



جداسازی و بررسی بیان ژن AISOS1 در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* Parl. تحت تنش شوری ناشی از کلرید سدیم

ولی اله قاسمی عمران^۱، عبدالرضا باقری^۲، قربانعلی نعمت زاده^۳، امین میرشمسی^۴ و نادعلی بابائیان جلودار^۵

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد، (نویسنده مسؤول: ghasemiomran@yahoo.com)

۲ و ۴- استاد و استادیار، دانشگاه فردوسی مشهد

۳ و ۵- استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۱

چکیده

ژن آنتی پورترسديم/پروتون SOS1 از گیاه آلوروپوس تحت تنش شوری ناشی از کلرید سدیم جداسازی شد. CDNA جداسازی شده با طول ۲۹۸۱ جفت باز بوده و حاوی چارچوب قرائت آزاد فرضی ۳۴۳۸ جفت بازی می‌باشد. توالی آمینواسیدی SOS1 مشابهت بالایی با ترانسپورترهای گیاهی SOS1 نشان می‌دهد. پیش‌بینی می‌شود AISOS1 دارای ۱۲ ناحیه فراغشایی فرضی در انتهای آمینی و دم طویل آبگریز سیتوپلاسمی در انتهای اسیدی باشد. در این مطالعه، الگوی بیان این ژن در پاسخ به تیمار شوری ۲۵۰ میلی‌مولار ۶ ساعت، ۱، ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن AISOS1 در بافت برگ پس از ۶ ساعت افزایش یافت در بافت گره و میانگرمه سطوح نسخه‌برداری ژن AISOS1، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش به حداکثر خود رسید و سپس در ۳ و ۸ روز بعد از اعمال تنش به تدریج کاهش یافت تا در نهایت ۱۷ روز پس از تنش به حالت پایدار شاهد بدون تنش بازگشت. میزان بیان این ژن در بافت‌های ریشه به آهستگی بعد از اعمال تنش افزایش یافت و پس از ۳ روز به میزان حداکثر رسید و این میزان بیان تا ۸ روز پس از تنش ادامه یافت و پس از ۱۷ روز همچنان بیان دو برابر شاهد بود.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، *Aeluropus littoralis*، AISOS1، بیان ژن

مقدمه

دور، بازجذب یون توسط پروتئین‌های HKT در بافت‌های گیاهی ویژه و حجره‌بندی واکوئولی در محور گیاه و در برگ‌های مسن‌تر می‌باشد (۳۸،۲۰،۱۸). در درون سلول‌های گیاهی غلظت‌های سدیم سیتوزولی عموماً توسط حجره‌بندی یا دفع سدیم در سطح غیر سمی نگه داشته می‌شود (۳). در محیط‌های شور، حجره‌بندی یون‌هایی که بطور بالقوه برای سوخت و ساز سلولی آسیب‌رسان هستند (بطور مثال یون‌های کلرید و سدیم) راهکار موثری جهت سمیت‌زدایی یونی فراهم می‌آورد و در عین حال نسبت بالای پتاسیم به سدیم را در سیتوزول حفظ می‌کند. بعلاوه، انباشتگی یون‌ها در داخل واکوئل فشار اسمزی در جهت بهبود جذب آب را فراهم می‌نماید (۲۰). آنتی پورترهای واکوئولی سدیم/پروتون پروتئین‌های غشایی هستند که تبادل سدیم را در مقابل پروتون در غشاهای تونوپلاستی تحت گرادیانت الکتروشیمیایی پروتون تولید شده توسط H-ATPase و H-PPase کاتالیز می‌کنند (۳۴،۳۰،۲). بیش بیان ژن آنتی پورتر واکوئولی سدیم/پروتون گیاه آرابیدوپسیس (AtNHX1) منجر به افزایش مقاومت به شوری در گیاهان تراریخته کلزا (۳۴)، گوجه‌فرنگی (۳۵) و گندم (۳۲) شد. از طرف دیگر، مسیر وابسته به کلسیم SOS که تنظیم‌کننده تعادل یونی سدیم و پتاسیم و

شوری و به‌طور عمده کلرید سدیم، رشد گیاهان را محدود نموده و سبب کاهش تولیدات کشاورزی می‌گردد. در بسیاری از گیاهان بویژه غلات، یون سدیم علت اصلی آسیب ویژه یونی محسوب می‌شود (۲۷). بدلیل اینکه سدیم فراوان‌ترین کاتیون در خاک‌های شور بشمار می‌رود و از لحاظ شیمیایی شباهت بسیار زیادی به یون پتاسیم دارد، سمیت سدیم سیتوزولی اغلب با کمبود پتاسیم همراه است (۲۰). بسیاری از آنزیم‌های سیتوزولی با یون پتاسیم فعال می‌شوند و توسط یون سدیم مهار می‌گردند (۶). سدیم در غلظت‌های بالا، به دلیل اثرات مضر روی جذب مواد معدنی و آب، فعالیت‌های آنزیمی، فتوسنتز و سوخت و ساز برای گیاه سمی است (۱۸). حساسیت به شوری آنزیم‌های سیتوزولی هم در گیاهان حساس به شوری و هم در گیاهان شور پسند مشابه است و بیانگر این نکته است که نگهداری نسبت پتاسیم به سدیم در سطح غلظتی بالا، به‌عنوان پیش نیاز کلیدی رشد گیاه در شرایط شوری بالا به‌شمار می‌رود (۹). گیاهان از راهکارهای متفاوتی با هدف جلوگیری از تجمع سدیم اضافی استفاده می‌نمایند که شامل بهبود جذب یون توسط ریشه، بارگیری در آوند چوبی جهت توزیع در فواصل

مولکولی آنتی پورترهای Na^+/H^+ واکوئلی این گیاه توسط ژانگ و همکاران (۳۶) صورت گرفته است. این محققان ژن آنتی پورتر Na^+/H^+ واکوئلی AINHX را جداسازی نموده و با بیان بیش از حد آن در گیاه توتون موفق به افزایش مقاومت به شوری در گیاهان تراریخته شدند. در مورد بررسی نقش احتمالی آنتی پورترهای Na^+/H^+ غشای پلاسمایی این گیاه در ایجاد مقاومت به شوری تاکنون تحقیقی صورت نگرفته است. لذا این تحقیق با هدف جداسازی، شناسایی و بررسی بیان ژن آنتی پورتر غشایی تحت تنش شوری صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

بذرهای گیاه آلورپوس از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری شده و درون ماسه شسته شده تحت شرایط ۸/۱۶ روشنایی/تاریکی، دمای روز/شب ۲۵/۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۸۰ درصد در گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان کشت شدند. گیاهچه‌ها هر سه روز یک بار با محلول ۱/۲ هوگلند آبیاری شدند. پس از یک ماه، گیاهچه‌ها به گلدان‌های ۲۰ لیتری حاوی ۱/۲ هوگلند که بخوبی هوادهی می‌شدند، انتقال یافتند. حدود ۳ هفته بعد گیاهچه‌ها تحت تیمار شوری ۲۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند.

