دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

مطالعه بیان ژن‌های SOS در ریشه جو موتانت تحت تنش شوری

ساره یوسفی‌راد[۱]، حسن سلطانلو[۲]، سیده ساناز رمضانپور[۲] و خلیل زینلی‌نژاد[۳]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: Sareh.yousefirad@yahoo.com)
۲ و ۳- دانشیار و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۲۲
صفحه: ۱ تا ۸

چکیده

شوری خاک یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش‌دهنده عملکرد محصولات کشاورزی می‌باشد. انتقال پیام SOS یکی از مهم‌ترین مسیرهای تنظیم هموستازی یونی و از سازوکارهای مهم مقاومت گیاهان در برابر استرس‌های محیطی از جمله تنش شوری می‌باشد. با توجه به اینکه ریشه اولین اندام از گیاه در معرض شوری است، لذا نقش ژن‌های دخیل در این مسیر و ارتباط آن با تحمل شوری بین دو ژنوتیپ موتانت جو "73-M4-30" و ژنوتیپ زرجو به‌عنوان والد مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق الگوی بیان ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS2* (*CIPK24*) و *HvSOS3* (*CBL4*) تحت غلظت شوری ۳۰۰ میلی‌مولار و زمان‌های صفر (کنترل)، ۳، ٦، ۱۲، ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت بین دو ژنوتیپ بررسی شد. تجزیه RT-PCR کمی نشان داد که تحت تنش شوری، سطوح بیان این سه ژن در اندام ریشه ژنوتیپ موتانت متحمل به شوری در مقایسه با رقم والد آن در زمان اولیه ٦ ساعت بسیار بیشتر و قوی‌تر بود. بیان بالای همزمان این سه ژن در اندام ریشه ژنوتیپ موتانت بیانگر فعالیت آنتی‌پورتر Na^+/H^+ و خروج Na^+ به فضای آپوپلاستی یا انتقال آن از ریشه به اندام هوایی می‌باشد. عدم شباهت در الگوی بیان ژن‌های SOS بین دو ژنوتیپ موتانت متحمل به شوری و والد وحشی نشان می‌دهد که جهش می‌تواند باعث تغییر توانایی ژنوتیپ موتانت جو متحمل در به‌کارگیری هومئوستازی یونی برای پاسخ به تنش شوری شود.

واژه‌های کلیدی: ***Hodeum vulgare*، RT-PCR کمی، مرحله جوانه‌زنی**

مقدمه

در ایران، جو بعد از گندم مهم ترین گیاه زراعی محسوب می‌شود که سطح زیر کشت آن در ایران در حدود ۸ میلیون هکتار است. تنش شوری به خصوص در نواحی خشک و نیمه خشک یک مساله مهم برای تولید گیاهان زراعی می‌باشد و تقریبا ۲۰ درصد زمین‌های زراعی دنیا تحت تاثیر شوری می‌باشد (۲۲،۳۰). مساحت اراضی شور در ایران در حدود ۲۴ میلیون هکتار است که معادل ۱۵ درصد از اراضی کشور است (۲۳). اهمیت بهره‌گیری از این اراضی درتولید محصول ایجاب می‌کند تا اقداماتی که در زمینه معرفی ارقام متحمل یا مقاوم به شوری صورت گیرد. جو در مقایسه با گندم، نسبت به شوری متحمل‌تر است و در بین غلات دانه ریز و به‌طور کلی در بین گیاهان گلیکوفیت متحمل‌ترین گیاه در برابر شوری با سطح تحمل ۸ دسی‌زیمنس بر متر می‌باشد. بخش عمده‌ای از تحمل به شوری در نتیجه‌ی عملکرد ژن‌هایی است که سرعت جذب نمک از خاک و انتقال آن به سراسر گیاه را محدود کرده و تعادل اسمزی و یونی را در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی برقرار می‌کنند و در نتیجه منجر به تنظیم محیط سلولی و تحمل گیاه شوند (۲۳،۵). تاکنون چندین ترانسپورتر یون سدیم شناسایی شده است که نقش بسیار مهمی در زمان تنش شوری ایفا می‌کند (۱۱،۱). تنظیم هموستازی یونی در درون سلول یکی از جنبه‌های مهم فیزیولوژی سلول‌های زنده در مقاومت به تنش شوری محسوب می‌شود که توسط مسیر سیگنالینگ SOS[۱] (فوق حساسیت به شوری) انجام می‌شود. این مسیر یکی از مسیرهای بیوشیمیایی اختصاصی در تنش شوری است که شامل سه ژن اصلی *SOS1*، *SOS2*، *SOS3* می‌باشد. ژن *SOS1* از گیاهان حساس به شوری نظیر برنج (*OsNHA1* و *OsSOS1*) (۳۹،۲۱)، گندم نانوایی (*TaSOS1*) (۳۶)، *Phragmites australis* (*PhaNHA1-u*) (۳۴) و همچنین گیاهان مقاوم به شوری نظیر *Thellungiella halophile* (*ThSOS1*) (۲۵)، *Cymodocea nodosa* (*CnSOS1A* و *CnSOS1B*) (۳)، *Chenopodium quinoa* (*cqSOS1A* و *cqSOS1B*) (۲۰)، *Phragmites australis* (*PhaNHA1-n*) (۳۴) شناسایی شده است (۴). ژن *SOS3* یکی از ژن‌های کلیدی در این مسیر تنظیمی بوده که باعث فعال‌سازی این مسیر می‌شود. در مسیر SOS پروتئین متصل شونده به کلسیم یا SOS3 سیگنال تنش شوری را دریافت و منتقل می‌نماید. SOS3 پروتئین SOS2 را فعال نموده و به سمت غشای پلاسمایی هدایت می‌نماید تا فسفریلاسیون SOS1 توسط کمپلکس SOS2–SOS3 فراهم شود (۴۰،۲۸). ژن *SOS1* کدکننده یک آنتی‌پورتر پروتون/سدیم واقع در غشای پلاسمایی است که نقش مهمی را در انتقال سدیم به نواحی آپوپلاست سلول و یا انتقال سدیم از ریشه به اندام هوایی از طریق سیستم آوندی بازی می‌کند (۳۶،۳۳،۳۱). تاکنون مطالعات زیادی در مورد SOS3 از جمله بررسی تاثیر بیان همزمان ژن‌های مسیر SOS (SOS1-3) در افزایش تحمل گیاه نسبت به شوری انجام شده است (۳۷). شناسایی مسیرهای مولکولی و همچنین مولکول‌های واسط که در انتقال و پردازش تنش در گیاهان نقش دارند، بسیار مهم و پایه‌ای است. برهمکنش بین چندین شبکهٔ پیچیدهٔ انتقال سیگنال در گیاهان، باعث ظهور مقاومت به تنش شوری می‌شود (۴۰). فرآیند سیگنال‌دهی در گیاهان به اجزا و روش‌های متفاوتی در گیاهان انجام می‌شود (۳۷).

