

## تأثیر سالیسیلیک اسید بر بیان ژن‌های *SOS1* و *NHX1* در ریشه گیاهچه گندم تحت تنش شوری

### The effect of salicylic acid on expression of *NHX1* and *SOS1* genes in root of wheat seedlings under salt stress

فاطمه ملکی<sup>۱\*</sup>، رضا فتوت<sup>۱</sup>، محمدرضا عظیمی<sup>۱</sup>، فرید شکاری<sup>۱</sup>، زهرا السادات شیر<sup>۲</sup>

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیاران، دانشیار، دانشگاه زنجان، ایران.

۲- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج.

Maleki F<sup>\*1</sup>, Fotovat R<sup>1</sup>, Azimi MR<sup>1</sup>, Shekari F<sup>1</sup>, Shobbar ZS<sup>2</sup>

1. Graduated MSc Student, Assistant Professors, Associate Professor, Zanjan University, Zanjan, Iran.
2. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), karaj.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: f.maleki313@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

#### چکیده

سالیسیلیک اسید مولکول پیام‌رسان مهم در پاسخ گیاهان به تنش‌ها می‌باشد. در پژوهش حاضر، پاسخ متفاوت دو رقم گندم نان به تنش شوری (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم کلرید سدیم در هر کیلوگرم خاک) و پرایمینگ بذر با سالیسیلیک اسید (۱۲۰۰ میکرومولار) مورد مطالعه قرار گرفت. تنش شوری موجب کاهش معنی‌دار ( $P \leq 0.01$ ) وزن خشک گیاهچه در مورد هر دو ژنوتیپ شد. گیاهان پرایم شده با سالیسیلیک اسید که تحت تنش شوری ۱/۵ گرم کلرید سدیم در کیلوگرم خاک رشد کرده بودند زیست توده بیشتری در ریشه و شاخسار گیاهچه‌های گندم تولید کردند. تیمار شوری موجب افزایش بیان ژن‌های *NHX1* و *SOS1* در ریشه شد. میزان بیان ژن‌ها در گیاهان پرایم شده با سالیسیلیک اسید در مقایسه با گیاهان پرایم شده با آب، بالاتر بود. میزان رونویسی *NHX1* پس از تیمار با کلرید سدیم و سالیسیلیک اسید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج نشان می‌دهد که در رقم متحمل به تنش شوری، مکانیسم‌های متفاوتی اعم از اجتناب از ورود یون سدیم یا تجمع سدیم در اندامک‌های سلولی توسعه یافته است. بنابراین، سالیسیلیک اسید ممکن است از طریق فعال کردن پروتئین کینازهایی که در مسیر انتقال پیام تنش شوری قرار دارند بیان ژن‌های *NHX1* و *SOS1* را تنظیم کرده و سرانجام تحمل به تنش شوری را افزایش دهد.

#### واژه‌های کلیدی

سالیسیلیک اسید

شوری

گندم

*NHX1*

*SOS1*

## مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) در کنار برنج یکی از دو محصول زراعی مهم جهان است. این غلات اصلی، تقریباً نیمی از کالری مصرفی سراسر جهان را تامین می‌کنند (FAO 2007). گندم و جو بیشترین سطح زیر کشت محصولات زراعی در ایران را به خود اختصاص داده‌اند (FAO 2011). بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های زراعی سراسر جهان به دلیل شوری (۳۹۷ میلیون هکتار) یا شرایط مرتبط با قلیابیت (۴۳۴ میلیون هکتار) تحت تنش شوری قرار دارند که این میزان بیش از ۶ درصد از کل زمین‌های زراعی دنیا است (FAO 2008).

اگرچه ریشه‌های گندم توانایی بالایی در کنترل غلظت یون‌های  $Cl^-$  و  $Na^+$  دارند و در شوری‌های بالا، غلظت یونی در ریشه‌ها افزایش نمی‌یابد (Gorham et al. 1990)، با این‌حال، شوری از عوامل مهم محدود کننده تولید محصول در گندم به شمار می‌رود. به‌طور کلی، در فاز اول تاثیر شوری بر گیاه (مرحله تنش اسمزی)، سیگنال‌های هورمونی بیش از روابط آبی رشد گیاه را کنترل می‌کنند. بنابراین مطالعه تنظیم کننده‌های رشد در تنش شوری اهمیت زیادی دارد (Munns 2005).

سالیسیلیک‌اسید یک هورمون گیاهی با ماهیت فنولی است که در گیاهان در مقادیر کم وجود دارد و محلول در آب می‌باشد (Raskin et al. 1992). سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان تنظیم کننده داخلی رشد باعث تغییرات ویژه‌ای در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاهان می‌شود (Shakirova et al. 2003)، همچنین در میزان جذب یون‌ها و انتقال آن‌ها در گیاهان نقش دارد (Gunes et al. 2005). اثر سالیسیلیک‌اسید بر روی فرآیندهای فیزیولوژیک متفاوت است، پیشرفت برخی فرآیندها یا ممانعت از برخی دیگر، به غلظت، گونه گیاهی و شرایط محیطی وابسته است (El-Mergawi et al. 2004). در سال‌های اخیر قابلیت سالیسیلیک‌اسید در ایجاد اثر محافظتی در گیاهان تحت تنش‌های غیرزنده مورد بررسی قرار گرفته است. پیش‌تیمار بذر با سالیسیلیک‌اسید یک روش ساده فیزیولوژیکی است که طبق مطالعات صورت گرفته بر روی گیاهان مختلف، می‌تواند در گیاهان زراعی و باغی به‌عنوان روشی مفید برای افزایش رشد گیاهچه‌های تحت تاثیر تنش‌های محیطی از جمله شوری، مورد استفاده قرار گیرد (Kaya et al. 2007).