جداسازی ژن AISOS1 و تجزیه و تحلیل توالی

گیاهچه‌های دو ماهه با محلول ۱/۲ هوگلند حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به مدت ۳ روز مورد تیمار قرار گرفتند. RNA کل با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini شرکت Qiagen استخراج شد. در مراحل استخراج RNA از هضم DNase روی ستون (On-Column DNase Digestion) استفاده شد. جهت ساخت رشته اول cDNA از کیت سنتز رشته اول cDNA شرکت Fermentaz استفاده شد. PCR نسخه‌برداری معکوس با استفاده از پرایمرهای دجنره زیر انجام پذیرفت:

پرایمر رفت

(5'-GCTGCRITTTCTYCGYGCWCATA-3')

و پرایمر برگشت

(5'-CCAGTTGGCYTTGARCCYTC-3')

که بر اساس نواحی حفاظت شده آنتی پورتر غشایی سدیم/پروتون از گیاهان دیگر طراحی شده بود. سپس این دو پرایمر دجنره جهت تکثیر PCR با استفاده از شرایط چرخه دمایی زیر به واکنش PCR اضافه شدند: واسرشته‌سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و اتصال در ۵۵ درجه

انتقال دور برد سدیم می‌باشد، در گیاه آرابیدوپسیس گزارش شده است. در مسیر SOS پروتئین متصل‌شونده 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 ترانسپورتر سدیم/پروتونی SOS1 توسط کمپلکس SOS2-SOS3 فراهم شود (۳۹،۲۲). پروتئین آنتی پورتر سدیم/پروتون SOS1، پروتئین غشای پلاسمایی ۱۲۷ کیلو دالتونی با ۱۲ دومین فراغشایی فرضی در انتهای آمینی و دنباله بلند سیتوپلاسمی آبدوست در انتهای اسیدی می‌باشد (۲۳). یکی از کارکردهای آنتی پورتر سدیم/پروتون در غشای پلاسمایی دفع سدیم از سلول‌هاست (۳). ژن‌های SOS1 از گیاهان حساس به شوری نظیر برنج (OsSOS1 و OsNHA1) (۳۷،۱۴)، گندم نانویی (TaSOS1) (۳۳) *Phragmites australis* (PhaNHA1-u) (۲۶) و همچنین گیاهان مقاوم به شوری نظیر *Thellungiella halophila* (ThSOS1) (۱۹)، *Cymodocea nodosa* (CnSOS1A) و *Chenopodium quinoa* (CnSOS1B) (۸)، *Phragmites australis* (cqSOS1B) و (۱۵) (PhaNHA1-n) (۲۶) شناسایی شده است. از آنجایی که گیاهان هالوفیت تک لپه قادر به رشد و تحمل شرایط شوری بالا هستند، می‌توانند به‌عنوان بهترین ابزار جهت درک اساس مولکولی آنتی پورترها به‌شمار آمده و نقش احتمالی آنها را در مقاومت به شوری آشکار سازند. به‌علاوه از آنجایی که بسیاری از گیاهان مهم از لحاظ کشاورزی گیاهان تک لپه گلکوفیت هستند، مطالعه ژن‌های ویژه از گیاهان خویشاوند نزدیک می‌تواند به‌عنوان روش موثری جهت بهبود مقاومت به شوری این گونه محصولات با استفاده از فناوری‌های ژنتیک نوین باشد. *Aeluropus litoralis* Parl. گیاه هالوفیت تک لپه و چند ساله می‌باشد که بومی ایران بوده و می‌تواند کلرید سدیم تا میزان ۶۰۰ میلی‌مولار را تحمل نماید. این گیاه از لحاظ فتوسنتزی گیاهی C_4 محسوب شده و در خاک‌های شور ساحلی و بیابانی با بارندگی کمتر از ۲۰۰ میلی‌متر در سال رشد می‌یابد (۲۹،۱۳،۱۰). این گیاه دیپلوئید بوده و دارای ژنوم نسبتاً کوچک در حدود ۳۴۲ مگا جفت باز می‌باشد. علاوه بر مقاومت به شوری، آلورپوس به‌عنوان گیاهی مقاوم به خشکی و گرما نیز محسوب می‌شود (۴۰). با وجود این شرایط آلورپوس می‌تواند به‌عنوان منبع ژنتیکی غنی جهت درک مکانیزم‌های مرتبط با مقاومت به شوری، خشکی و گرما در جهت بهبود مقاومت به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان زراعی مهم به لحاظ اقتصادی مورد استفاده قرار بگیرد. در همین راستا تلاش‌هایی در جهت درک اساس

صورت پذیرفت. RNA کل از نمونه‌های فریز شده برگ، ریشه و گره و میانگرم گیاهان شاهد و گیاهان تحت تنش با استفاده از کیت Trizol (شرکت Invitrogen) مطابق با دستورالعمل شرکت صورت پذیرفت. یکپارچگی و صحت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ارزیابی شد. قبل از نسخه‌برداری معکوس جهت حذف باقیمانده احتمالی DNA ژنومی نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I تیمار شدند (شکل ۳).

جهت ساخت رشته اول cDNA از کیت سنتز رشته اول cDNA شرکت Fermentaz با نسخه‌برداری معکوس ۲ میکروگرم RNA در حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر مطابق دستورالعمل شرکت استفاده شد. ترکیب واکنش PCR شامل یک میکرولیتر از cDNA تا ۸ برابر رقیق شده، ۵ میکرولیتر QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (شرکت Qiagen) یک میکرومولار از هر پرایمر اختصاصی ژن در ۱۰ میکرولیتر حجم نهایی واکنش بود. برای هر جفت پرایمر واکنش PCR با شاهد بدون الگو نیز انجام شد. پرایمرهای اختصاصی AISOS1 که بر اساس توالی جدا سازی شده طراحی شدند به قرار زیر بود:

پرایمر رفت
(5'-CAGCTTACTGGGGAATGCTC-3')
و پرایمر برگشت
(5'-ACTTGGGAAGTGGACACTGG-3')
که باندی به اندازه ۱۴۸ جفت باز را تکثیر می‌کند.
جفت پرایمر رفت
(5'-TTGCTGGCCGAGACCTTAC-3')