در میان روش‌های اندازه‌گیری بیان ژن، quantitative real time-PCR یک فن‌آوری با حساسیت بالا، تکرارپذیر و انعطاف‌پذیر می‌باشد که می‌تواند سطوح mRNA را در

1- Salt overly sensitive

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]
[DOI: 10.29252/jcb.11.29.1]

نمونه‌های مختلف مقایسه کند و الگوی بیان mRNA را توصیف کند و حتی mRNAهای مشابه و نزدیک به هم را از هم تشخیص دهد. در این تحقیق، از این روش جهت تعیین تغییرات الگوی بیان ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS2* (*CIPK24*) و *HvSOS3* (*CBL4*) در زمان‌های اولیه و طولانی مدت تحت تنش شوری بین دو ژنوتیپ موتانت جو "73-M4-30" و ژنوتیپ زرجو به‌عنوان رقم والد آن استفاده شد. با توجه به معرفی رقم جو موتانت مورد استفاده در این تحقیق تحت عنوان رقم رودشت و معرفی آن به کشاورزان پس از آزمایشات مقدماتی و نهایی عملکرد، بدیهی است شناخت چگونگی سازوکارهای مولکولی دخیل در افزایش تحمل به شوری ایجاد شده در این رقم موتانت می‌تواند در آینده، اطلاعات مفیدی برای اصلاح ارقام متحمل به شوری در جو ارائه نماید.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان و اعمال تیمار تنش شوری

در این بررسی بذرهای ژنوتیپ موتانت جو "73-M4-30" متحمل به تنش شوری و ژنوتیپ زرجو به‌عنوان والد از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. این لاین موتانت با پرتودهی گاما ساطع شده از منبع کبالت ۶۰ ایجاد شده و در ارزیابی‌های مزرعه‌ای به‌عنوان ژنوتیپ متحمل به شوری شناسایی و با نام تجاری رودشت آزاد شده است (۱۶). بذور یک‌نواختی از هر دو ژنوتیپ جهت کاشت و اعمال تنش شوری در دو مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای انتخاب شدند. برای داشتن گیاهچه‌های عاری از هرگونه آلودگی، ابتدا بذور گیاهان به مدت هفت دقیقه در هیپوکلریدسدیم یک درصد ضدعفونی گشته و سپس ۵ بار با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس در ظروف پتری اتوکلاو شده بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. به هر ظرف پتری سه میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. سپس ظروف در شرایط تاریک انکوباتور به مدت چهار روز در دمای ۲۲±۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بذرهای جوانه‌زده یکنواخت به محلول غذایی هوگلند (۱۴) منتقل گردیدند. محلول غذایی هر سه روز یک بار تعویض و pH آن‌ها با استفاده از هیدروکسید پتاسیم (KOH) بین ۵/۵ تا ۶/۵ تنظیم شد. ریشه گیاهچه‌های ۱۰ روزه یکنواخت در مرحله گیاهچه‌ای (دو برگی) بعد از اعمال تنش شوری در غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم انتخاب شدند. کلرید کلسیم ($CaCl_2$) برای حفظ نسبت ۱۰به ۱ سدیم به کلسیم به محلول همراه کلرید سدیم اضافه شد. نمونه‌های ریشه در زمان قبل از اعمال تنش شوری (زمان کنترل یعنی صفر ساعت) و ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تنش شوری در ۳ تکرار به طور تصادفی برداشت شدند و سپس در ازت مایع منجمد و جهت نگهداری به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (۱۶).