## مواد و روش‌ها

بذر ارقام گندم بم به‌عنوان رقم متحمل به شوری (Saberi et al. 2013) و قدس به‌عنوان رقم حساس به شوری (Razeghi Yadak et al. 2013) از بخش غلات موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. به منظور پرایمینگ، به قسمتی از بذرها، آب مقطر استریل و روی قسمت دوم از بذرها، محلول سالیسیلیک‌اسید افزوده شد. بذرها طی ۲۴ ساعت در دمای  $25 \pm 8$  درجه سانتی‌گراد در تاریکی خشک شدند و پس از ضدعفونی با قارچ‌کش کاربوکسین تیرام (۲:۱۰۰۰) در گلدان‌های محتوی خاک و ماسه به نسبت ۱:۲ کشت شدند. سطوح شوری کلریسدیم با افزودن مقادیر صفر، ۰/۵، یک و ۱/۵ گرم کلریسدیم در هر کیلوگرم خاک اعمال شد. هدایت الکتریکی خاک مورد استفاده جهت کشت برابر با یک دسی‌زیمنس بود که پس از اعمال تنش شوری، به ترتیب به ۳، ۷ و ۱۰ دسی‌زیمنس رسید. در هر گلدان چهار عدد بذر کشت شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در شش تکرار، طراحی و در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زنجان اجرا شد. فاکتورها شامل نوع ژنوتیپ (دو سطح)، سطوح شوری (چهار سطح) و پرایمینگ با سالیسیلیک‌اسید (دو سطح) بود. آبیاری با آب معمولی، به‌صورت وزنی و با توجه به ظرفیت زراعی خاک انجام شد. پس از سبز شدن، تغذیه گیاهان با کود کامل، به‌صورت

ساخت cDNA طی واکنش رونویسی معکوس با کیت دو مرحله- ای RT-PCR (Vivantis, Malaysia) انجام شد. جهت تامین دماهای ذکر شده در راهنمای کیت، از دستگاه ترموسایکلر iCycler (مدل ۸۸۳۱-۱۷۰ ساخت شرکت BIORAD) استفاده شد.

توالی تمامی ژن‌های مورد نظر از سایت NCBI اخذ و آغازگرهای مربوطه با کمک نرم‌افزار OLIGO نسخه ۵ طراحی شد. طراحی آغازگر ژن‌های *NHX1* و *SOS1* به گونه‌ای صورت گرفت که جفت آغازگر در محدوده ناحیه غیر ترجمه شونده (3'UTR) که برای هر ژن، اختصاصی است قرار داشته باشد تا با استفاده از هر جفت آغازگر، تنها ژن مورد نظر به طور اختصاصی تکثیر شود. ژن *TaActin* به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد (جدول ۱).

جهت بررسی بیان ژن از روش کمیت سنجی نسبی توسط دستگاه Real-time PCR (Rotor-Gene Q) استفاده شد. آزمایش شامل سه تکرار زیستی بود. از کیت *AccuPower® 2X GreenStar™* (Bioneer, Korea) حاوی رنگ آشکارساز سایبرگرین در Real-time PCR استفاده شد و برنامه دمایی- زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۵ چرخه تکثیر با دمای واسرشت‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، دمای اختصاصی اتصال آغازگر ژن مرجع به مدت ۲۵ ثانیه و دمای اختصاصی اتصال آغازگرهای دو ژن هدف به مدت ۳۵ ثانیه و سرانجام دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه در دستگاه اجرا شد.

آزمون نرمالیت اشتباهات آزمایشی و داده‌های مربوط به صفات زراعی به روش Anderson-Darling در نرم‌افزار SAS نسخه ۹ انجام و داده‌ها با تبدیل لگاریتمی نرمال شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها (به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن) توسط نرم‌افزار MSTATC انجام شد. تجزیه داده‌های Real-time PCR کمی به روش  $\Delta\Delta\text{CT}$  صورت گرفت.

محلول ۰/۲ درصد در آب آبیاری، با فواصل زمانی یک روز انجام گرفت. ریشه‌ها ۲۵ روز پس از کاشت، از گلدان خارج و شسته شدند. ریشه بوته‌های سه تکرار پس از جدا کردن بخش هوایی گیاه، به نیتروژن مایع منتقل شدند. ریشه‌ها و بخش هوایی سایر بوته‌های هر تیمار، برای اندازه‌گیری وزن خشک در داخل ورقه آلومینیومی در آون ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. اندازه‌گیری وزن خشک ریشه و بخش هوایی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم انجام شد. استخراج RNA کل از بافت ریشه با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکلون، ایران) با تغییراتی در دستورالعمل آن انجام گرفت. بدین ترتیب که پس از سانتریفوژ مخلوط RNAX-PLUS و نمونه پودر شده، مایع شفاف و طلایی رنگ فوقانی به تیوپ دیگری منتقل و سپس محلول کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل (نسبت حجمی ۱:۲:۴) به آن اضافه و سانتریفوژ شد، مایع شفاف فوقانی به تیوپ دیگری منتقل و این مرحله مجدداً تکرار شد. در مراحل پایانی استخراج، پس از مشاهده رسوب حاوی RNA و پیش از شستشو با اتانول، مقدار ۳۵۰ میکرولیتر از لیتیم کلراید (۴ مولار) بر روی رسوب ایجاد شده اضافه شد، تیوپ به مدت ۱۸-۱۶ ساعت بر روی یخ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سرانجام سانتریفوژ شد. سنجش کمیت RNA توسط دستگاه Spectrophotometer (مدل NANODROP 2000 ساخت شرکت Thermo SCIENTIFIC) انجام گرفت.

به منظور از بین بردن آلودگی DNA، از آنزیم DNaseI، بافر و محلول EDTA (Thermo SCIENTIFIC, USA) طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. برای این منظور به‌ازای هر میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر و یک واحد آنزیم RNase-free DNase I به داخل میکروتیوپ اضافه شد و با افزودن آب DEPC، حجم واکنش به ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس میکروتیوپ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در پایان، یک میکرولیتر از EDTA با غلظت ۵۰ میلی مولار بر روی مواد قبلی افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

<sup>1</sup> 3' Untranslated region

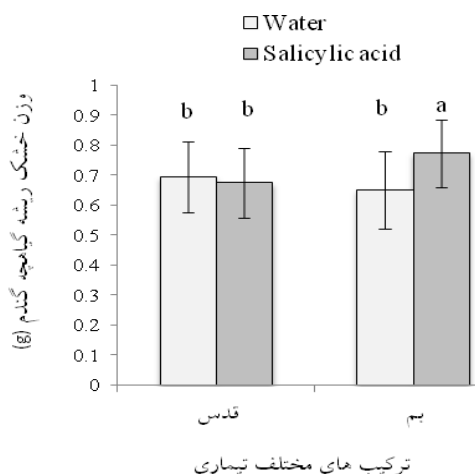
جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن در ریشه گیاهچه گندم تحت تنش شوری

ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر (5'-3')	اندازه محصول PCR (جفت باز)	دمای اتصال (°C)
<i>TaActin</i>	AB181991.1	5'-GTGTACCCTCAGAGGAATAAGG	۱۵۱	۵۳
		5'-GTACCACACAATGTCGCTTAGG		
<i>NHX1</i>	AY296910.1	5'-GGTTCACCCATAGAGAGGAG	۱۵۴	۵۵
		5'-CCCAAGAGCAAAACTGAGTG		
<i>SOS1</i>	AY326952.3	5'-CGGTAGGAGAAGATGACGAC	۸۹	۵۵
		5'-GAGGGTGGATTGAACGAAAG		

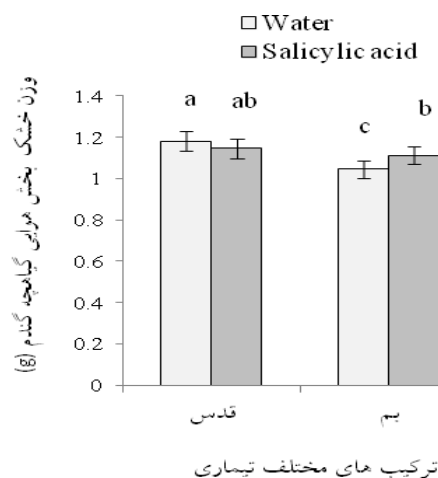
## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت ژنوتیپ‌ها از نظر وزن خشک بخش هوایی گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود، ولی از نظر وزن خشک ریشه معنی‌دار نبود. نوع پرایم بذریه بر صفت وزن خشک ریشه در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌داری داشت ولی بر وزن خشک بخش هوایی تاثیر معنی‌داری نداشت. سطح شوری بر روی هر دو صفت گیاهچه‌ای مورد مطالعه، در سطح احتمال یک درصد تاثیر معنی‌داری داشت. اثرات متقابل دوجانبه در مورد هر دو صفت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

خشک بخش هوایی و ریشه گیاهچه ژنوتیپ بم شد. در صورتی‌که در مورد ژنوتیپ قدس نوع پرایم بذریه بر وزن خشک گیاهچه نداشت (شکل‌های ۱ و ۲). بر اساس برخی مطالعات انجام شده، پیش‌تیمار بذریه‌های گندم با سالیسیلیک اسید منجر به افزایش وزن خشک و طول ریشه و بخش هوایی شد که این افزایش، در ریشه بسیار بارزتر بود (Malamy and Klessig, 1992; Pancheva et al. 1996; Rakhmankulova et al. 2010). همچنین افزایش رشد ریشه و ساقه سویا در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید گزارش شده است (Gutierrez et al. 1998).



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × پرایم با سالیسیلیک اسید برای صفت وزن خشک ریشه گیاهچه گندم



شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × پرایم با سالیسیلیک اسید برای صفت وزن خشک بخش هوایی گیاهچه گندم

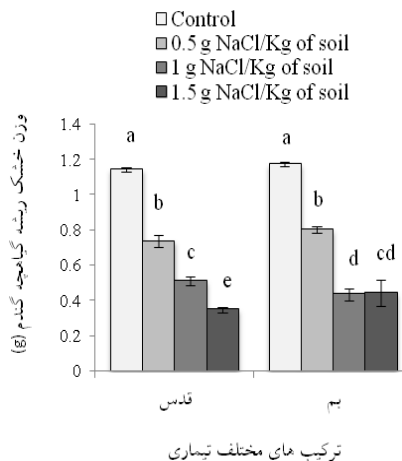
نتایج مقایسه میانگین ترکیب‌های مختلف تیماری در مورد اثر متقابل ژنوتیپ × شوری نشان داد که به‌طور کلی در مورد هر دو ژنوتیپ، با افزایش سطح تنش شوری، وزن خشک گیاهچه گندم به‌طور معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) کاهش یافت و تنها در سطح چهارم

نتایج مقایسه میانگین ترکیب‌های مختلف تیماری در مورد اثر متقابل ژنوتیپ × پرایم با سالیسیلیک اسید نشان داد که کاربرد سالیسیلیک اسید به‌طور معنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) باعث افزایش وزن

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات وزن خشک بخش هوایی و وزن خشک ریشه در گیاهچه گندم تحت تیمارهای متفاوت پرایم بذر و سطوح مختلف تنش شوری

وزن خشک ریشه		وزن خشک بخش هوایی		منابع تغییر
میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	
۰/۰۰۸ <sup>ns</sup>	۱	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۳	تکرار
۰/۰۰۶ <sup>ns</sup>	۱	۰/۱۱ <sup>**</sup>	۱	ژنوتیپ
۰/۰۲۱ <sup>**</sup>	۱	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۱	پرایم با سالیسیلیک اسید
۰/۹۶۲ <sup>**</sup>	۳	۰/۵۹ <sup>**</sup>	۳	شوری
۰/۰۴۱ <sup>**</sup>	۱	۰/۰۴۲ <sup>**</sup>	۱	ژنوتیپ × پرایم با سالیسیلیک اسید
۰/۰۱۱ <sup>*</sup>	۳	۰/۰۱ <sup>*</sup>	۳	شوری × ژنوتیپ
۰/۰۳ <sup>**</sup>	۳	۰/۰۲ <sup>**</sup>	۳	شوری × پرایم با سالیسیلیک اسید
۰/۰۱ <sup>*</sup>	۳	۰/۰۲۶ <sup>**</sup>	۳	ژنوتیپ × پرایم با سالیسیلیک اسید × شوری
۰/۰۰۲	۱۵	۰/۰۰۲	۴۵	خطا
۷/۰۱		۴/۳۴		ضریب تغییرات (درصد)

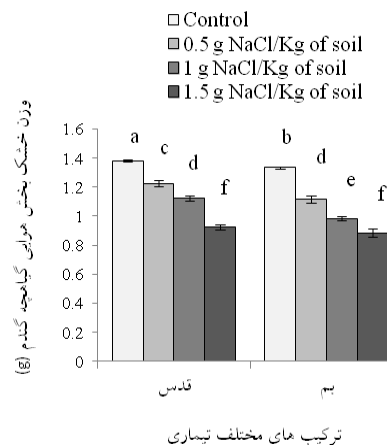
ns, \* و \*\* به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد



شکل ۴- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × شوری برای صفت وزن خشک ریشه گیاهچه گندم

