دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

پاسخ فیزیولوژیکی و ژنتیکی هالوفیت *Aeluropus littoralis* به شوری

بهزاد شاهین کلیبر[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲]، سیدحمیدرضا هاشمی[۳]، حسین عسکری[۴] و سارا کبیرنتاج[۵]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان،
(نویسنده مسوول: Shahin.bio65@gmail.com)
۲- استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳ و ۵- کارشناس ارشد و دانش آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان
۴- استادیار، دانشگاه شهید بهشتی
تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۲۳

چکیده

شوری با ایجاد تنش یونی و اسمزی موجب کاهش تولید محصولات زراعی و باغی می‌شود. در این تحقیق مکانیسم تحمل شوری در هالوفیت *Aeluropus littoralis* که یکی از متحمل‌ترین گیاهان تک‌لپه‌ای به شوری است در چهار سطح نمکی ۱۲۰، ۲۵۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار از طریق تکنیک cDNA-AFLP مورد بررسی قرار گرفت. از لحاظ فنولوژیکی تنش شوری موجب کاهش رشد شاخساره، نسبت شاخساره به ریشه و کلروفیل گردید. بیشترین تظاهر ژنها به همراه بیشترین واریانس کیفی در تیمار نمکی ۲۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد. در این سطح گیاه دارای بیشترین رشد حتی نسبت به سطح شاهد بود و با افزایش میزان شوری خاموشی ژنها افزایش یافت. نتایج نشان داد که در سطح شوری ۲۵۰ میلی مولار این هالوفیت بهترین پاسخ را به شوری دارد و مناسب‌ترین تیمار جهت درک مکانیسم‌های تحمل شوری در این هالوفیت است. به نظر خاموشی ژنهای فعال در سطح شاهد و بیان تعدادی از ژنهای خاموش در سطح شاهد همراه با کاهش کل TDF های بیان شده در اثر اعمال تنش و کاهش نسبت شاخساره به ریشه مکانیسم تنظیمی گیاه جهت تحمل تنش شوری باشد به طوری که تظاهر این ژنهای خاموش علاوه بر القاء تحمل موجب افزایش رشد نسبت به سطح شاهد در این گیاه شده است.

واژه‌های کلیدی: آنالیز بیان ژن، استرس شوری، هالوفیت، *Aeluropus littoralis*، cDNA-AFLP

مقدمه

مساله شوری خاک در اثر آبیاری، زهکشی نامناسب، پیشروی دریا در مناطق ساحلی و تجمع نمک در نواحی بیابانی و نیمه بیابانی در حال افزایش است. حدوداً ۵۰ درصد از سطح زیر کشت محصولات کشاورزی در ایران به دلیل قرار داشتن در منطقه آب و هوایی خشک و نیمه خشک با مشکل شوری و قلیایی بودن خاک روبه رو است (۲۳). شوری خاک از طریق ایجاد تنش‌های یونی، اسمزی، اکسیداتیو به

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

همراه اختلالات تغذیه‌ای در این مناطق محدود کننده رشد محصولات زراعی و باغی است که در نهایت مانع از تظاهر کامل پتانسل ژنتیکی گیاه می‌شود (۲۱، ۲۵، ۳۰، ۳۴، ۳۹). برای شوری تعاریف مختلفی ارائه شده به عنوان مثال تانجی (۳۲) شوری را حضور میزان بالای املاح در آب و خاک تعریف و عناصر اصلی این املاح را کاتیون‌های Na^{+}، Ca^{2+}، Mg^{2+}، K^{+} و آنیون‌های No_3^{-2}، Hco_3^{-}، Cl^{-} معرفی نموده است.

گیاهان سازگار از مکانیسم‌های متفاوتی جهت تحمل شوری استفاده می‌کنند که از آن جمله می‌توان به تغییر در الگوی بیان ژن، حفظ پایداری یونی، تجمع مواد محلول سازگار نظیر پرولین و گلایسین بتائین، حفظ آب در داخل سلول، ترمیم و کنترل آسیب‌های حاصل از تنش مانند حذف رادیکالهای آزاد اکسیژن، تخریب پروتئین‌های آسیب دیده، تنظیمات رشدی مانند افزایش نسبت ریشه به شاخساره و یا کاهش سطح برگ اشاره نمود (۹، ۱۳، ۱۸، ۲۲، ۲۴، ۳۵).

به طور کلی مطالعه رونوشت‌ها امکان شناسایی تغییرات در فعالیت و الگوی بیانی ژنها را فراهم نموده است که به نحو گسترده‌ای جهت درک مکانیسم‌های تحمل شوری در گیاهانی مانند سیب زمینی، ارزن ایتالیایی و هالوفیت *Spartina alterniflora* Loisel استفاده شده است (۲، ۵، ۱۴، ۱۷). در حال حاضر روش‌های آر.تی-پی.سی.آر افتراقی، تجزیه ترتیبی تظاهر ژن، روش دورگ‌گیری کاهنده و ریزآرایه جهت بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). با این وجود تکنیک cDNA-AFLP با تکرارپذیری و حساسیت بسیار بالا (۱)، داشتن صحت بالای نتایج حاصله، توانایی پوشش دادن به بخش بالایی از ژنوم و عدم نیاز به توالی‌های از پیش تعیین شده وضعیت مناسبی را در زمینه آنالیز رونوشت به خود اختصاص داده است (۴، ۲۹). به طوری که به سادگی جهت درک مکانیسم‌های مولکولی در گیاهان غیر مدل و گیاهانی که مجموعه cDNA توالی‌یابی شده زیادی از آنها در دسترس نیست بکار رفته است. اطلاعات ارائه شده در این زمینه نشان می‌دهد که آنالیز رونوشت‌ها و شناسایی ژنهای تنظیم کننده اکسین در گیاه *Arabidopsis thaliana* توسط هوانگ (۱۵)، آنالیز بیان ژن لاینهای مقاوم (RH8706-49) و حساس (H8706-34) گندم در پاسخ به شوری توسط چن (۶)، آنالیز الگوی بیانی ژنهای مرتبط با تنش سرما در طی فرآیند جذب آب در بذر سویا توسط لی بائو و همکاران (۱۹) و شناسایی ژن‌های دخیل در لهیدگی انبه در اثر تولید اتیلن توسط فابی و همکاران (۱۱) بر پایه قابلیتهای این روش امکان پذیر شده است.