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل از اندام‌های ریشه (به میزان ۷۰ میلی‌گرم از هر نمونه) هر دو ژنوتیپ موتانت و والد آن در مرحله گیاهچه‌ای (دو برگی)، با استفاده از بافر پی‌بایوزول (p-Biozol Buffer) بر اساس دستورالعمل شرکت (BioFlux, Japan) استخراج شد (۱۶). جهت تعیین کیفیت، RNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی DNA توسط آنزیم *DNase* I تیمار شدند. برای سنتز cDNA طبق پروتکل پیشنهادی شرکت فرمنتاز از آغازگرهای اولیگودی تی، آب دپس و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. پس از اضافه کردن مخلوط واکنش (شامل ۴ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر RNase inhibitor و ۱/۵ میکرولیتر آب دپس)، در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس بعد از اضافه کردن آنزیم رونوشت بردار معکوس، در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و در نهایت جهت جلوگیری از انجام واکنش‌ها، در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد.

بررسی cDNA و آغازگرهای مورد مطالعه

جهت به دست آوردن دمای بهینه آغازگرها برای واکنش qRT-PCR و بررسی cDNA، از دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره پلیمراز محلول واکنش طبق جدول ۱ فراهم شد و همه آغازگرها در این مرحله مورد بررسی قرار گرفتند. چرخه دمایی واکنش PCR طبق جدول ۲ انجام گرفت و محصول تکثیر واکنش توسط ژل آگارز ۱ درصد مورد آزمایش قرار گرفت.

جدول ۱- ترکیبات جهت واکنش PCR بررسی cDNA و آغازگرهای مورد مطالعه

Table 1. The component of PCR for checking cDNA and primers studied

نوع ماده	مقدار
بافر واکنش (10X)[1]	۱ میکرولیتر
dNTP[2] (10 میکرومولار)	۰/۲ میکرولیتر
$MgCl_2$[3] (50 میلی مولار)	۰/۸ میکرولیتر
آغازگر پیشرو[4] (10 میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر پسرو[5] (10 میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
آنزیم تگ پلیمراز[6]	۱ میکرولیتر
cDNA[7]	۲ میکرولیتر
آب دیونیزه دو بار تقطیر[8]	تا حجم ۱۰ میکرولیتر

1- PCR Buffer (10X) 2- Deoxynucleotide 3- Magnesium chloride 4- Forward
5- Reverse 6- *Taq polymerase* 7- Complementary DNA 8- ddH_2O

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.1]

جدول ۲- تعداد و مشخصات چرخه حرارتی واکنش PCR

Table 2. The number and description of thermal cycle of PCR

مرحله	تعداد چرخه (دور)	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
واسرشت‌سازی[1]	۱	۹۵	۳۰۰
واسرشت‌سازی		۹۵	۱۰
اتصال[2]	۴۰	۶۰-۵۸	۲۰
تکثیر[3]		۷۲	۱۰
تکثیر نهایی[4]	۱	۷۲	۳۰۰

طراحی آغازگر و تجزیه کمی Quantitative Real-Time PCR

جهت ارزیابی و مقایسه اثر شوری بر روی الگوی بیان ژن‌های HvSOS1، HvSOS2 (CIPK24) و HvSOS3 (CBL4) در بافت‌های ریشه دو ژنوتیپ موتانت متحمل به شوری و رقم والد، تکنیک RT-PCR کمی مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات و توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی و همچنین ژن خانه‌دار α-توبولین به‌عنوان رفرنس در جدول ۳ نشان داده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی برای هر آغازگر در دستگاه iCycler (شرکت بیورد، آمریکا) و با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green به‌عنوان رنگ فلورسنس برای ارزیابی کمی انجام گردید. آزمون ارزیابی‌های کمی با ۳ تکرار تکنیکی انجام شد تا صحت و دقت نتایج تائید گردید. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش، شامل ۹/۹ میکرولیتر مخلوط SYBR Green، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی رفت (پیشرو[5]) و برگشت (پسرو[6]) با غلظت ۱۰ میکرومول، ۰/۵ میکرولیتر DMSO، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز[7] و ۳ میکرولیتر نمونه cDNA مورد بررسی بود. جهت انجام Real-Time PCR از چرخه حرارتی که در جدول ۴ نشان داده شده است، استفاده گردید. الگوی بیان ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS2* (*CIPK24*) و *HvSOS3* (*CBL4*) با استفاده از نرم‌افزار REST و فرمول روش مقایسه‌ای ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Ct و ژن خانه‌دار α-توبولین به‌عنوان ژن مرجع، میزان تغییر بیان ژن اصلی نسبت به شاهد، مورد بررسی قرار گرفت

جدول ۳- اسامی و مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد مطالعه

Table 3. Names and description of the studied specific primers

ژن رمزکننده[8]	نام آغازگر[9]	توالی آغازگر[10]	دمای ذوب[11] (C°)	درصد بازهای G و C[12]	Accession NO
HvSOS1	رفت[13]	5′-GGCACCAACAGGAAGATGAA-3′	۵۷/۱	۵۰	AB089197
	برگشت[14]	5′-GATATGCAGGAGGCCAGAGA-3′	۵۷/۷	۵۵	
HvCIPK24 (*HvSOS2*)	رفت	5′-ATGCCCAGATTGGTTCTCTC-3′	۵۶/۳	۵۰	JN655679
	برگشت	5′-CACCACGTCTAAGGGCTACA-3′	۵۸/۱	۵۰	
HvCBL4 (*HvSOS3*)	رفت	5′-GCTGCACCTCGAAAATCC-3′	۵۵/۶	۵۵/۶	HM175881
	برگشت	5′-AAACCGCTCGTCACTGCT-3′	۵۸/۶	۵۵/۶	
α-tubulin	رفت	5′-AGTGTCCTGTCCACCCACTC-3′	۶۰/۱	۵۰	U40042
	برگشت	5′- ATTCAGAGCACCGTCAAACC-3′	۵۷/۵	۵۰	