همچنین نتایج مقایسه میانگین ترکیب های مختلف تیماری مورد اثر متقابل پرایم با سالیسیلیک اسید × شوری نشان داد که در شرایط شاهد و سطوح شوری ۰/۵ و یک گرم کلرید سدیم در کیلوگرم خاک، نوع پرایم بذر، تاثیری بر وزن خشک گیاهچه نداشت و تنها در سطح چهارم از تنش شوری (۱/۵ گرم کلرید سدیم در کیلوگرم خاک)، کاربرد سالیسیلیک اسید جهت پرایم بذر در مقایسه با آب، به طرز معنی داری ( $P \leq 0/01$ ) باعث

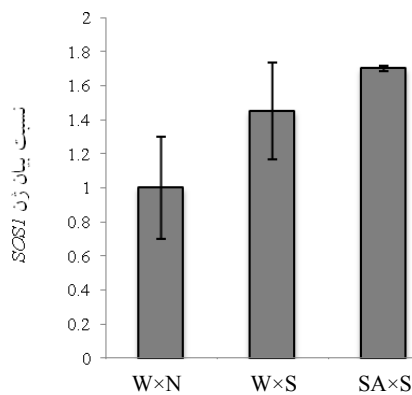
از تنش شوری، وزن خشک ریشه گیاهچه ژنوتیپ بم در مقایسه با ژنوتیپ قدس بیشتر بود (شکل های ۳ و ۴). طبق مطالعات صورت گرفته سطوح بالای شوری منجر به کاهش معنی دار پارامترهای رشد مثل سطح برگ، طول برگ و وزن خشک ریشه و بخش هوایی گیاه می شود (Ashrafuzzaman et al. 2002). همچنین تنش شوری مانع از افزایش طول برگ (Munns et al. 2000) و رشد ریشه (Flowers et al. 1991) می شود.



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × شوری برای صفت وزن خشک بخش هوایی گیاهچه گندم

بر اساس نتایج بدست آمده از آزمایش حاضر، نمونه بافت ریشه رقم بم، که بذره‌های آن توسط سالیسیلیک اسید پرایم شده و در شوری ۱/۵ گرم کلرید سدیم در کیلوگرم خاک رشد کرده بودند، همراه با شاهد، به منظور بررسی بیان ژن انتخاب شد.

طبق گزارشات موجود، افزایش دو برابری در بررسی بیان نسبی ژن به روش  $\Delta\Delta CT$  به عنوان حداقل اختلاف معنی دار در نظر گرفته می‌شود (Vaerman et al. 2004; Secenji et al. 2010). به‌طور کلی در این آزمایش، با اعمال تنش شوری بیان ژن *SOS1* در ریشه گیاهچه‌های گندم افزایش یافت، مقدار این افزایش بیان، در حالت پرایم با سالیسیلیک اسید بیشتر از پرایم با آب بود که البته این تفاوت معنی دار نبود (شکل ۷). طبق مطالعات انجام شده، نقش *SOS1* در پارانیشیم ریشه، بارگیری سدیم به داخل آوند چوبی طی تنش شوری ملایم است (Shi et al. 2000).

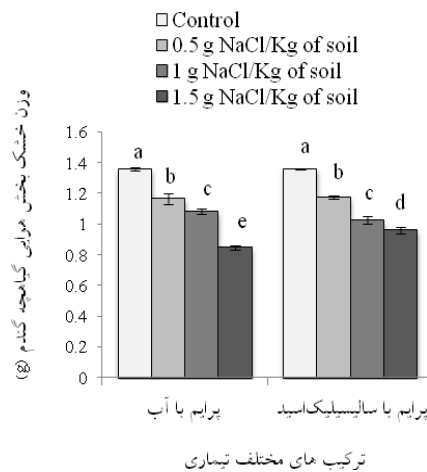


شکل ۷- تیمارهای آزمایشی

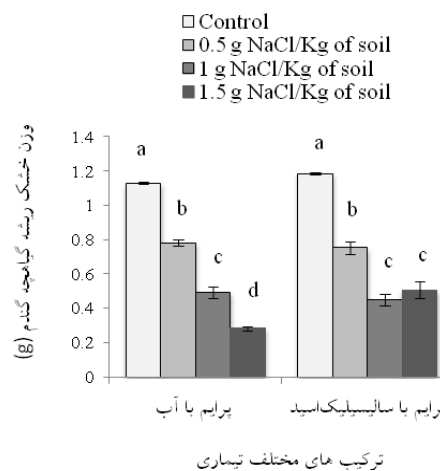
شکل ۷- نمودار مقایسه بیان ژن *SOS1* در ریشه گیاهچه تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد در گندم رقم بم؛ (W) پرایم با آب مقطر؛ (SA) پرایم با سالیسیلیک اسید؛ (S) اعمال تنش شوری ۱/۵ گرم کلرید سدیم در کیلوگرم خاک؛ (N) عدم اعمال تنش شوری

در مسیر SOS که یک مسیر اختصاصی پاسخ به تنش شوری است، شبکه‌های حسگر و پیام‌رسان، موجب پاسخ‌های زود هنگام به تنش شوری می‌شوند (Zhu 2000). افزایش سدیم در محیط اطراف ریشه موجب انتشار کلسیم به سیتوزول از طریق غشای پلاسمایی و تونوپلاست خواهد شد (Moore et al. 1997, 2000; Kiegle et al. 2002; Tracy et al. 2008) و این افزایش، موجب بیان برخی اطلاعات ژنتیکی در سلول می‌شود (Tracy et al. )

افزایش وزن خشک گیاهچه گندم شد (شکل‌های ۵ و ۶). بنابر گزارشات موجود، تیمار سالیسیلیک اسید به‌طور معنی داری باعث افزایش وزن تازه و خشک ریشه و بخش هوایی گندم در شرایط شوری شد (Erdal et al. 2011). همچنین پیش تیمار بذره‌های گندم با سالیسیلیک اسید باعث افزایش وزن خشک ریشه و بخش هوایی در شرایط طبیعی و شوری شد (Kaydan et al. 2007). بر اساس تعدادی از مطالعات انجام شده، پیش تیمار بذره‌های گندم با سالیسیلیک اسید منجر به افزایش وزن خشک و طول ریشه و بخش هوایی شد که این افزایش، در ریشه بسیار بارزتر بود (Malamy and Klessig 1992; Pancheva et al. 1996; Rakhmankulova et al. 2010)