تاکنون تلاش‌های زیادی برای درک مکانیزم‌های تحمل شوری صورت گرفته است با این وجود موفقیت برنامه‌های اصلاحی با هدف نهایی بهبود عملکرد محصول، بدلیل فقدان درک روشنی از اساس ملکولی شوری چندان چشمگیر نبوده است. عدم وجود گیاهان مدل متحمل به شوری یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیشرو برای توضیح علت عدم موفقیت در ارزیابی جامع واکنش گیاهان به شوری و تعیین مبانی مولکولی آن بوده است. بر اساس گزارش

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

اینان و همکاران (۱۶)، گیاه *Thellungiella halophile* قابلیت بزرگی به عنوان هالوفیت دولپه مقاوم به شوری ارائه کرده است. این در حالی است که اطلاعات موجود امکان معرفی یک گیاه مدل ژنتیک تک‌لپه برای تحمل به شوری را ممکن نکرده است. گیاه *Aeluropus littoralis* یک هالوفیت تک لپه دارای ژنوم کوچک با وضعیت کروموزومی 2n=2x=14 از خویشاوندان وحشی گندم با متابولیسم C_4 است که به عنوان یک منبع ژنتیکی متحمل به تنش‌های شوری و خشکی جهت رسیدن به امنیت غذایی از طریق ارتقاء ژنتیک گیاهان زراعی در برابر شوری و خشکی به حساب می‌آید (۴۰). به طوری که با انتقال ژن‌هایی مانند AlSAP و AlNHX از این هالوفیت به توتون و گندم افزایش تحمل به شوری در این گیاهان مشاهده شده است (۳، ۳۳، ۳۶، ۳۷). با توجه به قابلیت جذب، انتقال و دفع نمک از طریق غدد نمکی، این هالوفیت قابلیت تحمل غلظت ۶۰۰ میلی مولار از کلریدسدیم با کمترین آثار سمیت را دارد در حالی‌که قابلیت بقاء تا سطوح بالاتر از ۱۱۰۰ میلی مولار را نیز دارا می‌باشد. هم‌چنین این گیاه توانایی تحمل نسبتهای بالای Na^+ / K^+ در محیط‌های شور و حفظ حالت عادی رشد بدون هیچگونه علائم سمی را دارد (۸، ۲۴). بر پایه اطلاعات ارائه شده توسط زواری و همکاران (۴۰) این گیاه پتانسیل معرفی یک مدل ژنتیک تک لپه متحمل به شوری را دارا می‌باشد. هدف از این تحقیق شناسایی سطح شوری است که در آن گیاه از لحاظ فیزیولوژیکی و تغییرات بیان ژن بهترین پاسخ را به تنش می‌دهد و استفاده از این سطح برای بررسی مکانیسم‌های رایج پاسخ به تنش در سطح رونوشت در این هالوفیت و شناسایی بهترین ترکیبات پرایمری برای ازریابی الگوهای بیانی که در پاسخ به تنش شوری تظاهر پیدا کرده یا میزان بیان‌شان افزایش می‌یابد است.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و اعمال تنش

در این تحقیق بذور از منطقه رودشت استان اصفهان جمع‌آوری و در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان در داخل ماسه کشت شد. بعد از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله دو برگی آبیاری با محلول هوگلند ۱/۲ به مدت ۱۵ روز انجام شد. جهت اعمال تنش به محیط کشت هیدروپونیک با در نظر گرفتن سه تکرار برای هر تیمار در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای با درجه حرارت ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵-۶۰ درصد به ترتیب روز- شب با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. مواد غذایی هر سه روز یکبار تعویض و pH محیط هیدروپونیک در محدوده ۵/۷-۵/۵ به طور روزانه تنظیم شد. پس از سازگار شدن گیاهچه‌ها با شرایط هیدروپونیک تنش شوری به‌تدریج با افزودن روزانه ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم تا رسیدن به سطوح شوری ۱۲۰، ۲۵۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی مولار اعمال شد. بالاترین سطح شوری پس از ۱۲ روز بدست آمد و گیاهچه‌ها پس از آن به مدت ۲۰ روز تحت تنش قرار گرفتند. در انتهای آزمایش گیاهچه‌ها در دو بخش ریشه و شاخساره برداشت و

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

بلافاصله داخل ازت مایع قرار داده شدند و تا زمان مورد استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعداد ۱۰ گیاه از هر تکرار برای اندازه گیری کلروفیل، طول ریشه و شاخساره استفاده شد.

استخراج RNA

RNA کل با استفاده از کیت RNAeasy (شرکت کیناژن) مطابق با دستورالعمل ذکر شده توسط شرکت سازنده استخراج شد. RNA استخراج شده از تکرارهای مختلف مربوط به هر سطح شوری جهت کاهش تنوع بین تیمارها، با یکدیگر مخلوط شدند. برای تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از روش ژل آگارز و اسپکتروفتومتری استفاده شد. استخراج mRNA با استفاده از الیگوتکس صورت گرفت.

آنالیز cDNA-AFLP

جهت ساخت cDNA دو رشته‌ای از آنزیم رونوشت‌ساز معکوس (invitrogene) II RT superscript^{TM} و پرایمر (V=A, G, C) oligo $dT_{18}V$ به همراه ۲۰۰ نانوگرم mRNA استفاده شد. ۴۰۰ نانوگرم از dscDNA تهیه شده از تیمارهای مختلف توسط ده واحد از آنزیم‌های *Mse*I و *Eco*RI مورد هضم دوتایی قرار گرفت. ابتدا مخلوط واکنش به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که مناسب‌ترین دما جهت فعالیت آنزیم برشی *Eco*RI است قرار گرفت در این دما آنزیم برشی *Mse*I حدود ۱۰ درصد فعالیت دارد. سپس به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد که دمای بهینه جهت فعالیت آنزیم برشی *Mse*I است، قرار داده شد. اتصال آداپتورها در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد با ۵ پیکومول از آداپتور *Eco*RI، ۵۰ پیکومول از آداپتور *Mse*I (جدول ۱)، سه واحد از آنزیم T4 DNA ligase، 1X T4 buffer و ۰/۳ میلی مولار از ATP در حجم نهایی ۳۵ میکرولیتر انجام و جهت غیرفعال نمودن آنزیم T4 ligase از دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید.