و برگشت
(5'-GGCGAGCTTTTCCTTGATG-3')
جهت تکثیر ژن اکتین آلوروپوس مورد استفاده قرار گرفت که به عنوان کنترل داخلی بکار رفت و باندی به اندازه ۱۱۳ جفت باز را تکثیر می‌کند. واکنش‌های PCR مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. واکنش شامل مرحله واسرشته سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و اتصال و بسط تلفیقی در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. جهت اطمینان از صحت تکثیر محصولات اختصاصی چرخه‌های منحنی ذوب با پارامترهای زیر در ادامه صورت پذیرفت: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۸۰ چرخه ۵۵ درجه سانتی‌گرادی به مدت ۱۰ ثانیه با ۰/۵ درجه سانتی‌گراد افزایش دما در هر چرخه. منحنی ذوب با استفاده از فلوروسنت سایبرگرین هیچ ساختار سنجاق سری یا شکل‌گیری لوپ را در واکنش PCR شناسایی نکرد. محصولات تکثیر Real time PCR روی ژل آگارز بارگزاری شد تا وجود باند صحیح و منفرد تایید گردد. سه تکرار برای هر آزمایش در نظر گرفته

سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه صورت پذیرفت. محصول تکثیر شده از روی ژل آگارز تلخیص شده و با استفاده از کیت InsTAclone™ PCR Cloning مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Fermentaz) به درون وکتور pTZ57R/T شرکت Fermentaz متصل شده و توالی‌یابی گردید. بر اساس این توالی ۴۵۰ جفت بازی، چهار پرایمر دیگر طراحی شد تا cDNA با طول کامل با استفاده از کیت Smarter RACE cDNA Amplification شرکت Clontech تکثیر شود: پرایمرهای رفت شامل

GSP2
(5'-GATGTTTCGAGTTACATTCACAGGTGC-3')
NGSP2
(5'-CGGCAAGTAACATACTCGGTATTGACGC-3')
و پرایمرهای برگشت شامل

GSP1
(5'-CGGTGGTGGTTTCGCTCTCAACTTCTTC-3')
NGSP1 و
(5'-CTGTTTCAGGCAGCGCCCCAAC-3')
بودند. ساخت رشته اول cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA کل و پرایمرهای فراهم شده توسط کیت بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. برای 3'RACE، ۵ میکرولیتر از 3' RACE-Ready cDNA به عنوان الگو به همراه پرایمر GSP2 و پرایمر UPM موجود کیت مورد استفاده قرار گرفت. قطعه PCR ۲ کیلو جفت بازی بدست آمده به درون pTZ57R/T شرکت Fermentaz همسانه‌سازی شده و به طور کامل توالی‌یابی گردید. برای 5'RACE، ۵ میکرولیتر از 5' RACE-Ready cDNA به عنوان الگو به همراه پرایمر GSP1 و پرایمر UPM موجود کیت مورد استفاده قرار گرفت. محصول PCR تلخیص و توالی‌یابی شد. توالی‌های بدست آمده از 5' RACE و 3' RACE کنار هم قرار داده شد تا طول کامل ژن AISOS1 بدست آید (این توالی در کتابخانه داده‌های NCBI تحت شماره دستیابی HQ329792 ثبت گردید).

بررسی بیان

جهت ارزیابی الگوی تغییر یافته ژن AISOS1 پس از در معرض تنش شوری قرار گرفتن گیاه آلوروپوس، آزمایش Real Time PCR صورت پذیرفت. بدین منظور گیاهچه‌های یک ماهه به گلدان‌های ویژه حاوی محلول ۱/۲ هوگلند که به خوبی هواده می‌شدند منتقل شده و پس از ۳ هفته تحت تنش ۲۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم قرار گرفتند. جهت اعمال تنش از روش پاساژدهی استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا گیاهان تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار قرار گرفتند و سپس ۲۴ ساعت بعد ۱۵۰ میلی‌مولار دیگر به غلظت اولیه اضافه شد. نمونه برداری از گیاهان تنش یافته ۰، ۶ ساعت، ۱، ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش

شورپسند آلوروپوس صورت گرفته است تا عکس العمل این ژن در پاسخ به شوری بررسی و مطالعه گردد. طول کامل cDNA SOS1 گیاه آلوروپوس با استفاده از RACE PCR بدست آمد (شماره دستیابی HQ329792). توالی نوکلئوتیدی با طول ۳۹۸۱ جفت باز متشکل از ۲۳۱ جفت باز ناحیه ترجمه نشده ۵' (UTR 5') و ۳۱۰ جفت باز ناحیه ترجمه نشده ۳' (UTR 3') می باشد. چارچوب قرائت آزاد فرضی ژن AISOS1 پروتئینی با ۱۱۴۶ آمینواسید کد می نماید که دارای جرم مولکولی تئوریک ۱۲۷ کیلودالتون می باشد. پروتئین پیش بینی شده به ترتیب دارای ۶۱، ۷۷ و ۸۲ درصد مشابهت در توالی آمینواسیدی با گیاهان *Phragmites australis*، برنج و *Arabidopsis* بوده (شکل ۱) و ویژگی های عمومی مشترکی از جمله ۱۲ ناحیه فراغشایی، دم طویل سیتوپلاسمی، دومین تبادل سدیم/ پروتون و دومین فرضی اتصال نوکلئوتید حلقوی که در مرکز دم طویل انتهای C قرار دارد، می باشد (مطابق نرم افزار TMHMM) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

شد. سیگنال های فلورسنت در هر مرحله پلیمریزاسیون در دستگاه C1000™ Thermal Cycler شرکت Biorad جمع آوری شد. مقادیر آستانه ای (C_T) توسط نرم افزار داخلی دستگاه مطابق فرمول $2^{-(\Delta CT \text{ Target} - \Delta CT \text{ actin})}$ با ΔC_T مقایسه مقادیر C_T ژن اکتین و ژن AISOS1 حاصل از cDNA مشابه به عنوان الگو محاسبه شد.

