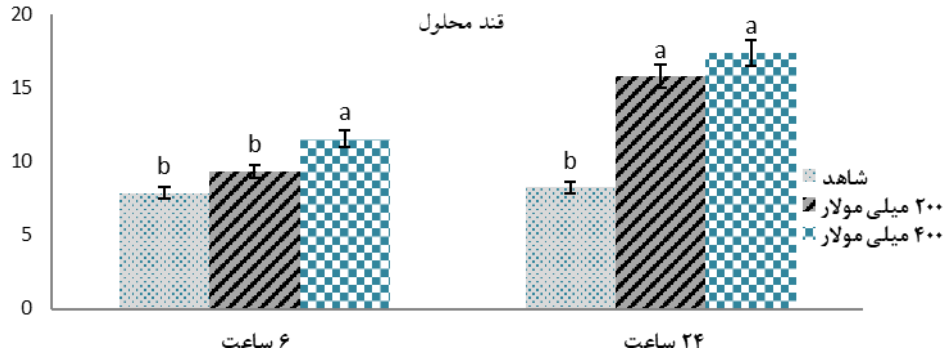
نتایج و بحث

تغییرات محتوای قند محلول

محتوای قند محلول با افزایش زمان و غلظت نمک روند افزایشی را نشان می‌دهد. اگرچه از نظر آماری در بازه زمانی ٦ ساعت تنها در غلظت ٤۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم این افزایش معنی‌دار بود (P< ۰/۰۵). در مقابل در بازه زمانی ٢٤ ساعت پس از اعمال تنش شوری در هر دو غلظت افزایش معنی‌دار (P< ۰/۰۵) مشاهده شده است (جدول ۲، شکل ۲).

از آنجاکه وجود یون‌های سدیم و کلر در خاک پتانسیل آب آن را کاهش می‌دهد. یکی از مکانیسم‌های جبرانی انباشت محلول‌های متابولیکی یا ترکیبات آلی سازگار در سیتوپلاسم است (Zou et al. 2013). مواد محلول سازگار یا اسمولیت‌ها، به‌علت وزن مولکولی پایین و قابلیت انحلال بسیار بالا، معمولاً در غلظت‌های بالا برای سلول سمیت ایجاد نمی‌کنند و باعث مهار واکنش‌های متابولیکی طبیعی سلول نمی‌شوند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۲- تغییرات محتوای قند محلول در بازه‌های زمانی ٦ ساعت و ٢٤ ساعت پس از اعمال تنش شوری ٢٠٠ و ٤٠٠ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار کلرید سدیم). میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی‌دار ندارند ($P< 0.05$).

جدول ۲- نتایج مربوط به آنالیز واریانس و مقایسه میانگین تیمارهای مختلف در ٦ ساعت

زمان/غلظت	قند محلول	پرولین	پروتئین
٤٠٠ میلی‌مولار/٢٤ ساعت	۱۷/٤۰^{a}	۲۵/٤۰^{a}	۲/۹۱^{e}
۲۰۰ میلی‌مولار/٢٤ ساعت	۱۵/۷۸^{a}	۲۵/۳۵^{b}	۳/۲^{d}
٤٠٠ میلی‌مولار/٦ ساعت	۱۱/۵٤^{b}	۱۷/۱۵^{c}	۳/۵۱^{c}
۲۰۰ میلی‌مولار/٦ ساعت	۹/۳۲^{c}	۱٤/۸۰^{d}	۳/۸^{a}
شاهد	^{c}۸	۱۲^{e}	۳/۷^{a}
P-value	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵
SEM	۰/۹۱	۱/۲	۰/۰۷٦