جدول ۱- ساختار آداپتورها و توالی پرایمرهای استفاده شده در مرحله پیش تکثیر

	*Eco*R I	*Mse* I
ساختار آداپتورها	5-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-5	5-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-5
پرایمرهای مرحله پیش تکثیر	EcoRI +N (5-ACTGCGTACCAATTN-3)	Mse I+N (5-GATGAGTCCTGAGTAN-3)

N = (A, T, G, C)

محصول حاصل از اتصال آداپتورها پنج برابر رقیق شده و جهت انجام مرحله پیش تکثیر با ترکیب پرایمری *Eco*RI +N و *Mse* I + N (جدول ۱) با برنامه پی سی آر ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه ۵۵ درجه و ۱ دقیقه ۷۲ درجه برای ۲۵ چرخه استفاده شد. محصول حاصل از این مرحله به نسبت ۱ به ۴۰ رقیق شده و جهت تکثیر انتخابی با افزودن سه نوکلئوتید

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

انتخابی به انتهای '۳ پرایمرها با برنامه پی سی آر ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه ۶۵ درجه و یک دقیقه ۷۲ درجه برای ۱۲ چرخه به‌طوری‌که هر چرخه ۰/۷ درجه کاهش دما داشت تکثیر شد و در ادامه ۲۳ چرخه بصورت ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه ۵۶ درجه، ۱ دقیقه ۷۲ درجه و تکثیر نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. جهت واسرشته سازی رشته‌های DNA از دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه و فرمامید استفاد شد. بلافاصله بعد از پایان زمان واسرشته‌سازی جهت تک رشته‌ای ماندن قطعات تکثیری سریعا در داخل یخ قرار داده شد و به منظور مشاهده الگوی نواری محصولات تکثیری از دستگاه Sequi-Gen GT Cell (Bio-Rad) و ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز ۶٪ استفاده گردید. الکتروفورز نمونه‌ها تحت ولتاژ ثابت ۶۵ وات در بافر TBE 0. 5X به مدت دو ساعت انجام شد. رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره انجام و از الگوی باندی بدست آمده با استفاده از دستگاه دنسیتومتر (GS-800, BioRad, USA) تصویربرداری شد. آنالیز TDF[1]ها با استفاده از نرم‌افزارهای Quantity one و Total Lab TL120 صورت گرفت. در این بین ژنهایی که در گیاهان شاهد فعال بوده و در گیاهان تحت تیمار خاموش شده‌اند (خاموشی ژن) و یا عکس این حالت را نشان داده‌اند (تظاهر ژن) در زمره واریانس کیفی و ژنهایی که نسبت به سطح شاهد حالت افزایش یا کاهش بیان را نشان دادند در زمره واریانس کمی دسته‌بندی شدند. قابل ذکر است که در پژوهش حاضر تمامی آنالیزهای افتراقی صورت گرفته برای سطوح مختلف شوری، در مقایسه با سطح شاهد می‌باشد.

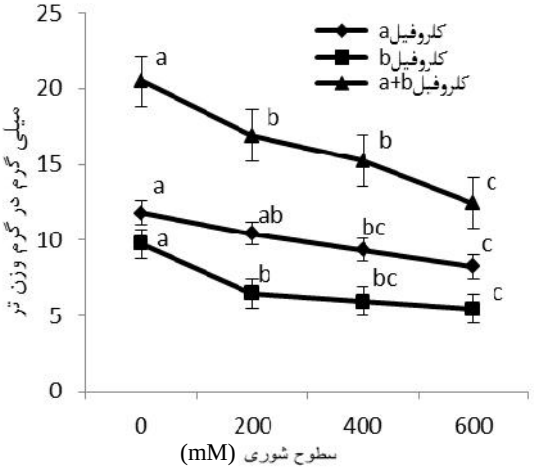
نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل فیزیولوژی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تاثیر شوری بر میزان کلروفیل برگ گیاه *A. littoralis* در سطح ۱٪ معنی‌دار است (شکل ۱). مقایسه میانگین چند دامنه‌ای LSD نشان داد که افزایش شوری موجب کاهش کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل a+b می‌شود که این کاهش برای کلروفیل b بیشتر از کلروفیل a بود. کمترین میزان کلروفیل a و کلروفیل b در سطح شوری ۶۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد ولی از لحاظ آماری با سطح ۴۰۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بیشترین مقدار کلروفیل a و کلروفیل b در سطح شاهد بود ولی از لحاظ آماری کلروفیل a در سطح شاهد با سطح ۲۰۰ میلی مولار تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۱). به‌نظر می‌رسد علت کاهش کلروفیل در اثر شوری بدلیل سمیت یونی حاصل از یون سدیم و تجمع رادیکالهای آزاد اکسیژن ایجاد شده در اثر شوری باشد. نتایج مشابه در آزمایش ژو و رن (۳۸) مشاهده شد که شوری سبب کاهش میزان کلروفیل برگ گیاه یولاف شده است. بر اساس نظر این محققین، این امر مربوط به ممانعت شوری از سنتز کلروفیل و افزایش تجزیه کلرفیل در برگ است.