نتایج و بحث

فرایندهای انتقالی که خروج یون از سلول را تنظیم می نمایند از یک سو و جرحه بندی واکوئلی از سوی دیگر، در کاهش تجمع سدیم در سیتوزول گیاهی نقش حیاتی دارند. در گیاهان عالی دفع سدیم از سیتوزول بواسطه آنتی پورترهای موجود در غشاهای پلاسمایی انجام می شود (۱۶، ۱۱، ۷، ۳۹). بیش بیان آنتی پورتر سدیم/ پروتون غشای پلاسمایی AtSOS1 گیاه *Arabidopsis* مقاومت به شوری را در گیاهان تراریخته به دنبال داشته است (۲۵). این موضوع منعکس کننده نقش کلیدی آنتی پورترهای سدیم/ پروتون در مقاومت به شوری می باشد. به همین دلیل این تحقیق با هدف جداسازی، شناسایی و بررسی بیان این ژن مهم در گیاه

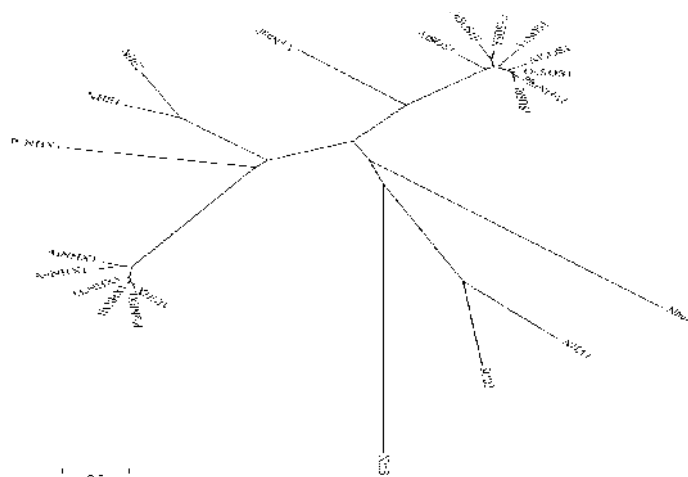
AISOS1	1	MSSSSSSEPEFDDAVIFVGVSLVLOIASRHLLRQTRVFTYVALLVIGVALQSLVYQTKHSLQKLGTD	07
PhaNH1	1	MSSSSSSEPEFDDAVIFVGVSLVLOIASRHLLRQTRVFTYVALLVIGVALQSLVYQTKHSLQKLGTD	00
OsSOS1	1	MDNF...EAEFDDAVLFVGVSLVLOIASRHLLRQTRVFTYVALLVIGVALQSLVYQTKHSLQKLGTD	04
TaSOS1	1	METGEAQSSEPEFDDAVLFVGVSLVLOIASRHLLRQTRVFTYVALLVIGVALQSLVYQTKHSLQKLGTD	07
AISOS1	08	IRIWANINFDLLAVFLPALLFES3F3MEIHQIKRCMAQNMVLLAOPQVVIISTFLLQTAVKLTFFYNW	134
PhaNH1	01	IRIWANINFDLLAVFLPALLFES3F3MEIHQIKRCMAQNMVLLAOPQVVIISTFLLQTAVKLTFFYNW	127
OsSOS1	05	IRIWANINFDLLAVFLPALLFES3F3MEIHQIKRCMAQNMVLLAOPQVVIISTFLLQTAVKLTFFYNW	131
TaSOS1	08	IRIWANINFDLLAVFLPALLFES3F3MEIHQIKRCMAQNMVLLAOPQVVIISTFLLQTAVKLTFFYNW	134
AISOS1	135	NWKTSLLLQGLSATDPVAVVALLKELQASKKLSITIEQESLMNDGTAVVYQLFYRMVLTQTFDAQ	201
PhaNH1	128	NWKTSLLLQGLSATDPVAVVALLKELQASKKLSITIEQESLMNDGTAVVYQLFYRMVLTQTFDAQ	194
OsSOS1	132	NWKTSLLLQGLSATDPVAVVALLKELQASKKLSITIEQESLMNDGTAVVYQLFYRMVLTQTFDAQ	198
TaSOS1	135	NWKTSLLLQGLSATDPVAVVALLKELQASKKLSITIEQESLMNDGTAVVYQLFYRMVLTQTFDAQ	201
AISOS1	202	QVTKFLTEVSLQAVALLQAFQIASVWLQFIFNDTIEIALTAVSYIAFFTAQDALEVSQVLTVM	208
PhaNH1	195	QVTKFLTEVSLQAVALLQAFQIASVWLQFIFNDTIEIALTAVSYIAFFTAQDALEVSQVLTVM	201
OsSOS1	199	QVTKFLTEVSLQAVALLQAFQIASVWLQFIFNDTIEIALTAVSYIAFFTAQDALEVSQVLTVM	205
TaSOS1	202	QVTKFLTEVSLQAVALLQAFQIASVWLQFIFNDTIEIALTAVSYIAFFTAQDALEVSQVLTVM	208
AISOS1	209	LQMFYAAFAKTAFAKQESQTSLLHFWEMVAYIANTLIFILSQVVIADQVLENNVHFERHQTSGWGLLV	335
PhaNH1	202	LQMFYAAFAKTAFAKQESQTSLLHFWEMVAYIANTLIFILSQVVIADQVLENNVHFERHQTSGWGLLV	328
OsSOS1	200	LQMFYAAFAKTAFAKQESQTSLLHFWEMVAYIANTLIFILSQVVIADQVLENNVHFERHQTSGWGLLV	332
TaSOS1	209	LQMFYAAFAKTAFAKQESQTSLLHFWEMVAYIANTLIFILSQVVIADQVLENNVHFERHQTSGWGLLV	335
AISOS1	330	LYVFGVLSRIVGVVGVLYPLLRIFCYGMDIKCATVLVWSGLRCAVALSLSVKRAADSVQTYLKFED	402
PhaNH1	329	LYVFGVLSRIVGVVGVLYPLLRIFCYGMDIKCATVLVWSGLRCAVALSLSVKRAADSVQTYLKFED	395
OsSOS1	333	LYVFGVLSRIVGVVGVLYPLLRIFCYGMDIKCATVLVWSGLRCAVALSLSVKRAADSVQTYLKFED	399
TaSOS1	336	LYVFGVLSRIVGVVGVLYPLLRIFCYGMDIKCATVLVWSGLRCAVALSLSVKRAADSVQTYLKFED	402
AISOS1	403	QTMFVFTTCCIVFLTLINCGSTTQGLLILLCGLDPLKLSAATKRLILNYTRYCMLNKALCAFGDLRDDCC	469
PhaNH1	396	QTMFVFTTCCIVFLTLINCGSTTQGLLILLCGLDPLKLSAATKRLILNYTRYCMLNKALCAFGDLRDDCC	462
OsSOS1	400	QTMFVFTTCCIVFLTLINCGSTTQGLLILLCGLDPLKLSAATKRLILNYTRYCMLNKALCAFGDLRDDCC	466
TaSOS1	403	QTMFVFTTCCIVFLTLINCGSTTQGLLILLCGLDPLKLSAATKRLILNYTRYCMLNKALCAFGDLRDDCC	469
AISOS1	470	QPADWATVKKYITGLNDLDEPVIIPAVSDRNRDMITMNLRLIRVRLNCGVQAAYWMLCCCRITD	534
PhaNH1	463	QPADWATVKKYITGLNDLDEPVIIPAVSDRNRDMITMNLRLIRVRLNCGVQAAYWMLCCCRITD	520
OsSOS1	467	QPADWATVKKYITGLNDLDEPVIIPAVSDRNRDMITMNLRLIRVRLNCGVQAAYWMLCCCRITD	530
TaSOS1	470	QPADWATVKKYITGLNDLDEPVIIPAVSDRNRDMITMNLRLIRVRLNCGVQAAYWMLCCCRITD	535
AISOS1	535	GTANILMRSDVDCAMLDVSGGLDQWKLQSSVGFNNYRFLQMSGLRPLRLITYTVERLCGGYICG	601
PhaNH1	529	GTANILMRSDVDCAMLDVSGGLDQWKLQSSVGFNNYRFLQMSGLRPLRLITYTVERLCGGYICG	595
OsSOS1	534	GTANILMRSDVDCAMLDVSGGLDQWKLQSSVGFNNYRFLQMSGLRPLRLITYTVERLCGGYICG	600
TaSOS1	536	GTANILMRSDVDCAMLDVSGGLDQWKLQSSVGFNNYRFLQMSGLRPLRLITYTVERLCGGYICG	602
AISOS1	602	ATFLAIRIARRQLIDFLQDSEVARIVDEGNACGCEARKFLEDVRIITFPQVLRVLKTRQVTVSVLTI	660
PhaNH1	598	ATFLAIRIARRQLIDFLQDSEVARIVDEGNACGCEARKFLEDVRIITFPQVLRVLKTRQVTVSVLTI	662
OsSOS1	601	ATFLAIRIARRQLIDFLQDSEVARIVDEGNACGCEARKFLEDVRIITFPQVLRVLKTRQVTVSVLTI	667
TaSOS1	603	ATFLAIRIARRQLIDFLQDSEVARIVDEGNACGCEARKFLEDVRIITFPQVLRVLKTRQVTVSVLTI	669
AISOS1	689	LSEYIENLQKTGLLEEKQVHLDLQALQTLKLLKRNFPVLMKPRVSGELNNHPLV	723
PhaNH1	683	LSEYIENLQKTGLLEEKQVHLDLQALQTLKLLKRNFPVLMKPRVSGELNNHPLV	717
OsSOS1	680	LSEYIENLQKTGLLEEKQVHLDLQALQTLKLLKRNFPVLMKPRVSGELNNHPLV	722
TaSOS1	679	LSEYIENLQKTGLLEEKQVHLDLQALQTLKLLKRNFPVLMKPRVSGELNNHPLV	724