از اسمولیت‌های شناخته شده در پاسخ به تنش شوری میتوان به قندها، پرولین، بتائین و پلی‌آمین اشاره کرد (Chen et al. 2011). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که محتوای قند محلول در پاسخ به تنش شوری افزایش می‌یابد و با گذشت زمان میزان این افزایش نیز بیشتر می‌شود. به‌طوری که در میزان حداکثری تنش یعنی غلظت ٤٠٠ میلی‌مولار و زمان ٢٤ ساعت بیشترین میزان تجمع قند محلول برابر با ۱۷/٤ میکرمول برگرم مشاهده شد (جدول ۲، شکل ۲). افزایش محتوای قند محلول نشان می‌دهد که این نوع از ترکیبات سازگارکننده نقش کلیدی و تأثیر گذار در ایجاد پاسخ تحمل در گیاه آلوروپوس لیتورالیس دارند. پژوهش‌های پیشین نیز تجمع مونوساکاریدها و دیساکاریدهایی از قبیل گلوگز، ساکارز، دکسترین و مالتوز در پاسخ به تنش شوری را تایید کردند (Parviz et al. 2008; Evelin et al. 2019). Barti Garge and (2018) گزارش کردند که تجمع قند محلول در واریته متحمل نخود نسبت به واریته حساس بسیار بیشتر است. گزارش شده است که محتوای قند محلول در برگ و ریشه گیاه واریته متحمل پسته در غلظت متوسط و بالا نمک به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Resneshan et al. 2018). همچنین نتایج نشان می‌دهد این قندها از تجزیه نشاسته به‌عنوان محصول نهایی فتوسنتز و به‌وسیله افزایش بیان آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی نشاسته تولید می‌شوند (Peng et al. 2016; Mascellani et al. 2021). بنابراین تغییرات محتوای قند محلول در پاسخ به تنش شوری مکانسیم بسیار مهمی محسوب می‌شود زیرا با فرایندهای فیزیولوژیکی مهم مانند فتوسنتز و تنفس رابطه دارد و علاوه بر نقش سازگارکننده‌شان به‌عنوان منابع ذخیره‌کننده کربن در شرایط تنش نیز در نظر گرفته می‌شود (Kerepsi 2000).

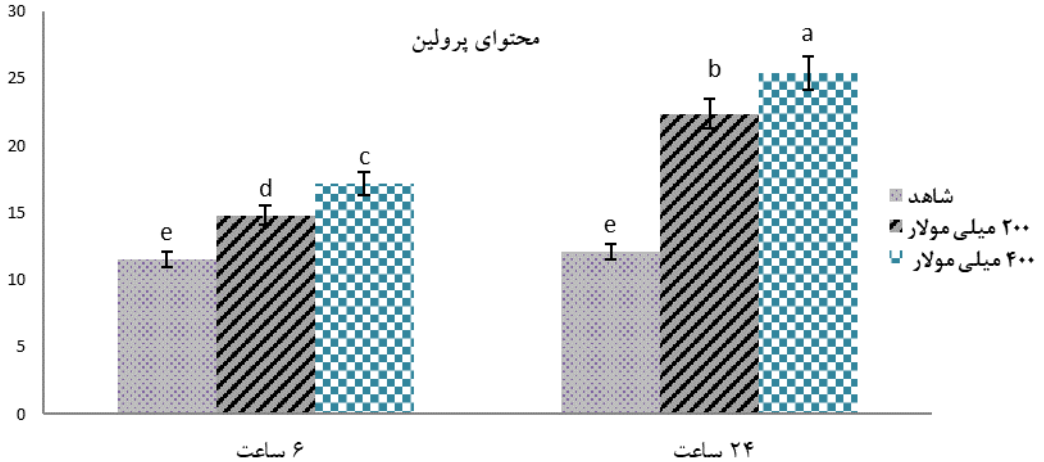
پرولین ترکیب سازگار کننده‌ی دیگری است که در این پژوهش تغییرات آن در پاسخ به غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. تنش شوری در هر دو بازه زمانی ٦ و ٢٤ ساعت و غلظت‌های ٢٠٠ و ٤٠٠ میلی‌مولار منجر به افزایش معنی‌دار محتوای پرولین نسبت به شاهد ($P<۰/۰۵$) شد، این افزایش در نمونه‌های مربوط به تیمار ٤٠٠ میلی‌مولار و بازه زمانی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

۲٤ ساعت بیشترین مقدار را به‌خود اختصاص داده است و برابر با میانگین ۲۵/٤ میکرومول بر گرم برآورد شد. به‌طور کلی اگرچه میزان پرولین تحت هر دو تیمار و هر دو بازه زمانی به‌طور معنی‌دار افزایش یافت، اما مقدار این افزایش در بازه زمانی ۲٤ ساعت در هر دو غلظت نسبت به بازه زمانی ٦ ساعت قابل توجه بود (جدول ۲، شکل ۳).