1- Transcript-derived fragments

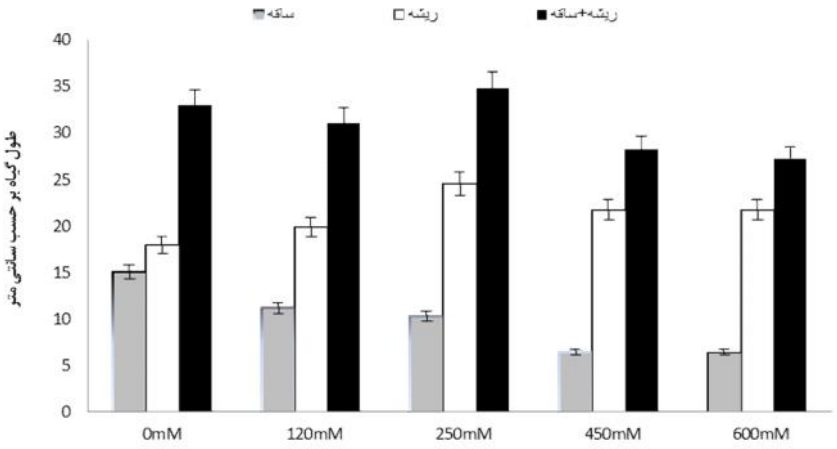
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]



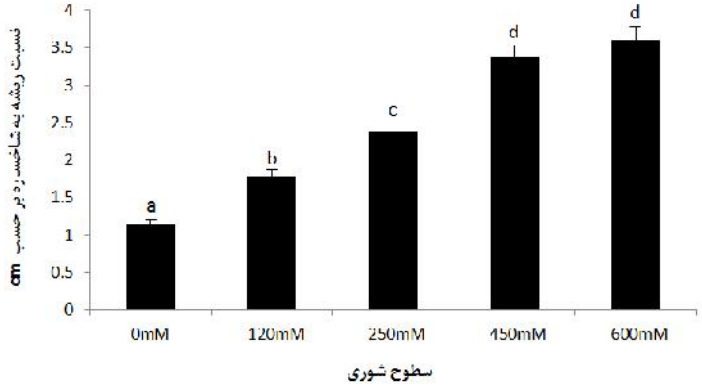
شکل ۱- تاثیر شوری بر میزان کلروفیل a، b و a+b در گیاه *A. littoralis*

نتایج حاصل از تاثیر اعمال تنش کلریدسدیم در سطوح ۱۲۰، ۲۵۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار روی رشد گیاهچه‌های *A. littoralis* نشان داد که بیشترین میزان رشد ریشه با طول ۲۴/۵۴ سانتی‌متر و بیشترین رشد گیاه با ارتفاع ۳۴/۸۳ سانتی‌متر در تیمار نمکی ۲۵۰ میلی‌مولار از کلرید سدیم است در حالی‌که بیشترین میزان رشد ساقه در سطح کنترل با طول ۱۵/۹۱ سانتی‌متر مشاهده شد (شکل ۲) و با افزایش شوری نسبت ریشه به شاخساره افزایش یافت (شکل ۳). به‌نظر می‌رسد کاهش رشد شاخساره در اثر افزایش شوری به دلیل کاهش فتوسنتز و سیگنال‌های هورمونی ایجادشده توسط ریشه در شرایط تنش باشد. از طرف دیگر افزایش شوری نسبت ریشه به شاخساره را افزایش داده که مزیتی برای گیاهان هالوفیت در شریط تنش بشمار می‌آید زیرا موجب افزایش نسبت بخش‌های جذب کننده آب به بخش‌های تنفس کننده گیاه و در نهایت افزایش راندمان آبی گیاه می‌شود زیرا شوری از طریق ایجاد تنش اسمزی جذب آب توسط گیاه را با مشکل روبرو می‌کند. یافته‌های امام و نیک نژاد (۱۰) در گیاهان زراعی و پوستینی و زهتاب سیلمانی (۲۸) در دو گونه گندم، کاهش رشد شاخساره در اثر شوری را تایید نموده و همچنین تحقیقات پنولاس و همکاران (۲۶) در جو و پسرکلی و همکاران (۲۷) روی جو و گندم بیانگر کاهش طول ساقه و شاخساره در اثر شوری است که نتایج حاصل از مطالعات مذکور با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]



شکل ۲- طول ریشه، ساقه و ارتفاع گیاه *A. littoralis* در سطوح مختلف شوری



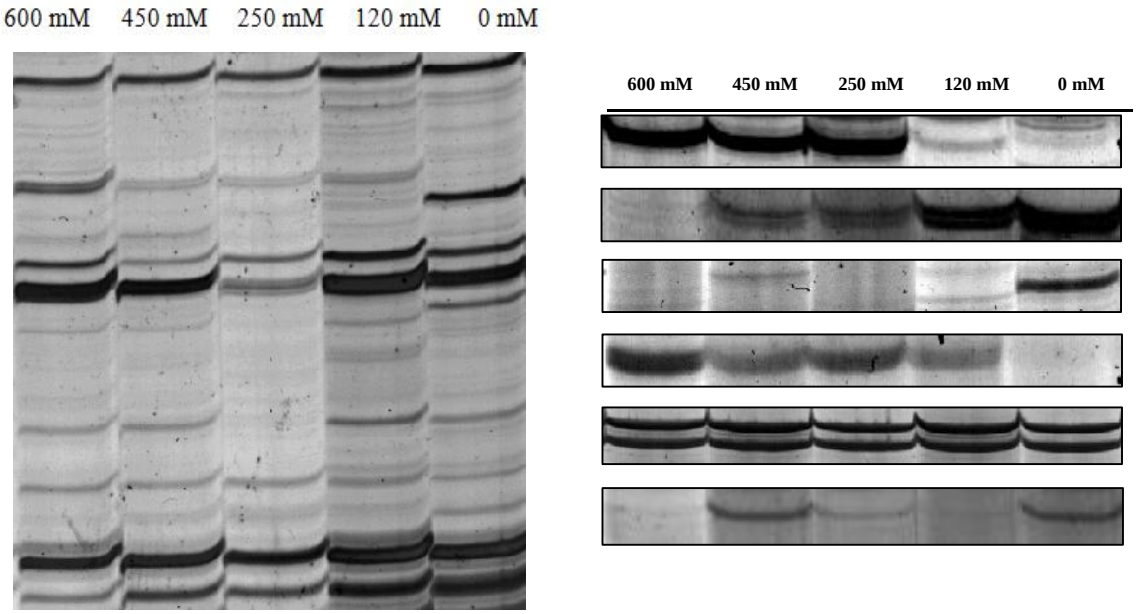
شکل ۳- نسبت ریشه به شاخساره در *A. littoralis* در سطوح مختلف شوری