جدول ۴- چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

Table 4. The thermal cycle of qRT-PCR

تعداد چرخه[15]	مرحله[16]	زمان[17]	دما (درجه سانتی‌گراد)[18]
۱	واسرشت[19]	۳۰۰ ثانیه	۹۵
	واسرشت	۱۰ ثانیه	۹۵
۴۰	اتصال[20]	۱۰ ثانیه	۶۰
	تکثیر[21]	۲۰ ثانیه	۷۲
۱	تکثیر نهایی[22]	۳۰۰	۷۲
۸۱	ذوب[23]	۱۰ ثانیه	۵۵-۵۹

نتایج و بحث

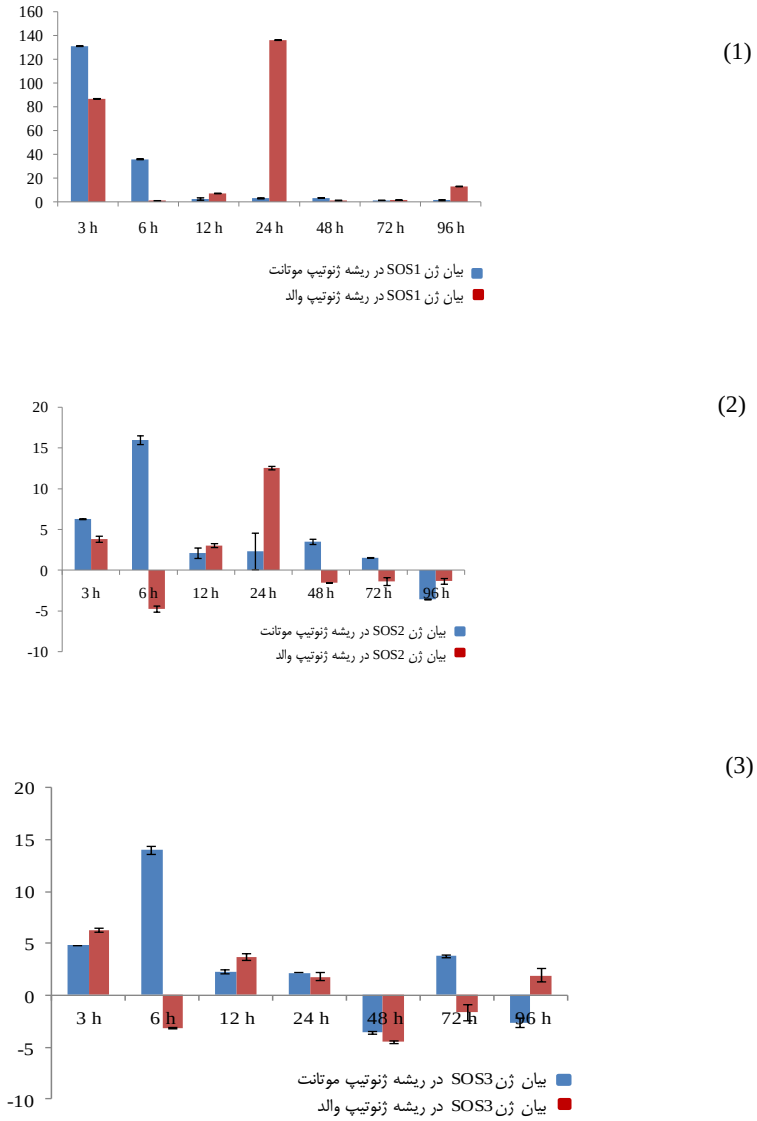
نتایج این تحقیق نشان داد که بعد اعمال شوری (۳۰۰ میلی‌مولار)، سطوح بیان ژن *HvSOS3* در اندام ریشه ژنوتیپ موتانت متحمل به شوری در مقایسه با قبل از اعمال تنش شوری (زمان کنترل یعنی صفر ساعت)، در مدت زمان اولیه ۳ ساعت بعد از تنش افزایش یافت و تا ۶ ساعت به حداکثر مقدار خود (حدود ۱۵ برابر) رسید ولی بعد از آن کاهش بیان تا ۹۶ ساعت مشاهده شد. در حالی که حداکثر بیان این ژن در بافت ریشه رقم والد در مقایسه با کنترل در زمان ۳ ساعت بود (حدود ۶ برابر) و بعد از آن کاهش نسبی تا ۹۶ ساعت مشاهده

1- Denaturation 2- Annealing 3- Extension 4- Final extension 5- Forward 6- Reverse 7- *Taq polymerase* 8- Name of genes 9- Name of primer 10- Sequence of primer 11- Melting temperature 12- Percentage of GC-content 13- Forward 14- Reverse 15- Number of cycle 16- Step 17- Time 18- Temperature 19- Denaturation 20- Annealing 21- Extension 22- Final extension 23- Melting

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.1]