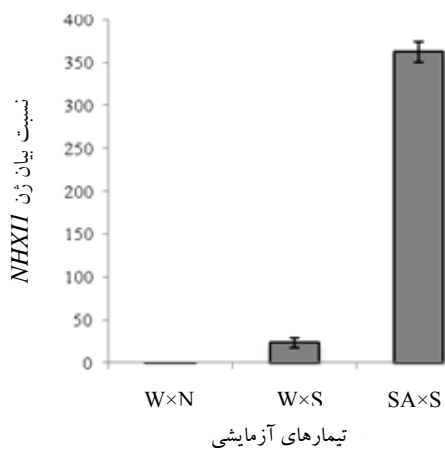


شکل ۵- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل پرایم با سالیسیلیک اسید × شوری برای صفت وزن خشک بخش هوایی گیاهچه گندم



شکل ۶- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل پرایم با سالیسیلیک اسید × شوری برای صفت وزن خشک ریشه گیاهچه گندم

افزایش می دهد ( Zhang and Blumwald 1999; Apse et al. 2001; Zhang et al. 2001). ژن *NHX1* در برخی گونه های گیاهی مانند آرابیدوپسیس (Apse et al. 1999)، گندم (Xue et al. 2004)، برنج (Fukuda et al. 2003)، گوجه فرنگی (Zhang and Blumwald 2001) و سویا (Li et al. 2006) شناسایی شده است. همچنین بیان بالای آن در چندین گونه، منجر به ایجاد سطوح بالای تحمل به تنش شوری شده است. برای مثال، در برنج، پس از بیان بالای ژن *NHX1* افزایش تحمل به شوری مشاهده شد در صورتی که برنج های تراریخت در شرایط طبیعی، توانایی رشد کمتری داشتند (Fukuda et al. 2003; Chen et al. 2007).



شکل ۸- نمودار مقایسه بیان ژن *NHX1* در ریشه گیاهچه تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد در گندم رقم بم؛ (W) پرایم با آب مقطر، (SA) پرایم با سالیسیلیک اسید، (S) اعمال تنش شوری ۱/۵ گرم کلرید سدیم در کیلوگرم خاک، (N) عدم اعمال تنش شوری

طبق مطالعات صورت گرفته، با تلفیق آنتی پورترهایی مانند *SOS1* و *NHX1*، در شرایط تنش شوری، انتشار سدیم به اپوپلاست و بسته بندی آن در واکوئل سلولی، افزایش یافت (شکل ۹). در آرابیدوپسیس، ارتباط این دو آنتی پورتر در تنش شوری، از طریق غربالگری توسط ژنتیک پیشرو برای *SOS1* (Wu et al. 1996) و آزمون متمم مخمر برای *NHX1* (Apse et al. 1999) به اثبات رسید. در هر دو مورد، کاهش یا افزایش بیان ژن، با کاهش یا افزایش تحمل به تنش شوری همبستگی داشت. بنابراین، *SOS1* و *NHX1* نه تنها به خودی خود، بلکه به دلیل اثرات هم افزایی، مهم هستند. برای مثال با افزایش بیان *SOS1* و *NHX1* و در نتیجه،

در مسیر *SOS*، افزایش کلسیم آزاد سیتوزولی توسط پروتئینی به نام *SOS3* یا همان <sup>1</sup>CBL4 حس می شود و تشکیل دایمر *CBL4/SOS3* با *SOS2* (<sup>2</sup>CIPK24) را تسریع می کند (Halfter et al. 2000). *SOS2* یک پروتئین «سرین/ ترئونین» و در واقع یک پروتئین کیناز است (Liu et al. 2000; Halfter et al. 2000). کمپلکس (*SOS3/SOS2*)، *CBL4/CIPK24* غشای پلاسمایی را مورد هدف قرار می دهد و موجب فسفریلاسیون و فعالیت آنتی پورتر غشایی <sup>+</sup>Na/<sup>+</sup>H یا همان *SOS1* می شود (Shi et al. 2002; Qiu et al. 2002; Quintero et al. 2002; al. 2002). با تنش شوری مواجه می شوند بیان *SOS1* افزایش می یابد (Masmoudi 2009). نتایج بیان ژن *SOS1* در آزمایش حاضر نشان می دهد که در رقم گندم متحمل به تنش شوری احتمالاً مکانیسم های دیگری علاوه بر مسیر *SOS* به منظور برقراری تعادل یونی و حفظ شاخص های رشد توسعه یافته است. علت تفاوت وزن خشک گیاهچه های رقم بم، تحت تیمارهای شوری و سالیسیلیک اسید احتمالاً بخش بندی سدیم در اندامک های سلولی باشد. از سوی دیگر، عدم وجود تفاوت معنی دار در بیان این ژن در آزمایش حاضر را می توان به میزان بالای تغییرات موجود بین تکرارهای آزمایشی نسبت داد. بنابراین توصیه می شود به منظور دستیابی به نتایج دقیق تر و قابل استنادتر، تعداد تکرارهای آزمایش در مطالعات بعدی افزایش یابد.