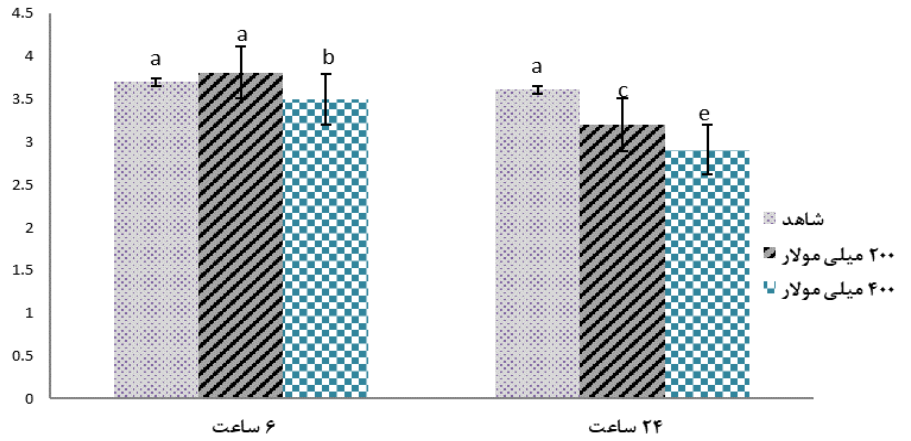
محتوای پرولین با افزایش شدت تنش افزایش یافت و بین غلظت نمک و زمان اعمال تنش با میزان افزایش پرولین رابطه مستقیم مشاهده شد (شکل ۳). پرولین علاوه بر اینکه در تخریب گونه‌های اکسیژن فعال و حفاظت از پروتئین و DNA، جلوگیری از دنیچریشن آنزیم‌های تحریک شده توسط کلرید سدیم مشارکت می‌کند، در انتقال کربن، نیتروژن و انرژی نیز نقش دارد (Kaur and Asthir 2015). پژوهش‌های پیشین نیز افزایش محتوای پرولین در حضور تنش شوری در گیاهان نشان دادند (Heidari and Jamshidi 2011; Cherifi et al. 2010). (2016) Gharsallah et al. با بررسی پاسخ بیست واریته‌ی مختلف گوجه‌فرنگی به تنش شوری گزارش کردند که افزایش محتوای پرولین با میزان تحمل تنش شوری مستقیم دارد و واریته‌های متحمل‌تر محتوای پرولین بیشتری را در پاسخ به تنش شوری انباشته می‌کنند. همچنین گزارش شده است که محتوای پرولین در دو گونه‌های هالوفیت *Salsola soda* L. و *Portulaca oleracea* L. به میزان ۳/۱ و ٤/٦ برابری نسبت به نمونه‌های رشد یافته در شرایط کنترل افزایش نشان داد (Karakas 2017). روند افزایشی پرولین در مواد با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار در دو گونهی (*Medicago ciliaris* L.) و *Medicago polymorpha* L. گزارش شده است (Chotechuen 2001). تفاوت در میزان قند محلول و پرولین انباشته شده در غلظت‌های مختلف و میزان بیشتر آن در غلظت‌های بالاتر را میتوان با توانایی و ویژگی‌های برتر گیاهان هالوفیت مرتبط دانست، به‌طوری که در غلظت‌های پایین‌تر این گیاهان با استراتژی مصرف بهینه انرژی از سدیم برای برقراری توازن بهره می‌جویند و اسمولیت‌هایی مانند پرولین در اولویت بعدی قرار می‌دهند. زیرا برقراری توازن با سدیم به انرژی بسیار پایین‌تری نیاز دارد (۳ موکلول ATP برای سدیم و ٤۱ مولکول ATP برای پرولین) (Lokhande et al. 2011)).

میزان تغییرات پروتئین تحت غلظت‌ها و تیمارهای مختلف در شکل ٤ نشان داده شده است. محتوای پروتئین در بازه زمانی ٦ ساعت تحت غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار تغییری نسبت به شاهد نشان نداده است و در این بازه زمانی در غلظت ٤۰۰ میلی‌مولار روند معنی‌دار کاهشی را نشان می‌دهد. در بازه زمانی ۲٤ ساعت روند ملموس‌تر و رفتار تقریباً مشابه در هر دو غلظت مشاهده شد، به‌طوری که میزان پروتئین در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار به میزان ۱٦/۰۱ درصد و در تیمار٤۰۰ میلی‌مولار ۱٦/۸ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت.



شکل ۳- تغییرات محتوای پرولین در بازه‌های زمانی ٦ ساعت و ۲٤ ساعت پس از اعمال تنش شوری ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار نمک). میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری تفاوت معنی‌دار ندارند ($P< 0.05$).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ٤- تغییرات محتوای پروتئین در بازه‌های زمانی ٦ ساعت و ٢٤ ساعت پس از اعمال تنش شوری ٢٠٠ و ٤٠٠ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار نمک). میانگین‌های دارای حروف از نظر آماری تفاوت معنی‌دار ندارند ($P< 0.05$).