شکل ۱- هم ردیفی توالی اسید آمینه AISOS1 از گیاه آلوروپوس، PhNHA1 از گیاه *Phragmites australis*، OsSOS1 از برنج و TaSOS1 از گندم نانوا. هم ردیفی توالی ها با استفاده از نرم افزار MEGA انجام شده است. پس زمینه سیاه و خاکستری به ترتیب نمایانگر اسید آمینه های یکسان و مشابه می باشد. توالی داخل کادر مربوط به قطعات فراغشایی فرضی ترانسپورترها می باشد که توسط نرم افزار TMPRED موجود در آدرس اینترنتی http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html محاسبه شده است.

فرنگی نشان می‌دهد. ارتباط بین این کلاسترها با توزیع فیلوژنتیکی آنها سازگاری داشت. شکل ۲ نشان می‌دهد که AISOS1 با آنتی پورترهای سدیم/پروتون غشای پلاسمایی شامل SOD2، NHA1، NhaA و NhaP تا حدودی شباهت دارد. بیشترین شباهت AISOS1 به توالی ترانسپورتری NhaP متعلق به بیماری عامل و با بوده است. در این درخت فیلوژنتیکی SOD2 و NHA1 به ترتیب در غشای پلاسمایی *Saccharomyces pombe* و *S. cerevisiae* فعال بوده و وظیفه دفع یون سدیم از سیتوزول به فضای فراسلولی را عهده‌دار می‌باشند (۵، ۲۱). NhaA و NhaP آنتی پورترهای سدیم/پروتون هستند که به ترتیب نقش مهمی در دفع یون سدیم در *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* دارند. بدون شک آنتی پورتر سدیم/پروتون گیاه آلروپوس به کلاستر فیلوژنتیکی ترانسپورترهای گیاهی SOS1 تعلق دارد و با آنتی پورترهای سدیم/پروتون واکوئلی نظیر AtNHX، NHX1 یا NHE6 از جمله AINHX از گیاه آلروپوس گروه‌بندی نمی‌شود. AtNHX در تونوپلاست فعالیت می‌کند جایی که در آن یون سدیم را در داخل واکوئل سلول‌های آرابیدوپسیس حیره‌بندی می‌نماید (۱). NHX1 نقش مهمی در انتقال یون سدیم به بخش پیش واکوئلی مخمر بازی می‌کند (۱۷). NHE6 انسانی در اندوزوم ترش‌جی جای دارد (۴). این داده‌ها نشان می‌دهد که AISOS1 احتمالاً یک آنتی پورتر سدیم/پروتون در غشای پلاسمایی گیاه آلروپوس می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود که AISOS1 در دفع یون سدیم از سیتوزول به فضای خارج سلولی و بنابراین جلوگیری از تجمع سریع یون سدیم در سیتوپلاسم نقش داشته باشد و به نوبه خود می‌تواند نقش مهمی در مقاومت به شوری گیاه آلروپوس بازی کند.

در آنتی پورترهای سدیم/پروتون غشای پلاسمایی گیاهی، دم بلند سیتوپلاسمی نشان می‌دهد که این ترانسپورتر ممکن است توسط سیگنال‌های مختلفی تنظیم شود و حتی این امکان وجود دارد که علاوه بر فعالیت آنتی پورتری نقش‌های دیگری نیز داشته باشد. پیشنهاد شده است که دم بلند سیتوپلاسمی در SOS1 با پروتئین‌های تنظیم‌کننده مختلفی نظیر RCD1 که تنظیم‌کننده پاسخ‌های تنش اکسیداتیو است، برهم کنش داشته باشد (۱۲). به نظر می‌رسد در آرابیدوپسیس SOS1 در کنترل دوربرد انتقال یون سدیم از ریشه‌ها به ساقه‌ها نقش داشته باشد و احتمالاً در بازیابی یون سدیم از آوند چوب تحت تنش شدید شوری عمل نماید (۲۴). نتایج مطالعه این ژن در گیاه نی نشان می‌دهد که SOS1 ممکن است در مکانیزم مسدود نمودن انتقال یون سدیم از ریشه‌ها به ساقه‌ها دخیل باشد (۲۶).