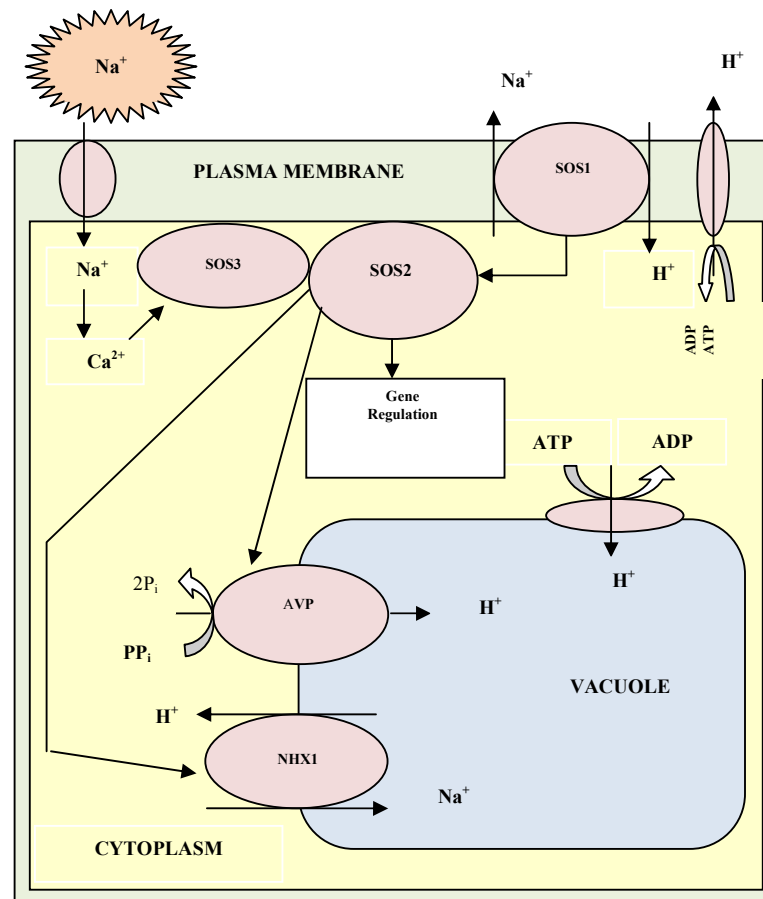
طبق نتایج پژوهش حاضر، با اعمال تنش شوری، بیان ژن *NHX1* در ریشه گیاهچه های گندم افزایش یافت، میزان این افزایش در مقایسه با تیمار شاهد، در حالت پرایم با آب، به ۲۳ برابر و در صورت پرایم با سالیسیلیک اسید به ۳۶۰ برابر رسید (شکل ۸). *NHX1* یک آنتی پورتر غشایی است که در غشای تونوپلاست قرار دارد. استفاده از این ژن برای افزایش تحمل به شوری، موفقیت آمیز بوده (Apse et al. 1999) و حاکی از این مطلب است که این پروتئین طیف گسترده ای از فرآیندهای سلولی، نمو، پیرایش پروتئین ها و ارتباط میان آن ها را تحت تاثیر قرار می دهد (Sottosanto et al. 2004). شواهد قانع کننده ای وجود دارد که بیان بالای ژن *NHX1* در گونه های مختلف، تحمل به شوری را

<sup>1</sup> Calcineurin B-like protein

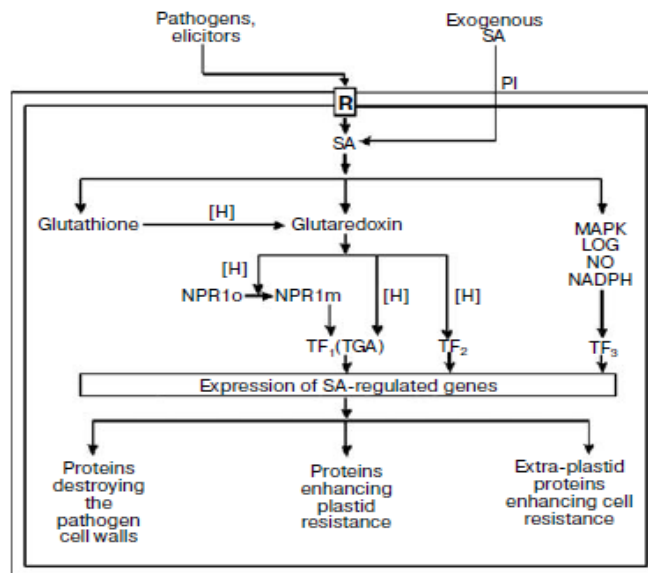
<sup>2</sup> Calcineurin B-like interacting protein kinase

برگشتی در گیاهان نقش تعیین کننده‌ای در پاسخ‌های درون سلولی حد وسطی به محرک‌های بیرونی ایفا می‌کنند. بنابراین، این گروه از کینازها در گیاهان ممکن است در مسیرهای انتقال پیام تنش دخیل باشند (Singh and Gautam 2013). به عبارت دیگر، کینازها علاوه بر تنش شوری، به تیمارهای سالیسیلیک‌اسید نیز واکنش نشان می‌دهند و بیان آن‌ها، تحت تیمار سالیسیلیک‌اسید افزایش می‌یابد، بنابراین افزایش بیان ژن‌های *SOS1* و *NHX1* می‌تواند ناشی از تغییر در بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های واسطه‌ای مانند کینازها باشد. برای مثال، *SOS2* می‌تواند فعالیت دفع‌کننده‌های سدیم از جمله آنتی‌پورتر واکوئلی *NHX1* را تحت-تأثیر قرار دهد (Jenks et al. 2007). پرایم بذرها با سالیسیلیک‌اسید می‌تواند با تحت‌تأثیر قرار دادن سطوح درون سلولی سالیسیلیک‌اسید و یا به‌طور مستقل به‌عنوان یک محرک بیرونی، باعث فعالیت زود هنگام پروتئین کینازها و در نتیجه آغاز سریع‌تر مسیرهای پاسخ به تنش شوری شد، از این رو به هنگام مواجهه با تنش، مسیرهای تدافعی را سریع‌تر فعال می‌سازد (شکل ۱۰). سالیسیلیک‌اسید احتمالاً با افزایش فعالیت کینازهایی مانند *SOS2* که در مسیر درک تنش شوری و پاسخ به آن قرار دارند باعث القای بیان برخی از ژن‌ها از جمله *SOS1* و *NHX1* می‌شود، همچنین این پروتئین کیناز ممکن است با فعال کردن پروتئین‌های غشای پلاسمایی و واکوئلی مانند  $H^+$ -ATPase و AVP، با تامین شیب پروتون، به‌طور غیر مستقیم بیان و فعالیت آنتی‌پورترهای غشایی  $Na^+/H^+$  از جمله *SOS1* و *NHX1* را در ریشه گیاهچه‌های گندم افزایش دهد، بدین ترتیب سدیم وارد شده به داخل سلول، از آن خارج و یا در واکوئل سلولی، بسته‌بندی می‌شود. کاربرد بیرونی سالیسیلیک‌اسید به‌منظور تطابق گیاهان با تنش شوری ممکن است ابزار مناسبی برای فهم فیزیولوژی و بیولوژی مولکولی باشد (Klessig and Malamy 1994). همچنین تشخیص و معرفی مکان‌های ژنی و گیرنده‌های غشایی دریافت‌کننده پیام سالیسیلیک‌اسید، می‌تواند در افزایش عملکرد گیاهان تحت شرایط نامساعد محیطی موثر باشد (Singh and Gautam 2013). با توجه به مطالب ذکر شده، پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی به‌منظور تعیین دقیق‌تر مکانیسم تأثیر