در مجموع می‌توان اظهار داشت که در این پژوهش با افزایش شدت تنش محتوای پروتئین کاهش می‌یابد. هرچند اغلب مطالعات پیشین افزایش محتوای پروتئین در پاسخ به تنش شوری گزارش کردند اما مطالعاتی نیز نتایج مشابه با نتایج این پژوهش را نیز بیان داشتند (Gian et al. 1993; Sohrabi at al. 2011). می‌توان اظهار داشت که هنگامی که از محتوای پروتئین بحث می‌شود مجموعه‌ای پیچیده از عناصر مختلف از قبیل ترانسپرترها، فاکتورهای رونویسی و آنزیم‌های مختلف را در بر می‌گیرد. اگرچه در شرایط تنش تولید بسیاری از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها تحریک می‌شود ولی در عین حال تولید و فعالیت بسیاری از پروتئین‌هایی که در شرایط نرمال حضور دارند متوقف می‌شود و کارایی گیاهان براساس توازن که بین این دو فرایند، تعیین می‌شود. بنابراین نمی‌توان محتوای پروتئین به‌عنوان شاخص برای میزان تحمل تنش در گیاهان معرفی کرد بررسی پروتئین نیاز به ارزیابی‌های بیشتر و جزئی‌تر هر یک از عناصر حاضر در پروتئوم دارد. با این حال می‌توان یک سری از دلایل کلی مانند کاهش دسترسی به آمینواسیدهایی از قبیل پرولین برای کاهش محتوای پروتئین ذکر کرد. اگرچه در اغلب گیاهان مسیر بیوسنتز از نو (*de novo*) پرولین با استفاده از سوبستراهای گلوتامات و ارنیتین بر مسیر تخریب پروتئین ترجیح داد میشود (Verslues et al. 2010). بخش عمده پرولین تولیدی را فراهم می‌کند، اما می‌تواند بخشی از میزان کاهش پروتئین را توجیه کند.

نتایج تجزیه واریانس پارامترهای مورد مطالعه در جدول ٢ نشان داده شده است.

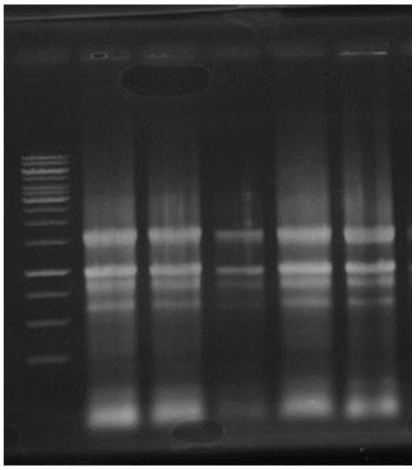
نتایج بررسی بیان ژن‌ها

کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز تایید شد (شکل ٥). نتایج آنالیز بیان با روش Real time PCR نشان داد که بیان ژن *PYL* به‌شدت تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرد و روندی کاهشی و معنی‌داری را نشان می‌دهد. به‌طوری که میزان این کاهش در زمان ٦ ساعت به مراتب بیشتر از زمان ٢٤ ساعت می‌باشد. تغییر بیان در بازه زمانی ٦ ساعت پس از اعمال تنش و به‌ترتیب با در نظر گرفتن تیمارهای ٢٠٠ و ٤٠٠ میلی‌مولار برابر برآورد شد. در بازه زمانی ٢٤ ساعت پس از اعمال تنش در تیمار ٢٠٠ میلی‌مولار نمک و در تیمار برآورد شد. مقایسه غلظت‌ها در بازه‌های زمانی مورد مطالعه نشان می‌دهد (شکل ٦).

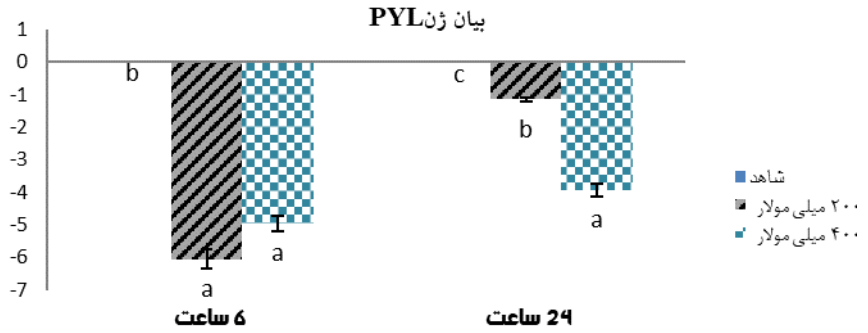
بررسی میزان تغییر بیان ژن *ABF* نشان دادکه در زمان ٦ ساعت و تیمار ٢٠٠ میلی‌مولار بیان این ژن کاهش یافت ولی در تیمار ٤٠٠ میلی‌مولار افزایش قابل توجهی را نشان می‌دهد. بیان این ژن در زمان ٢٤ ساعت در هر دو تیمار ٢٠٠ و ٤٠٠ میلی‌مولار افزایش را نشان می‌دهد (شکل ٧).