توالی ترجمه شده cDNA درجه بالایی از شباهت با آنتی پورترهای سدیم/پروتون گیاهان دیگر نشان داد. مقایسه بین پروتئین SOS1 گیاه آلروپوس و پروتئین گونه‌های دیگر که توالی کامل آنها موجود بود صورت گرفت تا روابط فیلوژنتیک پروتئین SOS1 با پروتئین‌های همولوگ SOS1 سایر گونه‌هایی گیاهی مشخص شود. درخت فیلوژنتیک به درستی رده‌های بسیار نزدیک بهم را در مکان‌های مناسب جداسازی نمود و به وضوح توالی SOS1 آلروپوس را در کنار سایر گونه‌های خانواده گندمیان قرار داد (شکل ۲). گیاهان *Phragmites australis*، برنج، گندم و گونه‌های تک لپه متعلق به خانواده گندمیان می‌باشند و همانطور که انتظار می‌رود آنتی پورتر آلروپوس به لحاظ فیلوژنتیکی به برنج، گندم و *Phragmites australis* نزدیکی بیشتری در مقایسه با آرابیدوپسیس و گوجه



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی آنتی پورترهای سدیم/پروتون. این درخت با استفاده از نرم افزار MEGA و توالی ترجمه شده ژن های آنتی پورتر سدیم/پروتون ساخته شده است. شماره های دستیابی (داخل پرانتز) و منشا آنتی پورترهای سدیم/پروتون مربوطه به قرار زیر است:

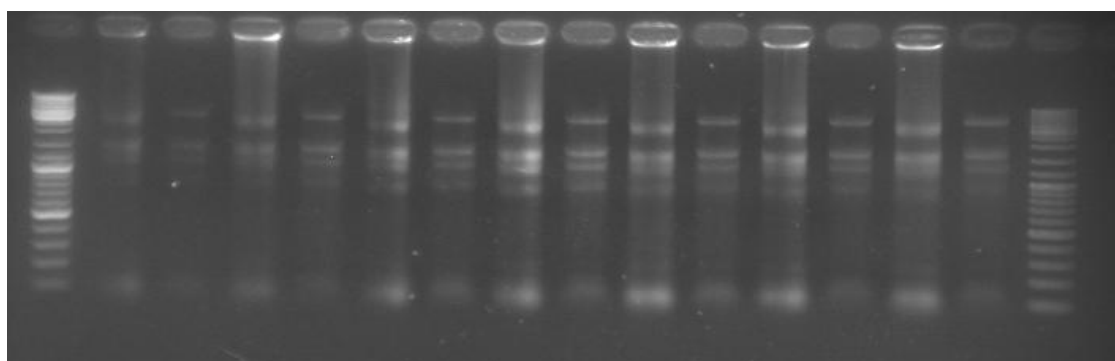
AgNHX1 (AB038492), Atriplex gmelini; AINHX (AAV80466), AISOS1 (ADP08982), Aeluropus littoralis; AtNHX1 (AF510074), AtSOS1 (AF256224), Arabidopsis thaliana; HvNHX1 (AB089197), Hordeum vulgare; LeSOS1 (AJ717346), Lycopodium esculentum; PcNHX1 (AB211145), PcNHA (BAF41924) Phragmites australis; NHX1 (NP010744), Saccharomyces cerevisiae; PcNHX1 (AAG38538), Pneumocystis carin; NHE1 (P19634), NHE2 (AAD41635), Homo sapiens; CnSOS1A (CAD20320), CnSOS1B (AM399078), Cymodocea nodosa; OsNHA1 (AY328087), OsSOS1 (AY785147), Oryza sativa; TaSOS1 (AY326952), Triticum aestivum; PeNhaD1 (AJ561195), Populus euphratica; NHA1 (NP-013239), Saccharomyces cerevisiae; SOD2 (CAA77796), Schizosaccharomyces pombe; NhaA (P13738), NhaB (P27377), Escherichia coli.

mRNA در برگ های گیاه مقاوم به شوری آلروپوس با افزایش زمان تحت تنش شوری ۲۵۰ میلی مولار به شدت افزایش پیدا کرد.

به این صورت که پس از ۶ و ۲۴ ساعت به بالاترین میزان خود رسید (حدود ۴ برابر). بیان این ژن در ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش به حالت معمول خود یعنی مشابه با شاهد بدون تنش برگشت (شکل ۴).

جهت ارزیابی الگوهای بیان ژن AISOS1 در گیاه آلروپوس تحت تنش شوری، RNA کل از نمونه های بافت برگ، ریشه و گره و میانگره گیاهچه های دو ماهه استخراج شد.

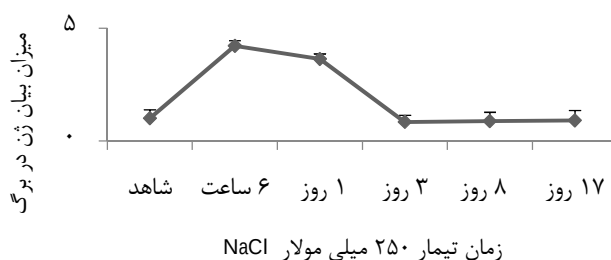
اثرات کلرید سدیم روی بیان این ژن ها در بافت های مورد نظر پس از ۶ و ۲۴ ساعت، ۳، ۸ و ۱۷ شبانه روز تیمار شوری مورد بررسی قرار گرفت. میزان نسبی



شکل ۳- الکتروفورز RNA کل به ترتیب قبل و بعد از تیمار DNase روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در نمونه بافت برگ. ستون اول و آخر مربوط به نشانگر استاندارد مولکولی ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاز می باشد.

بیان بالا ادامه داشت و در روز ۱۷ پس از تنش مشابه حالت یک روز پس از تنش در حدود دو برابر بیان شاهد ثابت باقی ماند (شکل ۵).

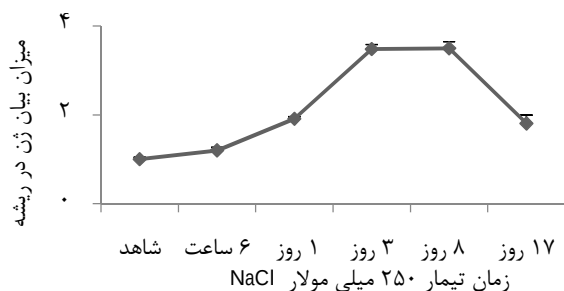
در ریشه گیاهان آلروپوس بیان ژن AISOS1 تحت تنش شوری ۲۵۰ میلی مولار در روز اول پس از تنش حدودا دو برابر شد و در روز سوم پس از تنش به ۳/۵ برابر حالت عادی رسید و تا ۸ روز پس از تنش این



شکل ۴- فراوانی نسبی mRNA ژن AISOS1 در برگ‌های گیاه آلوروپوس در پاسخ به تنش شوری میزان بیان در ابتدای تیمار شوری (شاهد بدون اعمال تنش) روی عدد ۱ تنظیم شد. سطوح بیان سایر زمان‌های نمونه برداری به عنوان درصدی از میزان بیان در ابتدای تیمار شوری بیان شده است.