انتشار سدیم به آپوپلاست و واکوئل، فعالیت پمپ‌های تامین‌کننده انرژی برای فعالیت *SOS1* و *NHX1* افزایش می‌یابد (Gaxiola et al. 1999; Bartels and Sunkar 2005). به‌طور کلی جابجایی و تعادل یون‌ها در محیط‌های شور به پروتئین‌های حامل غشایی-سراسری شامل پروتئین‌های جابجاکننده پروتون (وابسته به ATP)،  $Ca^{2+}$ -ATPase و پیروفسفاتازها وابسته است. این پروتئین‌ها، آنتی‌پورترها و کانال‌ها را فعال می‌کنند و در خروج یون‌ها دخالت دارند (Sze et al. 1999). هر دو آنتی‌پورتر *SOS1* و *NHX1* به‌منظور فعالیت به شیب پروتون نیاز دارند که این شیب توسط  $H^+$ -ATPase‌های غشای پلاسمایی یا  $H^+$ -ATPase واکوئلی و  $H^+$ -پیروفسفاتاز واکوئلی (AVP1) ایجاد می‌شود (Mittler et al. 2004). به‌عبارت دیگر، بخش‌بندی سدیم در واکوئل‌ها یا انتشار آن از میان غشای پلاسمایی به خارج از سلول، به همان اندازه‌ای که به بیان و فعالیت آنتی‌پورترهای  $Na^+/H^+$  مرتبط است، به بیان  $H^+$ -ATPase V-type و  $H^+$ -PPase وابسته است (Chinnusamy et al. 2005; Plett and Moller 2010; Teakle and Tyerman 2010). طبق مطالب ذکر شده، افزایش بیان ژن‌های کدکننده *SOS1* و *NHX1* در آزمایش حاضر ممکن است ناشی از افزایش بیان پمپ‌های غشایی تامین‌کننده شیب پروتونی لازم جهت فعالیت این آنتی‌پورترها باشد. سالیسیلیک‌اسید با روش‌های مختلفی از جمله دفع و بخش‌بندی سدیم، تعدیل اسمزی، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، تنظیم اکسیداتیو و ساخت پروتئین کینازها در اثر تنش، موجب سازگاری به تنش شوری می‌شود (Singh and Gautam 2013). با وجود مطالعات صورت‌گرفته، آن دسته از مکانیسم‌های پیام‌رسانی که باعث تغییر در پروتئوم گیاه در پاسخ به سالیسیلیک‌اسید می‌شوند هنوز کاملاً شناخته نشده‌اند ولی اطلاعات موجود نشان می‌دهد که سالیسیلیک‌اسید، MAP kinases (SIPK) را فعال می‌کند (Zhang and Klessig 1998a and b; Mikolajczyk et al. 2000) به‌طور کلی، فسفریله و دفسفریله شدن پروتئین‌ها در گیاهان نقش مهمی در پیام‌رسانی تنش‌ها و تخصیص پاسخ‌های سازگاری به تنش‌های شوری و خشکی ایفا می‌کند (Hoyos and Zhang 2000). اخیراً مشاهده شده که پروتئین‌های فسفریلاسیون



شکل ۹- تنظیم تعادل یونی در گیاهان در پاسخ به تنش شوری (Singh and Gautam 2013). دو مکانیسم تنظیمی شامل خروج سدیم از طریق غشای پلاسمایی توسط *SOS1* و بخش بندی سدیم در واکوئل سلولی بوسیله *NHX1* به منظور تنظیم تعادل یونی در گیاهان سازماندهی شده است (Mittler et al. 2004).



شکل ۱۰- شمای تولید پروتئین‌های حفاظتی توسط سالیسیلیک اسید (Tarchevsky et al. 2009)

MAPK, MAP kinase; LOG, lipoxygenase; NO, NO synthase; NADPH, NADPH oxidase signal systems; NPR1o, oligomeric NPR1 protein; NPR1m, monomeric NPR1 protein; TF1-TF3, transcription regulation factors TF1-TF3; PI, plasmalemma; R, receptor.

همچنین ژن‌های کد کننده پروتئین کینازها، به‌طور همزمان مورد بررسی قرار گیرند.

سالیسیلیک‌اسید در ایجاد تحمل به تنش شوری، تعداد بیشتری از ژن‌های دخیل در این مسیر از جمله تمامی ژن‌های مسیر *SOS* و

## منابع

Arfan M, Athar HR, Ashraf M (2007) Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? *Journal of Plant Physiology* 164:685-694.

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285:1256-1258.

Ashrafuzzaman M, Khan MAH, Shohidullah SM, Rahman MS (2000) Effect of salinity on the chlorophyll content, yield and yield components of QPM CV. *Nutricta. Pakistan Journal of Biological Sciences* 3:43-46.

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

Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren MG, Newman IA, Shabala S (2007) Root plasma membrane transporters controlling  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology* 145:1714-1725.

Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45:437-448.

Dewey DR (1962) Breeding crested wheat grass for salt tolerance. *Crop Science* 2:403-407.

El-Mergawi RA, Abdel-Wahed MSA (2004) Diversity in salicylic acid effects on growth criteria and different indol acetic acid forms among *faba bean* and maize. *Egyptian Journal of Agronomy* 26: 49-61.

Erdal S, Aydın M, Genisel M, Taspınar MS, Dumlupınar R, Kaya O (2011) Effects of salicylic acid on wheat salt sensitivity. *African Journal of Biotechnology* 10:5713-5718.

FAO (2007) Statistical database. Available at <http://faostat.fao.stat.fao.org>. FAO, Rome, Italy.

FAO (2008) FAO Land and Plant Nutrition Management Service. Available at <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>. FAO, Rome, Italy.

FAO (2011) Statistical database. Available at <http://faostat.fao.stat.fao.org>. FAO, Rome, Italy.

Farhoudi R, Sharifzadeh F, Poustini K, Makkizadeh MT, Kochakpor M (2007) The effects of NaCl priming on salt tolerance in canola (*Brassica napus*) seedlings grown under saline conditions. *Seed Science and Technology* 35:754-759.

Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A (2003) Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Plant Physiology* 41:281-284.

Flowers, TJ, Hajibagheri MA, Yeo AR (1991) Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant, Cell and Environment* 14:319-325.

Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y (2003) Function, Intracellular Localization and the Importance in Salt Tolerance of a Vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter from Rice. *Plant and Cell Physiology* 45:146-159.

Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, *AtNhx1* and *AtVp1*, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:1480-1485.

Gorham J, Wyn Jones RG, Bristol A (1990) Partial characterization of the trait for enhanced  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  discrimination in the D genome of wheat. *Planta* 180:590-597.