نتایج آزمایشات cDNA-AFLP

مزیت تکنیک cDNA-AFLP در مقایسه با تکنیک ریزآرایه عدم نیاز به توالی‌های از پیش تعیین شده و توانایی تفکیک ژنها با شباهت بالا از خانواده‌های ژنی است که قابلیت استفاده برای گیاهان غیر مدل را فراهم کرده است (۷). از آنجا که مقاومت به شوری توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود آنالیز کلی رونوشت درک ما را از این مکانیسم افزایش خواهد داد (۳۱). در این پژوهش به منظور پوشش کل ژنوم و تولید قطعاتی با قابلیت تفکیک روی ژل ۶٪ پلی اکریل آمید توالی‌های موجود از این گیاه در بانک ژن (NCBI) با در نظر گرفتن معیارهایی همچون جایگاه‌های آنزیم‌های برشی مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت ترکیب آنزیم‌های برشی *Mse* I /*EcoR* I جهت هضم cDNA انتخاب شد. پیش از آغاز آنالیز افتراقی انتخاب ترکیب‌های پرایمری مناسب جهت بهینه سازی الگوی باندهی صورت گرفت و از ۵۶ ترکیب پرایمری استفاده شده در این

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

تحقیق، ۳۲ ترکیب باندهای واضحی ایجاد کردند و برای آنالیز ترانسکریپتوم انتخاب شدند که تولید TDF ۱۷۰۰ با قابلیت تکرارپذیری بالا و اندازه باندی بین ۱۰۰۰-۸۰ جفت باز کردند که از این بین ۵۳ درصد سهم اندام‌های هوایی و ۴۷ درصد سهم ریشه بود. در پاسخ هالوفیت *A. littoralis* به تنش شوری الگوهای بیانی متفاوتی مشاهده گردید که می توان آنها را به شش گروه مجزا شامل TDF هایی که در اثر افزایش شوری تظاهرشان افزایش یافت، TDF هایی که در اثر افزایش شوری تظاهر آنها کاهش یافت، TDF هایی که در اثر اعمال تنش تظاهرشان متوقف شده و خاموش شد، TDF هایی که در گیاه شاهد خاموش بوده و دراثر اعمال تنش تظاهر یافتند، TDF هایی که تظاهر آنها هم در شرایط عادی رشد گیاه و هم تحت تنش هیچ تغییری نکرده و ثابت بودند و TDF هایی با تظاهر ناپایدار (شکل ۴) تقسیم بندی نمود.



شکل ۴- الگوهای بیانی متفاوت ایجاد شده در پاسخ گیاه *A. littoralis* به تنش شوری که از بالا به پایین به ترتیب حالت‌های افزایش بیان، کاهش بیان، خاموش شدن، روشن شدن، ثبات بیان و حالت ناپایدار بیان می‌باشند.

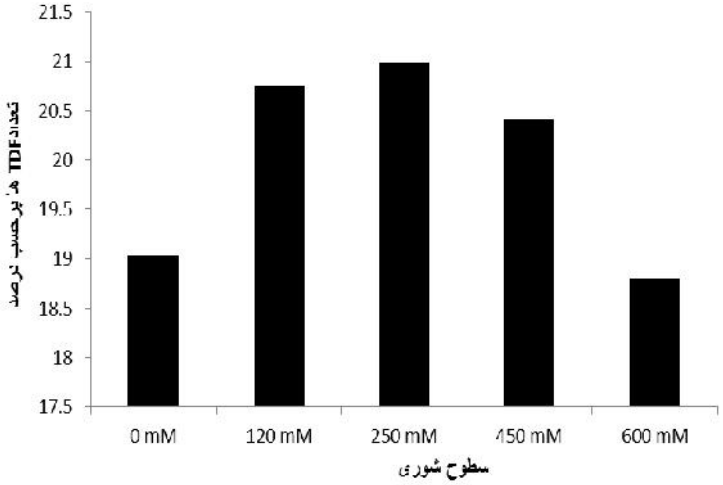
با توجه به شکل ۴ ژنهایی که حالت توقف بیان نشان دادند، TDF هایی بودند که در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نمکی وجود نداشته و فقط در گیاهان شاهد قابل شناسایی بودند و در مقابل ژنهای فعال شده تنها در گیاهان تحت استرس قابل شناسایی بوده و در گیاهان شاهد بیان نشدند. TDF هایی که حالت افزایش یا کاهش بیان را نشان دادند رونوشت‌هایی بودند که هم در گیاهان شاهد و هم تحت تنش حضور داشته ولی زمانی‌که نسبت به گیاهان شاهد مقایسه شدند حالت افزایش یا کاهش بیان را نشان دادند. در پژوهش‌های صورت گرفته توسط ژو و همکاران (۱۲) در پاسخ هالوفیت

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

Kosteletzkya virginica به تنش شوری چنین الگوهای بیانی مشاهده شد. شدت بیان گروه آخر از TDF ها در ابتدا با افزایش غلظت نمک الگویی کاهشی- افزایشی داشته و با بیشتر شدن غلظت نمک الگو به صورت افزایشی-کاهشی تغییر کرد و یا حالت‌های مختلفی از روشن و خاموش شدن بروز کرد. لازم بذکر است گروه‌های ۱ و ۲ در دسته واریانس کمی و گروه ۳ و ۴ در دسته واریانس کیفی دسته‌بندی شدند.

تجزیه و تحلیل رونوشت ها

بررسی پروفایل‌های بیانی گیاهچه‌های تیمار شده با سطوح ۰، ۱۲۰، ۲۵۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی مولار از کلرید سدیم به ترتیب ۱۹/۴، ۲۰/۷۵، ۲۰/۹۹، ۲۰/۲۶ و ۱۸/۶ درصد از رونوشتهای تظاهر یافته را نشان داد که بیشترین تعداد TDF بیان شده مربوط به سطح شوری ۲۵۰ میلی مولار و کمترین تعداد مربوط به سطح ۶۰۰ میلی مولار از کلرید سدیم بود (شکل ۵).