گردید (شکل ۱، الف). بالا رفتن سطوح بیان ژن *HvSOS2* در بافت ریشه هر دو ژنوتیپ در مقایسه با گیاهان کنترل، تقریبا مشابه با نمودار بیان ژن *HvSOS3* بود که بیانگر این است پروتئین SOS3 بعد از فعال شدن و اتصال به پروتئین SOS2، باعث دایمر شدن و در نتیجه افزایش فعالیت پروتئین SOS2 می‌شود (۹،۲۶،۲۴). هرچند یک افزایش ناگهانی حدود ۱۲ برابر بیان پس از ۲۴ ساعت از اعمال تنش در رقم والد مشاهده شد که می‌تواند به علت ورود بیشتر Na^+ به داخل سیتوپلاسم نسبت به خروج آن (عدم تعادل هموستازی یونی) توسط *HvSOS1* باشد که باعث القای بالای *HvSOS2* و در نتیجه *HvSOS1* در ۲۴ ساعت پس از تنش می‌شود (شکل ۱، ب) (۱۶). همان طور که در شکل ۱، ج مشاهده می‌شود تحت تنش شوری، افزایش القای بیان ژن *HvSOS1* در ریشه ژنوتیپ موتانت متحمل به شوری نسبت به کنترل، مشابه با ژن‌های *HvSOS2* و *HvSOS3* در ساعات اولیه ۳ ساعت (۱۳۰ برابر) و ۶ ساعت (۴۰ برابر) بود.



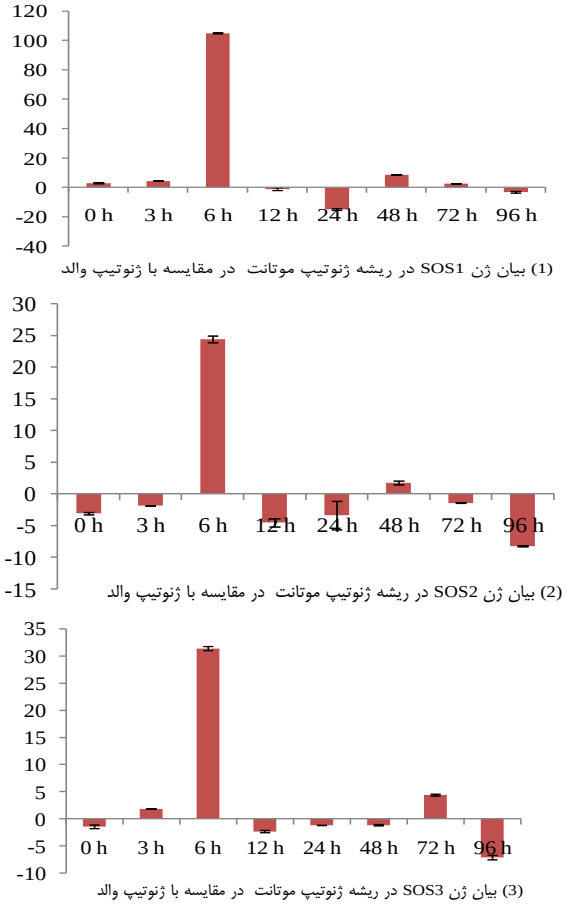
شکل ۱- الگوی بیان ژن‌های *HvSOS1*، ۲) *HvSOS2* (*CIPK24*) و ۳) *HvSOS3* (*CBL4*) در اندام ریشه هر دو ژنوتیپ موتانت متحمل به شوری و رقم والد تحت شوری ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl و زمان‌های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از اعمال تنش شوری در مقایسه با زمان کنترل (صفر ساعت)

Figure 1. The pattern of genes expression of *HvSOS1*, 2) *HvSOS2* (*CIPK24*) and 3) *HvSOS3* (*CBL4*) in roots of both salt tolerant mutant genotypes and the parent genotype under the 300 mM salinity and different times of 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours after NaCl treatment stress compared with control time (zero hour)

گرچه در مقایسه با ۳ ساعت میزان بیان تا ۶ ساعت کاهش یافت ولی در مقایسه با زمان صفر تا ۴۰ برابر افزایش بیان مشاهده شد. از طرف دیگر، افزایش القای بیان ژن *HvSOS1* در ریشه رقم والد مانند بیان ژن *HvSOS2* دارای حداکثر میزان بیان را در ۳ ساعت و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش شوری بود که نشان می‌دهد افزایش کمپلکس پروتئینی

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]
[DOI: 10.29252/jcb.11.29.1]

SOS3/SOS2 باعث فسفریله شدن و فعالیت بیشتر آنتی‌پورتر Na^+/H^+ (SOS1) واقع در غشای پلاسمایی سلول می‌شود (۳۲،۲۰). در تحقیقی که بر روی بیان ژن *TaSOS1* در گندم انجام شد، نشان داده شد که القای این ژن در ریشه بعد از ۳ ساعت اعمال تنش ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl به حداکثر مقدار خود رسید (۳۶). بنابراین فعال شدن SOS1، موجب خروج Na^+ از سیتوپلاسم به محیط آپوپلاست سلول (۱۰،۲۹،۳۱،۳۴) و همچنین انتقال آن از ریشه به قسمت‌های هوایی گیاه (۳۲،۳۴) می‌شود. همچنین پیشنهاد شده است که فعال شدن این ژن منجر به ایجاد تعادل اسمزی در درون سلول می‌شود (۱۹). با بررسی و مقایسه الگوی بیان ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS2* و *HvSOS3* بین دو ژنوتیپ همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، بیان این سه ژن در بافت ریشه ژنوتیپ موتانت متحمل به شوری در مقایسه با ژنوتیپ والد آن، بعد از ۶ ساعت قرار گرفتن در معرض تنش NaCl ۳۰۰ میلی‌مولار دارای افزایش بیشتری بودند که برای ژن‌های *HvSOS2* و *HvSOS3* تا بیش از ۲۳ برابر و برای *HvSOS1* حدود ۱۰۰ برابر بیشتر از ژنوتیپ والد مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه الگوی بیان ژن‌های *HvSOS1*، ب) *HvSOS2* (*CIPK24*) و ج) *HvSOS3* (*CBL4*) بین بافت‌های ریشه دو ژنوتیپ موتانت متحمل به شوری و والد تحت شوری ۳۰۰ میلی‌مولار در زمان‌های صفر (کنترل)، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از اعمال شوری