شاهد بود. در روز ۱۷ بیان به حالت عادی مشابه شاهد بازگشت. این افزایش بیان در نمونه‌های مختلف گیاه آلوروپوس در تکرارهای بیولوژیکی آزمایش تکرارپذیر بوده است (شکل ۶).

در بافت گره و میانگه بیان ژن تا ۶ ساعت پس از تنش تغییر چندانی پیدا نکرد و به حدود ۱/۵ برابر رسید. در روز اول، سوم و هشتم پس از تنش بیان این ژن با روندی رو به کاهش به ترتیب ۴/۵، ۳/۵ و ۳ برابر



شکل ۵- فراوانی نسبی mRNA ژن AISOS1 در ریشه‌های گیاه آلوروپوس در پاسخ به تنش شوری شرایط آزمایشی مشابه شرایط ذکر شده در بافت برگ بوده است.

شوری شناسایی شد و با اعمال تنش بیان آن هم در ریشه و هم در ساقه افزایش یافت.

افزایش بیان ژن NHA1 و یا SOS1 در گیاهان مختلف گزارش شده است. در آنالیز ژل بلات RNA در گیاه آرابیدوپسیس، mRNA ژن SOS1 بدون اعمال تنش



شکل ۶- فراوانی نسبی mRNA ژن AISOS1 در گره و میانگه‌های گیاه آلوروپوس در پاسخ به تنش شوری شرایط آزمایشی مشابه شرایط ذکر شده در بافت برگ بوده است.

بودند، سطح بیان ژن TaSOS1 در ریشه پس از ۳ ساعت از تنش به بیشترین مقدار خود یعنی ۵ برابر زمان بدون تنش رسید و ۹ ساعت بعد به سطح پایه بازگشت. پس از ۲۴ ساعت دوباره به صورت ثابتی بالا رفت تا اینکه ۴۸ ساعت پس از تنش به حدود دو برابر بدون تنش رسید. بر عکس در بافت برگ سطح بیان

با این حال بیان این ژن با تیمار سرما و ABA تغییراتی نشان نداد (۲۳). در گیاه هالوفیت Puccinellia tenuiflora نسخه‌های ژن آنتی پورتر سدیم/پروتون غشایی PtNHA1 در پاسخ به تنش کلرید سدیم ۱۵۰ میلی‌مولار افزایش یافت (۲۹). در گیاهان گندمی که در معرض تنش ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم قرار گرفته

درحالی که در سایر بافت‌های مورد مطالعه ۶ تا ۲۴ ساعت پس از تنش شوری میزان حداکثر بیان دیده شد. شواهد ژنتیکی نشان می‌دهد که فعالیت SOS1 ژن آنتی پورتر سدیم/پروتون برای تحمل به شوری گیاه آرابیدوسیس حیاتی می‌باشد (۳۰،۲۵،۲۴). تحت تنش شوری گیاهان غلظت‌های بالای یون پتاسیم و غلظت‌های پایین یون سدیم در سیتوزول را با تنظیم بیان و فعالیت ترانسپورترهای پتاسیم و سدیم و پمپ‌های یون پروتون را که نیروی محرک پروتونی مورد نیاز برای فرآیندهای انتقال تولید می‌کند حفظ می‌نمایند (۳۹).

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که AISOS1 آنتی پورتر سدیم/پروتون غشای پلاسمایی را کد می‌کند. با توجه به روند بیان مشاهده شده در گیاه هالوفیت آلروپوس ژن AISOS1 می‌تواند در تحمل به تنش شوری در این گیاه به طرق مختلف نقش مؤثری داشته باشند. بررسی‌های بیان با استفاده از روش مذکور حاکی از افزایش بیان این آنتی پورتر در پاسخ به تنش شوری بود که نشان‌دهنده اهمیت این آنتی پورتر در مقاومت این گیاه به تنش شوری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد و پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی به دلیل فراهم سازی اعتبارات و امکانات آزمایشگاهی برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

بجز افزایش موقتی که در ۹ ساعت پس از تنش نشان داده بود تقریباً ثابت باقی ماند. این پاسخ در مقایسه با ریشه تأخیر داشت (۳۳). در برنج تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولار تجمع mRNA SOS1 را در ریشه القاء نمود اما تأثیری در ساقه و برگ نداشت (۱۴). بیان ژن PhaNHA1 در ریشه گیاهان نی حساس به شوری، پس از ۱۲ ساعت از تیمار کلرید سدیم به حداکثر مقدار خود رسید در حالی که در ریشه گیاهان نی مقاوم به شوری بعد از ۴۸ ساعت افزایش یافت و تا ۱۰ روز پس از تنش ثابت باقی ماند. چنین الگویی از بیان در این تحقیق مشاهده شده است. در بخش‌های هوایی گیاه سطح نسخه برداری ژن PhaNHA1 در گیاهان مقاوم به شوری نی بالاتر از گیاهان حساس به شوری بود، گرچه بیان ژن PhaNHA1 پس از ۱۰ روز تنش در هر دو تقریباً یکسان بود (۲۶). آنالیز وسترن بلات در گیاه *Populus euphratica* نشان داد که بیان PeSOS1 تحت تنش شوری به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا کرد و تا میزان ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از شاهد در برگ‌ها پس از تیمار با ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش بیان داشت (۳۱). در تحقیق حاضر سطوح نسخه‌برداری ژن AISOS1 در پاسخ به تنش کلرید سدیم در همه بافت‌ها افزایش یافت. میزان بیان این ژن در بافت‌های ریشه به آهستگی بعد از اعمال تنش افزایش یافت و پاسخ به تنش در بافت ریشه روند کندتری نسبت به بافت‌های برگ و گره و میان‌گره داشت. به این معنی که در بافت ریشه ۳ روز پس از اعمال تنش میزان بیان به حداکثر مقدار خود رسید