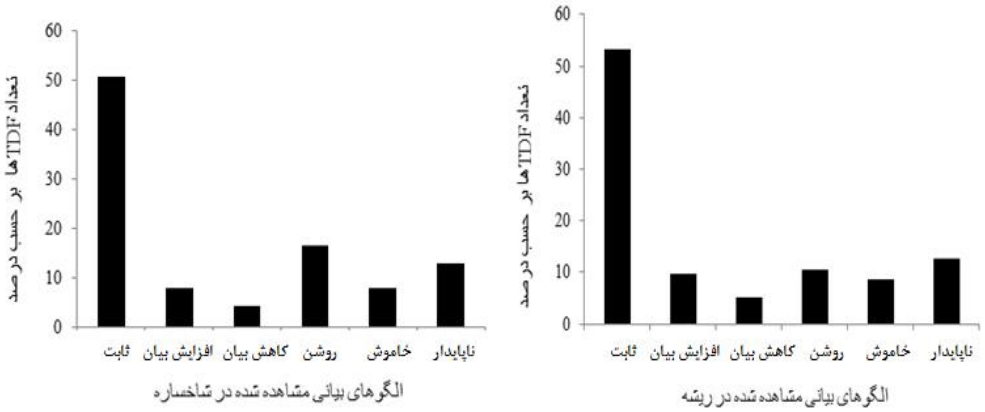


شکل ۵- تعداد TDF های بیان شده در سطوح مختلف شوری

نتایج نشان داد که میزان بیان ژنها در تیمارهای مختلف نمکی متفاوت است به طوری که سطح شوری ۲۵۰ میلی مولار بیشترین میزان بیان ژن را بخود اختصاص داد که این افزایش با افزایش رشد گیاه مطابقت دارد. تعداد TDF های بیان شده در سطح شاهد و تیمارهای نمکی ۱۲۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار با افزایش میزان شوری روند صعودی داشتند در حالی که در سطوح ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار حالت نزولی مشاهده شد. به نظر می‌رسد در سطوح ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی مولار، بیان برخی از TDF ها در مقایسه با سطح شاهد متوقف شده که روند صعودی خاموشی ژنها با افزایش میزان شوری (شکل ۷) آنرا تایید می‌کند.

آنالیزهای صورت گرفته روی TDF های بیان شده، واریانس کمی (مقادیر متفاوتی از بیان ژن در تیمارهای مختلف نمکی نسبت) و واریانس کیفی (بیان یا عدم بیان ژن) را برای ریشه به‌ترتیب ۱۴/۸۲ و ۱۹/۱۹ درصد و برای اندام‌های هوایی به ترتیب ۱۲/۲۱ و ۲۴/۴۲ درصد نشان داد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

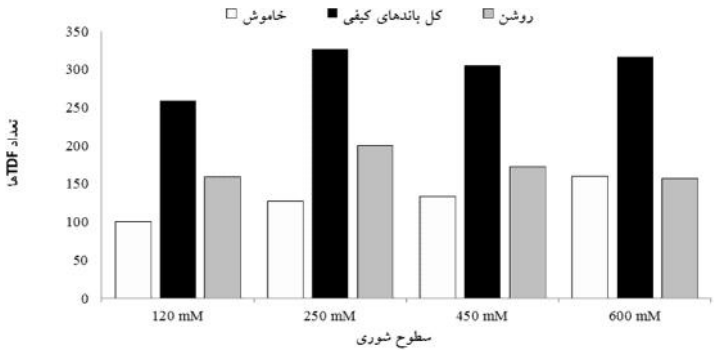


شکل ۶- مقادیر الگوهای بیانی مشاهده شده در ریشه و اندام‌های هوایی نسبت به شاهد

در ریشه و اندام‌های هوایی هر دو واریانس کمی و کیفی، مشاهده شدند و بین TDF هایی که واریانس نشان دادند واریانس کیفی با ۲۱/۸ درصد بیشترین مقدار را به‌خود اختصاص داد و این واریانس کیفی با افزایش شوری غالبیت بیشتری پیدا کرد. بایساخ و همکاران (۲) نیز در بررسی پاسخ هالوفیت *Spartina alterniflora* به تنش شوری افزایش غالبیت واریانس کیفی با افزایش شوری را مشاهده کردند. اکثر ژنهای بیان شده ریشه و ساقه بیان ثابتی بین گیاهان شاهد و تحت تنش نشان دادند (شکل ۶)، به نظر ژنهای ضروری برای بقا یا ژنهای خانه‌دار در این گروه بیانی قرار دارند لازم بذکر است که ژنهای خانه‌دار به لحاظ تئوریک از بیان نسبتا ثابتی در تنش‌ها و بافت‌های مختلف برخوردارند. این نتایج با نتایج آنالیز بیان ژن لوئیزا و همکاران (۲۰) در گیاه سیب زمینی مطابقت دارد.

بین TDF هایی که واریانس نشان داده تظاهر ژنهایی که در سطح شاهدخاموش بودند با ۱۳ درصد از کل TDF های تظاهر یافته بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد که این تظاهر در تیمار نمکی ۲۵۰ میلی مولار در حداکثر مقدار خود بود. نتایج حاصل از مطالعات فیزیولوژیکی نیز بیشترین میزان رشد گیاه را در این تیمار نمکی نشان داد. هم‌چنین این تیمار نمکی با دارا بودن ۳۳۳ TDF بیشترین واریانس کیفی نسبت به شاهد را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد که به بدلیل تظاهر ژنهایی در سطح ۲۵۰ میلی مولار است که در سطوح پایین‌تر شوری و سطح کنترل خاموش بوده‌اند که احتمالا موجب افزایش رشد این گیاه در این تیمار نمکی شده است (شکل ۲) و سطح شوری ۶۰۰ میلی مولار با ۱۶۰ TDF بیشترین میزان خاموشی ژن را نشان داد (شکل ۷) که بیانگر کاهش تعداد ژنهای بیان شده در شرایط تنش شوری در سطوح بالاتر شوری در پاسخ *A. littoralis* به شوری است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]