Figure 2. The pattern comparison of genes expression of *HvSOS1*, 2) *HvSOS2* (*CIPK24*) and 3) *HvSOS3* (*CBL4*) between the roots of tolerant mutant genotype to salinity and parent genotype under the salinity of 300 mM at different times of 0 (control) 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours after NaCl treatment stress

تحقیقات نشان داده است که افزایش در سطح بیان برخی ژن‌های دخیل در تحمل به شوری از جمله مسیر SOS منجر به بهبود مقاومت گیاه در تنش شوری شده است (۲). افزایش در سطح بیان ژن‌های تنظیمی مانند فاکتورهای رونویسی و پروتئین کینازها در مسیرهای پیام رسانی سلولی تحمل گیاه را نسبت به شوری افزایش داده است (۳۵). به‌طور کلی هم‌زمانی بیان بالای ژن‌های *HvSOS2* و *HvSOS3* با *HvSOS1* در ساعات اولیه تنش، در بافت ریشه هر دو ژنوتیپ نشان‌دهنده القای ژن *HvSOS3* بر روی دو ژن دیگر است. همان‌طور که در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است (۳۲). تحقیقات دیگر نیز نشان داده است که ژن *SOS3* که یک ژن مهم کلیدی در مسیر پیام‌رسانی SOS در پاسخ به تنش شوری است و فعالیت آن باعث به راه افتادن چندین مسیر پیام‌رسانی در پایین دست از جمله پروتئین‌های SOS2 و در نتیجه آنتی پورتر Na^+/H^+ یعنی SOS1 می‌شود. بنابراین بیان بیشینه ژن SOS3 می‌تواند توان گیاه را در تحمل به شوری تا حد

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]
[DOI: 10.29252/jcb.11.29.1]

زیادی بهبود بخشد (۱۷). اخیرا مشخص شده است که بیان بیشینه برخی از ژن‌های دخیل در مسیر تنظیمی SOS گیاه تنباکو نیز موجب افزایش مقاومت به شوری از طریق افزایش خروج یون‌های سدیم از سیتوزول می‌شود (۳). همچنین نتایج تحقیق بر روی گیاه مدل آرابیدوپسیس نشان داد که افزایش بیان ژن SOS3 در گیاه موجب بهبود تحمل به شوری می‌شود (۷،۸،۳۱). بنابراین در این تحقیق مشاهده شد که این سه ژن دخیل در تحمل به تنش شوری در هر دو ژنوتیپ موتانت متحمل و والد بیان می‌شوند، اما تفاوت در زمان و میزان بیان آنها می‌باشد. بیان بالای همزمان این سه ژن در اندام ریشه ژنوتیپ موتانت بیانگر فعالیت آنتی‌پورتر Na^+/H^+ و خروج Na^+ به فضای آپوپلاستی یا انتقال آن از ریشه به اندام هوایی می‌باشد. عدم شباهت در الگوی بیان بین دو ژنوتیپ نشان می‌دهد که جهش می‌تواند باعث تغییر توانایی ژنوتیپ موتانت متحمل به شوری در بکارگیری هومئوستازی یونی برای پاسخ به تنش شوری شود. ریشه‌ها اولین اندام گیاه هستند که آثار تنش شوری را تجربه می‌کنند و پس از آن اندام‌های هوایی تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرند. گزارش شده که ریشه‌ها در مواجه با تنش‌های مختلف محیطی، از جمله تنش‌های خشکی و شوری، نقش مهمی در بقا و عملکرد گیاهان زراعی ایفا می‌کنند (۱۵). هموستازی Na^+ و Cl^- به عبارتی خروج Na^+ از ریشه مهم‌ترین سازوکار کاهش تنش شوری در گیاهان عالی به شمار می‌رود. بنابراین سازوکار کاهش خسارت ناشی از تنش شوری، برای تعدادی از گیاهان در خاک‌های شور است. یکی از مسیرهای مهم در تنظیم هموستازی یون، مسیر تنظیمی SOS می‌باشد که شامل سه ژن اصلی SOS1، SOS2، SOS3 می‌باشد (۱۱،۱). با توجه به گسترش سریع زمین‌های شور در کشور، این مطالعه می‌تواند سرآغاز راهی برای اصلاح سایر گیاهان زراعی و مهم از نظر اقتصادی و کشاورزی در زمینه افزایش تحمل به شوری باشد. مکانیسم تحمل به شوری در گیاه، موضوع تحقیقی مهمی در زیست‌شناسی گیاهی و کشاورزی است. یکی از راه‌های مهم در جهت بهبود تحمل گیاه به تنش شوری، تولید گیاهان تراریخت از طریق انتقال ژن‌های جدید و یا افزایش در سطح بیان ژن‌هایی است که با تنش شوری القا می‌شوند و برای تحمل به تنش در حد معمولی ضروری هستند (۱۲). مسیر SOS یکی از مسیرهای مهم دفاعی گیاهی در برابر تنش شوری محسوب می‌شود. مطالعات زیادی برای انتقال این ژن‌ها به گیاهان حساس و در نتیجه ایجاد گیاهان مقاوم‌تر به تنش شوری انجام شده است. به‌عنوان مثال بیان بسیار بالای ژن‌های SOS1، SOS2، SOS3 باعث افزایش مقاومت به شوری در گیاهان ترانسژنیک آرابیدوپسیس (۶،۷،۳۷،۳۸) و گوجه فرنگی (۱۳) شد. گیاه جو می‌تواند به علت تنوع و سازگاری بالا به‌عنوان منبع ژن‌های مهم مقاومت به تنش‌ها از جمله شوری باشد ولی تاکنون انتقال مسیر ژنی SOS از گیاه جو به گیاهان دیگر محدود بوده است. بنابراین شناسایی پروتئین‌ها تاثیر فراوانی در توضیح دقیق مسیر SOS خواهد داشت که دیدگاه گسترده‌تری را برای پیشرفت استراتژی‌های موثر در مهندسی ژنتیک تولید گیاهان مقاومتر به شوری به وجود می‌آورد.