منابع

1. Apse, M.P., G.S. Aharon, W.A. Sneddon and E. Blumwald. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis Science 285: 1256-1258.
2. Barkla, B.J. and E. Blumwald. 1991. Identification of a 170-kDa protein associated with the vacuolar Na/H antiport of Beta vulgaris. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA. 88: 11177-11181.
3. Blumwald, E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. Current Opinion in Cell Biology. 12: 431-434.
4. Brett C.L., Y. Wei, M. Donowitz and R. Rao. 2002. Human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria. American Journal of Cell Physiology. 282: 1031-1041.
5. Dibrov, P., J.J. Smith, P.G. Young and F. Larry. 1997. Identification and localization of the SOD2 gene product in fission yeast. Federation of European Biochemical Societies, 405: 119-124.
6. Flowers, T.J. and A.R. Yeo. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants, where next? Australian Journal of Plant Physiology, 22: 875-884.
7. Fukuda, A., A. Nakamura, A. Tagiri, H. Tanaka, A. Miyao, H. Hirochika and Y. Tanaka. 2004. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. Plant Cell Physiology. 45: 146-159.
8. Garciadebla, B., H. Rosari and B. Benito. 2007. Cloning of two SOS1 transporters from the seagrass Cymodocea nodosa. SOS1 transporters from Cymodocea and Arabidopsis mediate potassium uptake in bacteria. Plant Molecular Biology. 63: 479-490.
9. Glenn, E., J.J. Brown and E. Blumwald. 1999. Salt-tolerant mechanism and crop potential of halophytes. Critical Review in Plant Sciences, 18: 227-255.
10. Gulzar, S., M.A. Khan and I.A. Ungar. 2003. Effects of salinity on growth, ionic content and plant-water status of Aeluropus lagopoides. Commun. Soil Science and Plant Nutrition, 34: 1657-1668.
11. Horie, T. and J.I. Schroeder. 2004. Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. Plant Physiology, 136: 2457-2462.

12. Katiyar-Agarwal, S., J. Zhu, K. Kim, M. Agarwal, X. Fu, A. Huang and J.K. Zhu. 2006. The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 103: 18816-18821.
13. Li, M.Y. and Y.J. Liu. 1994. Halophytes of yellow river delta in north shandong province of china. *Journal of Qufu Normal University*, 1: 125-133.
14. 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.
15. 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.
16. Nakayama, H., T. Horie, I. Yonamine, A. Shinmyo and K. Yoshida. 2005. Improving salt tolerance in plant cells. *Plant Biotechnology*, 22: 477-487.
17. Nass, R. and R. Rao. 1998. Novel localization of a Na^+/H^+ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 21054-21060.
18. Niu, X., R.A. Bressan, P.M. Hasegawa and J.M. Pardo. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*, 109: 735-742.
19. 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 thsosl-rna interference line. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 1484-1496.
20. Pardo, J.M. and F. Rubio. 2011. Na^+ and K^+ transporters in plant signaling. *Signaling and Communication in Plants*, 7: 65-98.
21. Prior, C., S. Potier, J.L. Souciet and H. Sychrova. 1996. Characterization of the NHA1 gene encoding a Na^+/H^+ -antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 387: 89-93.
22. 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.
23. Shi, H., M. Ishitani, C. Kim and J.K. Zhu. 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 97: 6896-6901.
24. 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*, 4: 465-477.
25. 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.
26. 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.
27. Tester, M. and R. Davenport. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91: 503-527.
28. Wang, R.Z. 2004. Plant functional types and their ecological responses to salinization in saline grasslands, Northeastern China. *Photosynthetic*, 42: 511-519.
29. Wang, X., R. Yang, B. Wang, G. Liu, C. Yang and Y. Cheng. 2010. Functional characterization of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter from alkali grass *Puccinellia tenuiflora*. *Molecular and Biological Reports*, 38: 4813-4822.
30. Wu, S. J., D. Lei and J. K. Zhu. 1996. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell*, 8: 617-627.
31. Wu, Y., N. Ding, X. Zhao, M. Zhao, Z. Chang, J. Liu and L. Zhang. 2007. Molecular characterization of PeSOS1: the putative Na^+/H^+ antiporter of *Populus euphratica*. *Plant Molecular Biology*, 65: 1-11.
32. Xu, H., X. Jiang, K. Zhan, X. Cheng, X. Chen, Z.Y. Xue, D.Y. Zhi, G.P. Xue, Y.X. Zhao and G.M. Xia. 2004. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat. *Triticum aestivum* L. expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene with improved grain yield in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+ . *Plant Science*, 167: 849-859.
33. 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.
34. Yamaguchi, T., M.P. Apse, H. Shi and E. Blumwald. 2003. Topological analysis of a plant vacuolar Na^+/H^+ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 100: 12510-12515.
35. Zhang, H.X. and E. Blumwald. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*, 19: 765-768.
36. Zhang, G.H., Q. Su, L.J. An and S. Wu. 2008. Characterization and expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus litoralis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 117-126.
37. 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.
38. Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sciences*, 6: 66-71.
39. Zhu J.K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 441-445.
40. Zouari, N., R. Ben Saad, Th. Legavre, J. Azaza, X. Sabau, M. Jaoua, K. Masmoudi and A. Hassairi. 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Gene*, 404: 61-69.

Isolation and Expression Analysis of Alsos1 Gene Under NaCl Stress in Halophyte Grass *Aeluropus Littoralis* Parl.

Vali ollah Ghasemi Omran¹, Abdolreza Bagheri², Ghorbani Ali Nematzadeh³,
Amin Mirshamsi⁴ and Nad Ali Babaiian Jelodar⁵

1- PhD Student, Ferdowsi University of Mashhad, (Corresponding author: ghasemiomran@yahoo.cm)

2 and 4- Professor and Assistant Professor, Ferdowsi University of Mashhad

3 and 5- Professor, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: November 17, 2012 Accepted: March 11, 2013

Abstract

We have isolated a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Aeluropus littoralis* under NaCl salt stress. The isolated cDNA is 3981 bp long and contains a 3438 bp open reading frame. The amino acid sequences of PtNHA1 show high identities to SOS1 plant transporters. PtNHA1 is predicted to contain 12 hypothetical transmembrane domains in the N-terminal part and a long hydrophilic cytoplasmic tail in the C-terminal part. The expression pattern of this gene was investigated upon 250 mM NaCl treatment after 6 h and 1, 3, 8 and 17 days time courses. Expression of ALSOS1 greatly increased in leaves after 6 h. In node and internode tissues the transcript levels of ALSOS1 peaked at 24 h after salt treatment and then gradually decreased within 3 and 8 days and finally after 17 days reached to a steady-state in which the mRNA content was similar to that of control plants. The transcript abundance of this gene in roots slightly increased upon salt treatment and after 3 days reached to its maximum levels and this expression continued until 8 days and then decreased to reach a new steady-state in which the mRNA content was about 2-fold that of control plants.

Keywords: Salt stress, *Aeluropus littoralis*, ALSOS1, Expression