شکل ۷- مقایسه الگوی کیفی بیان ژن در تیمارهای نمکی نسبت به شاهد

از هر ترکیب پرایمری استفاده شده در این تحقیق بطور متوسط ۵۲ باند با الگوهای بیانی متفاوت نمایان شد. در ریشه ترکیب پرایمری *Eco*RI+ACC–*Mse*I+CAT بیشترین واریانس را نشان داد به طوریکه ۳۷ درصد از باندها بیان افتراقی با سطح شاهد داشتند که ۱۳ درصد به صورت کمی و ۲۴ درصد به صورت کیفی بود و ترکیب پرایمری *Eco*RI+AAG–*Mse*I+CTG در اندام‌های هوایی بیشترین الگوهای بیانی را نشان داد که ۶۰ درصد از باندها به صورت افتراقی بیان شدند که واریانس‌های کمی و کیفی به ترتیب ۲۹ و ۳۱ درصد بودند که تاثیر این ترکیب پرایمری در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- تاثیر ترکیبات پرایمری بکار رفته بر الگوهای بیان ژن در اندام‌های هوایی و ریشه در پاسخ به شوری

	ریشه	شاخساره
حداکثر افزایش بیان	E-AGG , M-CAC	E-AAG , M-CTG
حداکثر کاهش بیان	E-AGG , M-CAT	E-AGG , M-CAT
حداکثر روشن شدن ژنها	E-ACT , M-CAC	E-AAG , M-CTG
حداکثر خاموشی ژنها	E-ACT , M-CCT	E-ACT , M-CCT
حداکثر ثبات بیان	E-TCC , M-CTA	E-TCC , M-CTA
حداکثر ناپایداری بیان	E-AAA , M-CTA	E-AAA , M-CTA
حداقل افزایش بیان	E-AAC , M-CTG	E-AAC , M-CTG
حداقل کاهش بیان	E-ACT , M-CCT	E-ACT , M-CCT
حداقل روشن شدن ژن	E-ACT , M-CCT	E-ACT , M-CCT
حداقل خاموشی ژن	E-AGC , M-CTA	E-ACT , M-CAC
حداقل ثبات بیان	E-AGG , M-CAC	E-AGG , M-CAC
حداقل ناپایداری بیان	E-ACG , M-CTG	E-ACG , M-CYG

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

با توجه به نتایج کلی بدست آمده به نظر می‌رسد خاموشی ژنهای فعال در سطح شاهد به همراه فعال شدن تعدادی از TDF هایی که در سطح شاهد خاموش بوده‌اند همراه با کاهش TDF های بیان شده در این دو سطح و متعاقبا کاهش رشد گیاه نسبت به سطح شوری ۲۵۰ میلی‌مولار مکانیسم تنظیمی این هالوفیت در تحمل تنش شوری باشد، همچنین ترکیب‌های پرایمری (E-ACC,M-CAT)، (E-ACT M-CAC) و(E-AGG,M-CAC) برای ریشه و (E-AAG,M-CTG) برای شاخساره مناسب‌ترین ترکیبات پرایمری جهت بررسی الگوی‌های بیانی در سطوح شوری است زیرا بیشترین تعداد TDF هایی را که در اثر افزایش شوری میزان بیانشان افزایش یافته و یا در اثر اعمال تنش فعال شدند توسط این ترکیبات پرایمری قابل شناسایی بودند.

منابع

1. Bachem, C.W., V. Hoeven, D. Bruijn, D. Vreugdenhil, M. Zabeau and G. Visser. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. The Plant Journal, 9(1): 745-753.
2. Baisakh, N., K. Subudhi and N. Parami. 2006. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. Plant Science, 170: 1141-1149.
3. Ben sad, R., N. Zouari, W. Ben Ramdham, J. Azaza, D. meynard, E. Guiderdoni and A. hassairi. 2010. Improved drought and salt stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing a novel A20/AN1 zinc-finger ‘‘AlSAP’’ gene isolated from the halophyte grass. Plant Molecular Biology, 48: 171-190 pp.
4. Breyne, P. and M. Zabeau. 2001. Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. Current Opinion in Plant Biology, 4: 136-142.
5. Brinker, M., M. Brosché, B. Vinocur, A. Abo-Ogiala, P. Fayyaz, D. Janz, E.A. Ottow, A.D. Cullmann, J. Saborowski, J. Kangasjärvi, A. Altman and A. Polle. 2010. Linking the salt transcriptome with physiological responses of a salt-resistant populus species as a strategy to identify genes important for stress acclimation. Plant Physiology, 154: 1697-1709.
6. Chen, G.P. 2003. Isolation and characterization of TaGSK1 involved in wheat salt tolerance. Plant Science, 165: 1369-1375.
7. Ding, M.Q., P.C. Hou, X. Shen, M.J. Wang, S.R. Deng, J. Sun, F. Xiao, R.G. Wang, X.Y. Zhou, C.F. Lu, D.Q. Zhang, X.J. Zheng, Z.M. Hu and S.L. Chen. 2010. Salt-induced expressionof genes related to Na+/K+ and ROS homeostasis in leaves of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. Plant Molecular Biology, 73: 251-269.
8. Donson, J., Y. Fang, G. Espiritu-Santo, W. Xing, A. Salazar and S. Miyamoto. 2002. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. Plant Molecular Biology, 48: 75-97.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