منابع

1. Apse, M.P. and E. Blumwald. 2007. Na+ transport in plants. FEBS Letters, 581: 2247-2254.
2. Chinnusamy, V., J. Zhu and J.K. Zhu. 2006. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. Genetic Engineering, 27: 141-177.
3. Garciadebla, B., H. Rosari and B. Benito. 2007. Cloning of two SOS1 transporters from the sea grass *Cymodocea nodosa*. SOS1 transporters from Cymodocea and Arabidopsis mediate potassium uptake in bacteria. Plant Molecular Biology, 63: 479-490.
4. Ghasemi Omran, V.O., A. Bagheri, G.A. Nematzadeh, A. Mirshamsi and N.A. Babaiian Jelodar. 2015. Isolation and Expression Analysis of Alsos1 Gene Under NaCl Stress in HalophyteGrass *Aeluropus Littoralis* Parl. Journal of Crop Breeding, 7(16): 60-69 (In Persian).
5. Greenway, H. and R. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Plant Molecular Biology, 31: 149-190.
6. Guo, Y., Q.S. Qiu, F.J. Quintero, J.M. Pardo, M. Ohta, C. Zhang, K.S. Schumaker and J.K. Zhu. 2004. Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement of its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in Arabidopsis. Plant Cell, 16: 435-449.
7. Guo, Y., U. Halfter, M. Ishitani and J.K. Zhu. 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. Plant Cell, 13: 1383-1400.
8. Guo, P., M. Baum, S. Grando, S. Ceccarelli, G. Bai, R. Li, M. Korff, R. Varshney, A. Graner and J. Valkoun. 2009. Differentially expressed genes between drought tolerant an drought sensitive barely genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. Journal of Experimental Botany, 60: 3531-3544.
9. Halfter, U., M. Ishitani and J.K. Zhu. 2000. The arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 97: 3735-3740.
10. Hasegawa, P.M. 2013. Sodium (Na+) homeostasis and salt tolerance of plants. Environmental and Experimental Botany, 92: 19-31.
11. Hauser, F. and T. Horie. 2010. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K+/Na+ ratio in leaves during salinity stress. PlantCell Environ, 33: 552-565.
12. Hayashi, H. and N. Murata. 1998. Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. Elsevier, Amsterdam, 133-148.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.1]