Gunes A, Ina A, Alpaslan M, Cicek N, Guneri E, Eraslan F, uzeldoru T (2005) Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.). *Archives of agronomy and soil science* 51:687-695.

Gutierrez-Coronado MA, Trejo-Lopez C, Larqué-Saavedra A (1998) Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 36:653-665.

Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (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.

Hoyos-Rendon ME (1998) Molecular biology of bacterial HR in tobacco plants. PhD thesis. University of Missouri, Columbia.

Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (2007) Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (Eds), Springer Publishing (in press).

Karasavina MS (2007) Effect of salicylic acid on solute transport in plants. In: Hayat S, Ahmad A (Eds) *Salicylic acid: a plant hormone*. Springer 25-68.

Kaya MD, Okcu G, Atak M, Cıkhı Y, Kolsarıcı O (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy* 24:291-295.

Kaydan D, Yagmur M, Okut N (2007) Effects of Salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Tarım Bilimleri Dergisi* 13:114-119.

Kiegle E, Moore C, Haseloff J, Tester M, Knight M (2000) Cell-type specific calcium responses to drought, NaCl, and cold in *Arabidopsis* root: a role for endodermis and pericycle in stress signal transduction. *Plant Journal* 23:267-278.

Klessig DF, Malamy J (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26:1439-1458.

- Li QF, Sun S, Yuan DY, Yu HX, Gu MH, Liu QQ (2010) Validation of candidate reference genes for the accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data in rice during seed development. *Plant Molecular Biology Reporter* 28:49-57.
- Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Plant Biology* 97:3730-3734.
- Malamy J, Klessig DF (1992) Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant Journal* 2:643-654.
- Masmoudi-Allouche F, Chaâri-Rkhis A, Kriaâ W, Gargouri-Bouzd R, Jain SM, Drira N (2009) In vitro hermaphroditism induction in date palm female flower. *Plant Cell Reports* 28:1-10.
- Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G, Klessig DF, Dobrowolska G (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12:165-178.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem FV (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9:490-498.
- Moore CA, Bowden HC, Scrase-Field S, Knight MR, White PJ (2002) The deposition of suberin lamellae determines the magnitude of cytosolic  $Ca^{2+}$  elevations in root endodermal cells subjected to cooling. *Plant Journal* 30:457-65.
- Munns R., Hare RA, James RA, Rebetzke GJ (2000) Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 51: 69-74.
- Munns R (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167:645-663.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Plant Biology* 59:651-681.
- Pancheva TV, Popova LP, Uzunova AN (1996) Effect of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *Journal of Plant Physiology* 149:57-63.
- Plett DC, Moller IS (2010)  $Na^+$  transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, Cell and Environment* 33:612-626.
- Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Regulation of *SOS1*, a plasma membrane  $Na^+/H^+$  exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by *SOS2* and *SOS3*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:8436-41.
- Quintero FJ, Ohta M, Shi HZ, Zhu JK, Pardo JM (2002) Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for  $Na^+$  homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:9061-66.
- Rakhmankulova ZF, Fedyayev VV, Rakhmatulina SR, Ivanov CP, Gilvanova IR, Usmanov IYu (2010) The effect of wheat seed presowing treatment with salicylic acid on its endogenous content, activities of respiratory pathways, and plant antioxidant status. *Russian Journal of Plant Physiology* 57:778-783.
- Raskin I (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annals of Botany* 43:439-463.
- Razeghi Yadak F, Tavakol Afshari R, Sharifzadeh F (2010) Effect of salt stress on acid and Alkaline Phosphatase activities of embryo axis during early stages of seed germination in tow bread wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Iranian Journal of Field Crop Science* 41:403-411 (In Farsi).
- Saberi MH, Amini A, Samadzadeh A, Tajalli H (2013) Evaluation of some wheat genotypes under salinity stress in field conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences* 6:77-86 (In Farsi).
- Sec enji M, Lendvai A, Miskolczi P, Kocsy G, Galle A, Szucs A, Hoffmann B, Sarvari E, Schweizer N, Stein P, Dudits D, Gyorgyey J (2010) Differences in root functions during long-term drought adaptation: comparison of active gene sets of two wheat genotypes. *Plant Biology* 12:871-882.
- Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova MV, Fathudinova RA, Fatkhudinova D (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164:317-322.
- Shi HZ, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK (2002) The putative plasma membrane  $Na^+/H^+$  antiporter *SOS1* controls long-distance  $Na^+$  transport in plants. *Plant Cell* 14:465-77.
- Singh PK, Gautam S (2013) Role of salicylic acid on physiological and biochemical mechanism of salinity stress tolerance in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:2345-2353.
- Sivritepe HO, Sivritepe N, Eris A, Turha E (2005) The effects of NaCl pre-treatments on salt tolerance of melons grown under long-term salinity. *Scientia Horticulturae* 106:568-581.
- Sottosanto JB, Gelli A, Blumwald E (2004) DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar NaC/HC antiporter: impact of *AtNHX1* on gene expression. *Plant Journal* 40:752-771.
- Sze H, Li X, Palmgren MG (1999) Enegrization of plant cell membranes by  $H^+$ -pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11:677-689.
- Tarchevsky IA, Yakovleva VG, Egorova AM (2010) Proteomic analysis of salicylate induced proteins of pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Biochemistry* 75: 590-597.
- Teakle NL, Tyerman SD (2010) Mechanisms of Cl- transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment* 33:566-589.
- Tracy FE, Gilliam M, Dodd AN, Webb AAR, Tester M (2008) NaCl-induced changes in cytosolic free  $Ca^{2+}$  in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant, Cell and Environment* 31:1063-1073.
- Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I (2004) Evaluation of real-time PCR data. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 18:212-214.
- Wu CA, Yang GD, Meng QW, Zheng CC (2004) The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast  $Na^+/H^+$  antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiology* 45:600-607.

Xue ZY, Zhi DY, Xue GP, Zhang H, Zhao YX, Xia GM (2004) Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Science* 167:849-859.

Zhang S, Klessig DF (1998a) The tobacco wounding-activated MAP kinase is encoded by SIPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:7225-7230.

Zhang S, Klessig DF (1998b) N resistance gene-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco MAP kinase

by TMV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:7433-7438.

Zhang HX, Blumwald E (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 19:765-768.

Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:12832-12836.

Zhu JK (2000) Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:941-948.