در نهایت منحنی ذوب و مشاهده تک باند بر روی ژل آگارز صحت تکثیر را تایید کرد (شکل‌های ٨ و ٩). آبسیزیک اسید به‌عنوان هورمون استرس شناخته می‌شود و در پاسخ به تنش‌های مختلف به‌عنوان واسطه مرکزی عمل می‌کند.

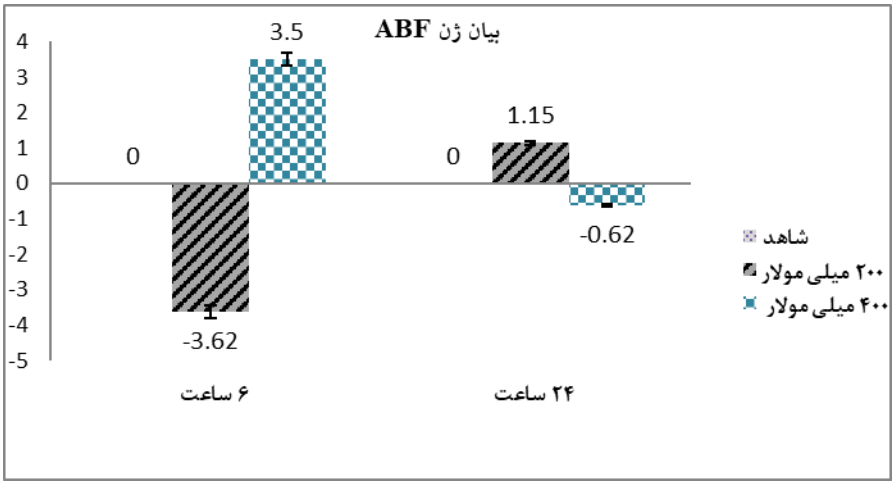
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۵- RNAهای استخراج شده از نمونه‌های برگی گیاه الوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری کلرید سدیم

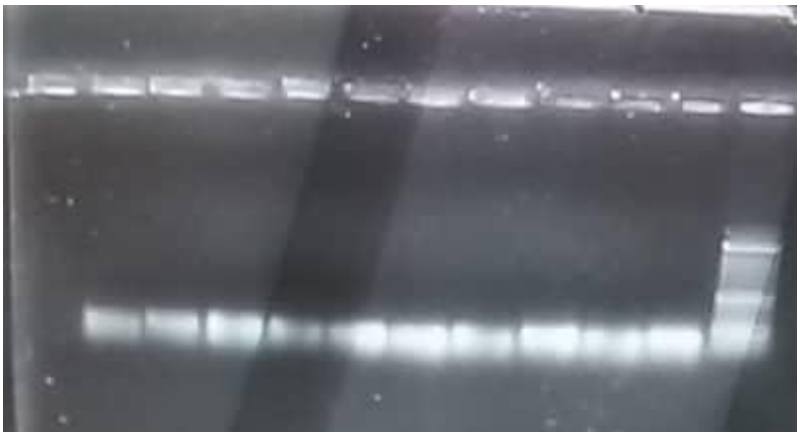


شکل ٦- بیان نسبی ژن *PYL* درگیر در مسیر سیگنالینگ آبسیزیک اسید ٦ و ٢٤ ساعت پس از اعمال غلظت‌های ۰، ۲۰۰، ٤۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl. محور طولی: تیمارهای اعمال شده، محور عرضی: میزان تغییر بیان تیمارها نسبت به شاهد. سطح پایه (صفر) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. از ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