9. Durand, M. and D. Lacan. 1994. Sodium partitioning within the shoot of soybean. Physiology. Plant, 9: 65-71.
10. Emam, Y.W. and M. Niknezhad. 1995. Introduction to the physiology of crop yield. Publishing Center of Shiraz University. Shiraz, Iran. 2: 41-55. (In Persian)
11. Fabi, J.P., L.R.B.C. Mendes, F.M. Lajolo and J.R.O.D. Nascimento. 2010. Transcript profiling of papaya fruit reveals differentially expressed gene associated with fruit ripening. Plant Science, 179: 225-233.
12. Guo, Y.Q., Z. Tian, D.L. Yan, J. Zhang, W.Z. Zhou and P. Qin. 2009. Gene expression of halophyte *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress at early stage. Genetic, 137: 189-199.
13. Hasegawa, P.M., R.A. Bressan and H.J. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology, 51: 463-499.
14. Hmida-Sayari, A., A. Costa, A. Leone, S. Jaoua and R. Gargouri-Bouzid. 2005. Identification of salt stress-induced transcripts in potato leaves by cDNA-AFLP. Molecular Biotechnology, 30(1): 31-39.
15. Huang, Y.C. 2008. Transcriptome analysis of auxin-regulated genes of *Arabidopsis* thaliana Gene, 420: 118-124.
16. Inan, G., Q. Zhang, P. Li and Z. Wang. 2004. 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.
17. Jayaraman, A., S.P. Uranik, N. Rai, S. Vidapu, P. Psahu, C. lata and M. Prasad. 2008. cDNA-AFLP Analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in Foxtail Millet (*Setaria italica* L.). Molecular Biotechnology, 40(3): 241-251
18. Kreps, J.A., H.S. Chang, T. Zhu, X. Wang and J.F. Harper. 2002. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic and cold stress. Plant Physiology, 130: 2129-2141.
19. Li-Bao, Ch., L.S. Yan and G. Yuan. 2009. Isolation and expression profile analysis of gene relevant to chilling stress during seed imbibition in soybean [glycine max (l.) meer.]. Agricultural Sciences in China, 8(5): 521-528.
20. Luisa, M.T., B.M. Horvath, R.V. Berloo and R.G.F. Visser. 2003. Analysis of genes differentially expressed during potato tuber life cycle and isolation of their promoter regions. Plant Science, 170: 1141-1149.
21. Maftoun, M. and A.R. Sepaskhan. 1989. Relative salt tolerance of eight wheat cultivars. Agrochemical, 33(1): 1-31.
22. Matoh, T. 1987. Sodium, potassium, chloride and betaine oncentrations in isolated vacuoles from salt-grown *Atriplex gmelini* leaves. Plant Physiologic, 84: 173-177.
23. Mir Mohammadi Meybodi, S. and B. Garayazi. 2001. Salt stress and physiological aspects of plant breeding. Isfahan University Press. Isfahan, Iran 5: 57-65. (In Persian)
24. Moons, A., G. Bauw, E. Prinsen and V. Straeten. 1995. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. Plant Physiology, 107: 177-186.
25. Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ, 25(1): 239-250.
26. Penuelas, J., R. Isla, I. Filella and J.L. Araus. 1997. Visible and near- infrared reflectance assessment of salinity effects on barley. Crop Science, 37: 198-202.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

27. Pessarakli, M., T.C. Tucker and K. Nakabayashi. 1991. Growth response of barley and wheat to salt stress. Journal of Plant Nutrition, 14: 331-340.
28. Postini, K. and S. Zehtabe Soleimani. 1998. Effects of salinity on dry matter production and remobilization in both cultivars of wheat. Plant Physiology, 2: 41-55.
29. Qin, L., P. Prins, J.T. jones, H. Popeijus, G. Smant, J. Bakker and J. Helder. 2001. GenEST, a powerful bidirectional link between cDNA sequence data and gene expression profikes generated by cDNA-AFLP. Nucleic Acid Research, 137: 189-199.
30. Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology, 3: 217-223.
31. Sreenivasulu, N., S.K. Sopory and P.B. Kavi Kishor. 2007. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. Gene, 388: 1-13.
32. Tanji, K. 1995. Agricultural salinity assessment and Management. Scientific Publisher Virginia, Americ. 619 pp.
33. Vos, R., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, M. Homes, A. Frijters, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new concept for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-4414.
34. Widodo, J., E. Newbigin, M. Tester, A. Bacic and U. Roessner. 2009. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. Journal of Experimental Botany, 60(1): 4089-4103.
35. Xiong, L. and J.K. Zhu. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant Cell & Environment, 25: 131-139.
36. Yue, W., X. Guangmin and Z. Daying. 2001. Transfer of salt tolerance from Aeleuropus littorulis sinensis to wheat (*Triticum aestium* L.) Life Science, 9: 545-553.
37. Zhang, G., Q. Su, L. Jia An and S. Wu. 2007. Characterization and expression of a vacuolar Naþ/Hþ antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus littoralis.* Environmental and Biological Science, 9: 745-753.
38. Zhao, G.Q. and C. Z. Ren. 2007. Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence and ion content of Naked oat in response to salinity. Crop Science, 47: 123-131.
39. Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance, Trends Plant Science, 6(1): 66-71.
40. Zouari, N., R. Ben Saad, T. Legavreb, J. Azazaa, X. Sabau, M. Jaouaa, K. Masmoudia and A. Hassairia. 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass Aeluropus littoralis. Plant Molecular Genetics, 2: 103-106.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

Physiological and Genetic Responses of Halophyte *Aeluropus Littoralis* to Salinity

Behzad Shahin Kaleybar[1], Ghorbanali Nematzadeh[2], Seyed Hamid Reza hashemi[3], Hossein Askari[4] and Sara Kabirnataj[5]

1- Former M.Sc. Student, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan
(Corresponding author: Shahin.bio65@gmail.com)
2- Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3 and 5- M.Sc. and Former M.Sc. Student, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute Tabarestan
4- Assistant Professor, University of Shahid Beheshti
Received: February 4, 2012 Accepted: October 14, 2012

Abstract

Salinity stress causes ionic and osmotic stress resulting in cell death, inhibition of growth and ultimate adverse reducing crop productivity. In present study mechanism of salinity tolerance of *Aeluropus littoralis* under treatment of sodium chloride in four levels of salinity (120, 250, 450 and 600 mM) were investigated by cDNA-AFLP profiling. Salinity reduced the shoot growth, shoot to root ratio and Chlorophyll content and gene silencing was raised with increasing salinity. In 250 mM of salinity the plants had the highest physiological growth and the maximum number of expressed TDFs and also the greatest quality variance than control comparing to other levels of salinity. The results indicated that plants have the best response to salinity in the 250 mM of salinity and this level is appropriate to reveal mechanism of salt tolerance in this halophyte. Seems to silencing of genes that are active in control level, activation of some genes that are silence in control level, reduction expressed TDFs, reduction in Shoot to root ratio and a subsequent reduction in plant growth by salinity treatment is the common mechanism for salinity tolerance in this halophyte so that induction of salinity tolerance by expression of these silenced genes cause increase of growth in stress condition even than control.

Keywords: Differential gene expression, Salinity stress, Halophyte, *Aeluropus littoralis*, cDNA-AFLP

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-13]