13. Huertas, R., R. Olıas, Z. Eljakaoui, F.J. Galvez, J. Li, P.A. De Morales, A. Belver and M.P. Rodrıguez-Rosales. 2012. Overexpression of SlSOS2 (SlCIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato. Plant, Cell Environ, 35: 1467-1482.
14. Hoagland, D.R. and D.I. Arnon. 1950. The water culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station, 347(2): 32.
15. Kafi. M., A. Borzoee, M. Salehi, A. Kamandi, A. Masoumi and J. Nabati. 2009. Physiology of environmental stresses in plants. Iranian academic center for education, culture and research (ACECR), Mashad, 502 pp (In Persian).
16. Kiani, D., H. Soltanloo, S.S. Ramezanpour, A.A. Nasrolahnezhad Qumi, A. Yamchi, Kh. Zaynali Nezhad and E. Tavakol. 2017. A barley mutant with improved salt tolerance through ion homeostasis and ROS scavenging under salt stress. Acta Physiologiae Plantarum, 39: 90.
17. Liu, J., M. Ishitani, U. Halfter, C.S. Kim and J.K. Zhu. 2000. The *Arabidopsis thaliana SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 3730-3734.
18. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−DDCT method. Methods, 25: 402-408.
19. Mahajan, S. and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444: 139-158.
20. Maughan, P.J., T.B. Turner, C.E. Coleman, D.B. Elzinga, E.N. Jellen, J.A. Morales, J.A. Udall, D.J. Fairbanks and A. Bonifacio. 2009. Characterization of Salt Overly Sensitive 1 (*SOS1*) gene homoeologs in quinoa. *Chenopodium quinoa* Willd. Genome, 52: 647-657.
21. Martinez-Atienza, J., X. Jiang, B. Garciadeblas, I. Mendoza, J.K. Zhu and J.M. Pardo. 2007. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. Plant Physiology, 143: 1001-1012.
22. Munns, R. and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 59: 651-658.
23. Niazian, M., M. No'mani and S.A.S. Noori. 2016. A Review on Biometrical Methods used for Salt Tolerance Breeding in Crops. Journal of Crop Breeding, 8(17): 24-41 (In Persian).
24. Oh, D.H., Z. Ali, C.P. Hyeong, R.A. Bressan, J.Y. Dae and H.J. Bohnert. 2010. Consequences of SOS1 deficiency: Intracellular physiology and transcription. Plant Signaling Behavior, 766pp.
25. Oh, D.H., Q. Gong, A. Ulanov, Q. Zhang, Y. Li, W. Ma, D.J. Yun, R.A. Bressan and H.J. Bohnert. 2007. Sodium stress in the *Halophyte thellungiella* halophila and transcriptional changes in a thsos1- rna interference line. Journal of Integrative Plant Biology, 49: 1484-1496.
26. O.H, D.H., S.Y. Lee, R.A. Bressan, D.J. Yun and H.J. Bohnert. 2010b. Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. Journal of Experimental Botany, 61(4): 1205-1213.
27. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan and L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, 30(9): 36.
28. Qiu, Q.S., Y. Guo, M.A. Dietrich, K.S. Schumacher and J.K. Zhu. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na+/H+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by *SOS2* and *SOS3*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 99: 8436-8441.
29. Quintero, F.J., M. Ohta, H. Shi, J.K. Zhu and J.M. Pardo. 2002. Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na+ homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 9061-9066.
30. Sahi, C., A. Singh, E. Blumwald and A. Grover. 2006. Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. Physiologia Plantarum, 127: 1-9.
31. Shi, H., B.H. Lee, S.J. Wu and J.K. Zhu. 2003. Overexpression of a plasma membrane Na+/H+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Nature Biotechnology, 21: 81–85.
32. Shi, H., M. Ishitani, C. Kim and J.K. Zhu. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na+/H+ antiporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 6896-6901.
33. Shi, H., F.J. Quintero, J.M. Pardo and J.K. Zhu. 2002. The putative plasma membrane Na(+)/H(+) antiporter SOS1 controls long distance Na(+) transport in plants. Plant Cell, 14: 465-477.
34. Takahashia, R., S. Liub and T. Takano. 2009. Isolation and characterization of plasma membrane Na+/H+ antiporter genes from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants. Journal of Plant Physiology, 166: 301-309.
35. Teige, M., E. Scheikl, T. Eulgem, R. Doczi, K. Ichimura, K. Shinozaki, J.L. Dangl and H. Hirt. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. Molecular Cell, 15(1): 141-52.
36. Xu, H., X. Jiang, K. Zhan, X. Cheng, X. Chen, J.M. Pardo and D. Cui. 2008. Functional characterization of a wheat plasma membrane Na+/H+ antiporter in yeast. Archives of Biochemistry and Biophysics, 473: 8-15.
37. Yang, Q., Z.Z. Chen, X.F. Zhou, H.B. Yin, X. Li, X.F. Xin, X.H. Hong, J.K. Zhu and Z.H. Gong. 2009. Overexpression of *SOS* (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis. Molecular Plant, 2: 22-31.
38. Zhang, H.X. and E. Blumwald. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nat. Biotechnology, 19: 765-768.
39. Zhou, G.A., Y. Jiang, Q. Yang, J.F. Wang, J.I. Huang and H.S. Zhang. 2006. Isolation and characterization of a new Na+/H+ antiporter gene OsNHA1 from rice. *Oryza sativa* L. DNA Sequence, 17: 24-30.
40. Zhu, J.K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. Current Opinion in Plant Biology, 6: 441-445.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.1]

The Study of SOS Genes Expression in Mutant Barley Root under Salt Stress

Sareh Yousefi Rad[1], Hassan Soltanloo[2], Sayad Sanaz Ramezanpour [2] and Khalil Zaynali Nezhad[3]

1- PhD student, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,
(Corresponding author: sareh.yousefirad@yahoo.com)
2 and 3- Associate Professor and Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: April 29, 2017 Accepted: August 13, 2017

Abstract

Soil salinity is one of the most critical factors reducing crop yield. SOS signaling is one of the significant pathways that regulate ion homeostasis and it has the important role in mechanism of plant resistance to environmental stresses such as salt stress. Roots are the first organ of plants exposed to salt, so the role of genes involved in this pathway and their relation to salt tolerance were investigated between 73-M4-30, a salt tolerant mutant genotype, and Zarjou, as its wild type, genotypes. In this research, patterns of expression of *HvSOS1*, *HvSOS2* (*CIPK24*) and *HvSOS3* (*CBL4*) genes were studied under 300 mM salt concentration at 0 (control), 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours between two genotypes. Quantitative RT-PCR analysis showed that the expression levels of these three genes under salt stress in root tissue of the salt-tolerant mutant genotype in compared to its wild genotype were much more and stronger in early time of 6-hour. The parallel up-regulation of these three genes in the root tissue of the mutant genotype demonstrated the activity of Na^+/H^+ antiporter and Na^+ exclusion toward apoplast as well as its transportation from the root to the shoot. The lack of similarity in expression pattern of SOS genes between the two genotypes of salt-tolerant mutant and wild parent showed that the mutation could alter the ability of the salt tolerant mutant genotype in the use of ionic homeostasis in response to the salt stress.

Keywords: Germination stage, *Hordeum vulgare*, Quantitative RT-PCR

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.1]