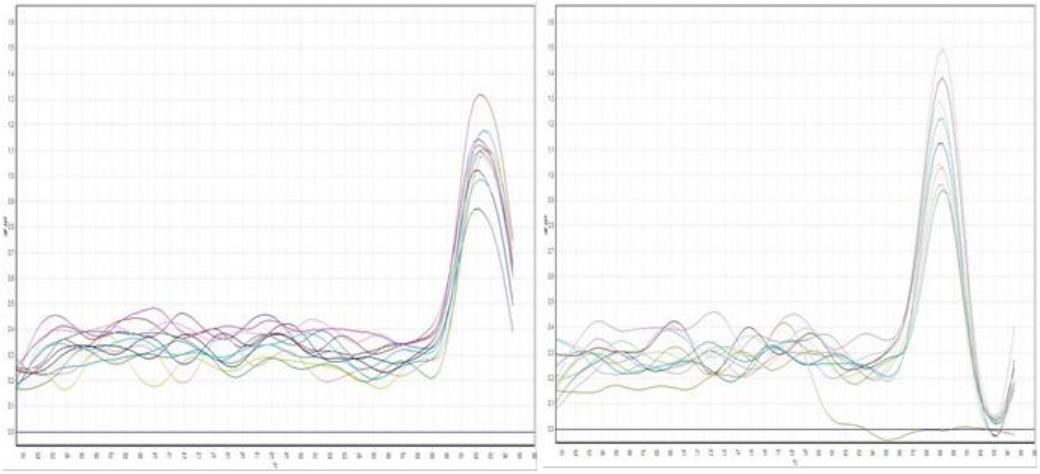


شکل ۷- بیان نسبی ژن *ABF* درگیر در مسیر سیگنالینگ آبسیزیک اسید ٦ و ٢٤ ساعت پس ازاعمال غلظت‌های ۰، ۲۰۰، ٤۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl. محور طولی: تیمارهای اعمال شده، محور عرضی: میزان تغییر بیان نسبت به شاهد .سطح پایه (صفر) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. از ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۸- محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای تأیید صحت و دقت آغازگرهای. نشانگر وزن مولکولی #SM1153



شکل ۹- آنالیز منحنی ذوب محصولات واکنش ژن *PYL* (سمت راست) و *ABF* (سمت چپ)

براساس مدل پایه مسیر سیگنالینگ آبسیزیک اسید، با افزایش سطح هورمون آبسیزیک اسید، مجموعه‌ی PYL/ ABA تشکیل شده و فعالیت پروتئین PP2Cs را متوقف می‌کند. PP2C تنظیم‌کننده منفی و کلیدی مسیر پیام‌رسانی آبسیزیک اسید محسوب می‌شود که با توقف فعالیت این پروتئین فعالیت پروتئین SnRK تحریک می‌شود. SnRKs با فسفریلاسیون ژن‌های پایین دستی از قبیل فاکتورهای رونویسی مثل ABFs بیان آن‌ها را تنظیم میکنند. اعضای ABF به خانوده فاکتورهای رونویسی Bzip تعلق دارند. نتایج این پژوهش نشان داد که در مسیر سیگنالینگ هورمون آبسیزیک اسید بیان ژن مربوط به گیرنده آبسیزیک PYL در هر دو زمان ٦ و ٢٤ ساعت روند معنی‌دار کاهشی را نشان می‌دهد. با توجه به مدل سیگنالینگ ABA که شرح داده شد، انتظار می‌رود که افزایش سطح هورمون آبسیزیک اسید منجر به افزایش بیان گیرنده‌های آن یعنی PYL شود (Dark et al. 2009).

نتایج مطالعات قبلی در بعضی از گونه‌ها مانند آرابیدوپسیس و ذرت با این الگو کاملاً تطابق دارد و نشان داده شده است بیان ژن *PYL* بلافاصله پس از درک سیگنال‌های تنش افزایش یافت تا تغییرات در سطح هورمون ابسیزیک اسید حس شود. اما نتایج این پژوهش و برخی از مطالعات قبلی در زمان‌های طولانی‌تر با مکانیسم شرح شده در بالا مطابقت ندارد (۳۳). گزارش شده است که در دو گونه رز چینی بیان ژن *PYL* در پاسخ به تنش شوری در زمان‌های مختلف (یک تا ۹ روز) روندی کاملاً کاهشی را نشان می‌دهد. همچنین (Chan et al. 2012) با مقایسه الگوی بیان ژن‌ها تحت تیمار شوری و استفاده از هورمون آبسیزیک اسید، نتایج مشابهی را گزارش کردند، آن‌ها اظهار داشتند که تعامل بین PP2C و PYL به افزایش بیان هر دو ژن نیاز ندارد و تنها افزایش نسبتPP2Cs: PYL می‌تواند مسیر پیام‌رسانی پایین دستی آبسیزیکاسید را تحریک کند (Chan et al. 2012). علاوه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

براین ارزیابی بیان اعضای مختلف خانواده ژنیPYL در گیاه *S. viridis* (ژنوتیپ A10.1) پس از گذشت ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت تنش شوری کاهش بیان را نشان داد (Duart et al. 2019). بنابراین می‌توان اظهار داشت، رفتار غیرقابل انتظار گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس در مسیر سیگنالینگ آبسیزیک اسید نیاز به ارزیابی بسیار بیشتر دارد. اما توجیح در دسترس‌تر در این زمینه این است که زمان نمونه‌گیری عنصر مهمی در میزان بیان ژن می‌باشد و احتمال این که درک تنش و دریافت سیگنال به‌وسیله PYL در زمان‌های کوتاه‌تر اتفاق بیفتد محتمل‌تر است. نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن *ABF* روند افزایشی را با افزایش زمان و غلظت تنش نشان می‌دهد. با توجه به اینکه فاکتور رونویسی تحریک کننده بیان ژن‌های عملکردی پایین دستی پاسخ دهنده به تنش هستند، بنابراین نقش تنظیمی آن توجیه کننده روند افزایشی بیان این ژن است. (Tian et al. 2018) گزارش روند افزایش بیان ژن *ABF* در پاسخ به تنش شوری در دو گونه رز چینی گزارش کردند. با توجه به اینکه در غلظت ٤٠٠ میلی‌مولار و زمان اولیه ٦ ساعت، بیشترین بیان این ژن مشاهده شد و در زمان ٢٤ ساعت میزان بیان کاهش یافت و در مقابل در غلظت ٢٠٠ میلی‌مولار در زمان ٦ ساعت هیچ تغییری معنی‌داری مشاهده نشد ولی با افزایش شدت تنش به ٤٠٠ میلی‌مولار یان افزایشی مشاهده شد. براین اساس می‌توان اظهار داشت که هر دو ژن مورد برررسی نقش تنظیمی دارند و با توجه به‌شدت تنش در مقاطعی از زمان بیان شان افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش برخی از پاسخ‌های فیزیولوژیک و مولکولی گیاه الوروپوس لیتورالیس به تنش شوری در زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دو اسمولیت پرولین و قند محلول نقش به‌سزایی در پاسخ اسمزی این گیاه در ساعت‌های اولیه اعمال تنش ایفا می‌کنند. همچنین مسیر سیگنالینگ هورمون آبسیزیک اسید با الگویی کمی غیرقابل انتظار تحت تاثیر تنش شوری قرار گرفت و رفتار بیانی ژن *PYL* کاهشی و رفتار ژن *ABF* افزایشی گزارش شده است. براین اساس می‌توان اظهار داشت که تنش شوری بسیاری از جوانب فیزیولوژیک و مولکولی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد، شدت تنش که می‌تواند معلول دو عامل زمان و غلظت تنش باشد بر پاسخ گیاه به‌خصوص در سطح مولکولی تأثیر گذار است. برای رسیدن به پاسخ سوالات زیادی وجود دارد بررسی‌ها و ارزیابی‌های دقیق‌تر نیاز است.

منابع

Bates LS (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39:205-207.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.

Chan, Z (2012) Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. Genomics 100:110-115.

Chen TH, N Murata (2011) Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. Plant Cell Environ 34:1-20.

Cherifi KA, Haddioui ME, Hansali, EH Boufous (2016) Growth and proline content in NaCl stressed plants of annual medic species. arXiv preprint arXiv 1609.07140

Chotechuen, S (2001) Responses of rice(*Oryza sativa L.*) to salt stress. Proceeding of the Rice Research Seminar, 34-76. March, SraKaew, Thailand.

Duarte KE, WR de Souza, TR Santiago BL, Sampaio AP Ribeiro MG, Cotta et al. and HBC. Molinari (2019) Identification and characterization of core abscisic acid (ABA) signaling components and their gene expression profile in response to abiotic stresses in Setaria viridis. Scientific reports 9: 1-16.

Evelin H, TS Devi, S Gupta, R Kapoor (2019) Mitigation of salinity stress in plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis: current understanding and new challenges. Frontiers in Plant Science 10.

Fan P, L Nie, P Jiang, J Feng, S Lv, X Chen, et al. and W Jia (2013) Transcriptome analysis of Salicornia europaea under saline conditions revealed the adaptive primary metabolic pathways as early events to facilitate salt adaptation. PLoS One 8(11).

FAO (2013) http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/RL/*/E Flowers T.J (2004) Improving crop salt tolerance Journal of Experimental Botany 55:307-319.

Garg N and A Bharti (2018) Salicylic acid improves arbuscular mycorrhizal symbiosis, and chickpea growth and yield by modulating carbohydrate metabolism under salt stress. Mycorrhiza 28 727-746

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Gharsallah C, H Fakhfakh, D Grubb and F Gorsane (2016) Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. AoB Plants 8.

Gulzar S and MA Khan (2001) Seed germination of a halophytic grass Aeluropus logopoidesAnnals of Botany 87:319-324

Heidari M, and P Jamshidi (2011) Effects of salinity and potassium application on antioxidant enzyme activities and physiological parameters in pearl millet. Agricultural sciences in China 10: 228-237.

Inan G, Q Zhang, P Li, Z Wang, Z Cao, H Zhang, et al. and H Shi (2014) Salt cress. A halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. Plant physiology 135:1718-1737.

KARAKAŞ S, MA Cullu and M DİKİLİTAŞ (2017) Comparison of two halophyte species (Salsola soda and Portulaca oleracea) for salt removal potential under different soil salinity conditions. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 41:183-190.

Kaur, G. and B. Asthir (2015) Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. Biol. Plant 59:609–619.

Kerepsi I, G Galiba (2000) Osmotic and salt stress induced alternation in soluble carbohydrate content in wheat seedling. Crop Science 40:482-487.

Livak KJ and TD Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta CT$ method. methods 25:402-408.

Lokhande, V.H., A.K. Srivastava, S. Srivastava, T.D. Nikam, and P. Suprasanna (2011) Regulated alterations in redox and energetic status are the key mediators of salinity tolerance in the halophyte Sesuvium portulacastrum (L.) L. Plant Growth Regulation 65:287.

Mascellani A, Natali L, Cavallini A, Mascagni F, Caruso G, Gucci R, ... Bernardi R (2021) Moderate salinity stress affects expression of main sugar metabolism and transport genes and soluble carbohydrate content in ripe fig fruits (Ficus carica L. cv. Dottato). Plants 10:1861.

Mishra A, Tanna B (2017) Halophytes: potential resources for salt stress tolerance genes and promoters. Frontiers in plant Science 8:829.

Muchate NS, Rajurkar NS, Suprasanna P, Nikam TD (2019) NaCl induced salt adaptive changes and enhanced accumulation of 20-hydroxyecdysone in the in vitro shoot cultures of Spinacia oleracea (L.). Scientific reports 9:1-10.

Parvaiz A and S Satyawati (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. Plant Soil Environment. 54 89-99.

Peng J, J Liu, L Zhang, J Luo, H Dong, Y Ma, et al. (2016) Effects of soil salinity on sucrose metabolism in cotton leaves. PLoS One 11:e0156241. 10.1371/journal.pone.0156241

Rahneshan Z, F Nasibi and AA Moghadam (2018) Effects of salinity stress on some growth, physiological, biochemical parameters and nutrients in two pistachio (Pistacia vera L.) rootstocks. Journal of Plant Interactions 13:73-82.

Song X, Yu X, Hori C, Demura T, Ohtani M, Zhuge Q (2016) Heterologous overexpression of poplar SnRK2 genes enhanced salt stress tolerance in Arabidopsis thaliana. Frontiers in plant science 7:612

Sohrabi N, A Tajabadipour, N Motamed and M Seyedi (2011) A change in leaves protein pattern of some pistachio cultivars under salinity condition. International Journal of Nuts and Related Sciences (IJNRS) 2:67-74.

Tian X, Z Wang, Q Zhang, H Ci, P Wang, L Yu and G Jia (2018) Genome-wide transcriptome analysis of the salt stress tolerance mechanism in Rosa chinensis. PloS one 13.

Torbati-nejad NM, H Maghsud-Lorad and AM Gharebash (2001) Determination of feed value of two spescies of Aeluropus logopoides and Aeluropus littoralis in sheep. Journal Agriculture Science Natural Resource 7:31-45.

Verma RK, Santosh Kumar VV, Yadav SK, Pushkar S, Rao MV, Chinnusamy V (2019) Overexpression of ABA receptor PYL10 gene confers drought and cold tolerance to indica rice. Frontiers in plant science 10:1488.

Verslues PE and S Sharma (2010) Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists 8.

Yadav SK, Kumar VVS, Verma RK, Yadav P, Saroha A, Wankhede DP, ... Chinnusamy V (2020) Genome-wide identification and characterization of ABA receptor PYL gene family in rice. BMC genomics 21:1-27.

Yemm EW and A Willis (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical journal 57:508.

Yildiz M, Poyraz İ, Çavdar A, Özgen Y, Beyaz R (2020) Plant Responses to Salt Stress. Plant Breeding-Current and Future Views.

Younesi-Melerdi E, Gh Nematzadeh and E Shokri (2017) Physiological evaluation, isolation and gene expression investigation of NADP-malic enzyme undersalinity stress in Aeluropus littoralis. Journal of Genetics 12:463- 476.

Younesi-Melerdi E, GA Nematzadeh, A Pakdin-Parizi, MR Bakhtiarizadeh and SA Motahari (2020) De novo RNA sequencing analysis of Aeluropus littoralis halophyte plant under salinity stress. Scientific Reports 10:1-14

Zou YN, CY Liang, QS Wu (2013) Mycorrhizal and non-mycorrhizal responses to salt stress in trifoliate orange: plant growth, root architecture and soluble sugar accumulation. nternational Journal of Agricultural and Biology 15:565-569.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]