

## ارزیابی فیزیولوژیک، جداسازی، بررسی بیوانفورماتیک و بیان ژن *NADP* - مالیک آنزیم تحت تنش شوری در آلوروپوس لیتورالیس

### Physiological evaluation, isolation and gene expression investigation of *NADP*- malic enzyme undersalinity stress in *Aeluropus littoralis*

الهام یونسی ملردی<sup>۱\*</sup>، قربانعلی نعمت زاده<sup>۲</sup>، احسان شگری<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع

طبیعی ساری

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- دانشجوی دکتری، دانشگاه تهران

Younesi-Melardi E<sup>\*1</sup>, Nematzadeh Gh<sup>2</sup>, Shokri E<sup>3</sup>

1- PhD Student, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan,  
Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

2- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Sari Agricultural  
Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

3- PhD Student, University of Tehran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۱)

#### چکیده

در پژوهش حاضر برای بررسی مکانیسم فتوسنتزی گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری، دوسطح بدون نمک (شاهد) و ۶۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl به مدت ۱۰ روز اعمال شده سپس پاسخ‌های گیاه در سطوح فیزیولوژیک و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور توالی کدینگ این ژن برای اولین بار از گیاه آلوروپوس لیتورالیس جداسازی و بررسی‌های بیوانفورماتیک روی آن انجام شد. نتایج نشان داد که میزان کلروفیل، محتوای نشاسته و میزان سدیم خارج شده از برگ در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) داشتند. توالی کدکننده ژن *nadp-me* پس از استخراج در پایگاه داده با شماره دسترسی KP122942.1 ثبت شد. نتایج بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی نشان داد که توالی جداسازی شده با توالی گونه شورزی *Megathyrsus maximus* بیش‌ترین همسانی دارد. هم‌چنین تجزیه توالی پروتئینی نیز تایید کرد که قطعه جداسازی شده با طول ۷۴ آمینواسید بخشی از دامین متصل شونده به NAD(P) می‌باشد. نتایج تجزیه بیان نسبی نشان داد که بیان ژن *nadp-me* در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار نمک به میزان ۲/۱۹ برابر بیش‌تر از شاهد بوده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر، می‌توان اظهار داشت که افزایش بیان ژن *nadp-me* می‌تواند نقش موثری در ایجاد تحمل در برابر تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس داشته باشد.

#### واژه‌های کلیدی

آلوروپوس لیتورالیس

بیان ژن

شاخص‌های فیزیولوژیک

NADP-ME

## مقدمه

درک ما از اساس مولکولی مقاومت به شوری بسیار محدود است. یکی از استراتژی‌های مناسب برای درک مکانسیم‌های مولکولی مقاومت به شوری، بررسی تغییر بیان رونوشت ژن‌های درگیر در فرآیندهای مهم زیستی از جمله فتوسنتز، در گیاهان شورزی است. گیاهان براساس مسیر فتوستتزی به سه گروه C3، C4 و CAM تقسیم‌بندی می‌شوند. گیاهان C4 بخش کوچکی از پوشش گیاهی زمین را تشکیل می‌دهند و اکثر گیاهان جهان و عمده گیاهان زراعی جز گیاهان C3 محسوب می‌شوند. مطالعه مکانسیم فتوستتزی C4 که به علت ورود یک سری از ویژگی‌های آناتومیک و شیمیایی در راستای افزایش کارایی فتوستتزی در شرایط نامساعد (شوری، خشکی و دمای بالا) تکامل یافته است، دارای اهمیت می‌باشد.

این سیستم فتوستتزی با کمک دو گروه مجزای سلولی یعنی سلول‌های مزوفیل و غلاف آوندی، CO<sub>2</sub> را با غلظت بالا در اختیار روبیسکو<sup>2</sup> قرار می‌دهد (Maier et Edwards et al. 2004; al. 2011). بدین ترتیب که ابتدا CO<sub>2</sub> در سلول‌های مزوفیل برگ به دام افتاده و به صورت ترکیب چهار کربنه اگزالو استات<sup>3</sup> تثبیت می‌شود، سپس اگزالو استات به مالات<sup>4</sup> تبدیل شده و مالات به سلول‌های غلاف آوندی منتقل و با تبدیل شدن به پیروات<sup>5</sup>، CO<sub>2</sub> را در اختیار روبیسکو قرار می‌دهد. واکنش تبدیل مالات به پیروات و آزاد سازی CO<sub>2</sub> در کلروپلاست سلول‌های غلاف آوندی توسط آنزیم NADP-ME<sup>6</sup> (EC 1.1.1.40) کاتالیز می‌شود (Edwards et al. 2004). البته مسیری که با حضور این آنزیم انجام می‌شود، یکی از سه مسیر موجود در تغلیظ CO<sub>2</sub> در گیاهان CAM و C4 است. سایر آنزیم‌های که در این مسیرها درگیرند و در تغلیظ CO<sub>2</sub> نقش دارند عبارتند از NAD-ME<sup>7</sup> و PEPCK<sup>8</sup> که به ترتیب دکربوکسیلاسیون مالات را به پیروات در میتوکندری و دکربوکسیلاسیون اگزالواستات را به فسفوانول

شوری به‌عنوان یک تنش غیر زیستی رشد و نمو و عملکرد بسیاری از محصولات کشاورزی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Zhu 2002; Flowers and Colmer 2008; Wang et al. 2015). محصولات مهم کشاورزی به شوری حساس‌اند (Rohini et al. 2013). مقاومت به شوری صفتی چند ژنی است که به دامنه وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیک مرتبط می‌باشد. گیاهان شورزی که قادرند شوری بین ۱۵۰۰ - ۲۰۰ میلی‌مولار را تحمل کنند، گزینه‌های ایده‌آل برای مطالعه مکانسیم‌های پیچیده‌ی مقاومت به شوری به‌شمار می‌روند (Flowers and Colmer 2008; Tada et al. 2014; Bose et al. 2014). از جمله آن‌ها گیاه شورزی آلوروپوس لیتورالیس<sup>1</sup> است که با توجه به محتوای ژنومی کوچک (2n=2X=14) (Kaya et al. 2002) می‌تواند به‌عنوان یکی از مهم‌ترین کاندیدهای مدل ژنتیکی گیاهان شورزی معرفی شود. آلوروپوس لیتورالیس گیاهی علفی چندساله و از تیره گندمیان با سیستم فتوستتزی C4، می‌باشد که می‌تواند شوری (NaCl) را تا سطح بالاتر از ۶۰۰ میلی‌مولار تحمل کند (Gulzar et al. 2003; Li et al. 1994). فتوستتزی یکی از مهم‌ترین و پیچیده‌ترین فرایندهای فیزیولوژیک در گیاهان سبز است که با عملکرد رابطه مستقیم دارد (Jeffrey 2007) و به‌شدت تحت تاثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد (Ashraf and haris 2013). در اغلب گونه‌های گیاهی تنش اسمزی ناشی از شوری باعث بسته شدن روزنه، کاهش غلظت CO<sub>2</sub> بین سلولی و کاهش نرخ فتوستتزی می‌شود (Nardini et al. 2001)، از طرف دیگر شوری بر میزان رنگدانه‌های فتوستتزی مانند کلروفیل a و b اثر می‌گذارد. تنش شوری علاوه بر تنش اسمزی، از طریق ایجاد سمیت یونی به گیاه آسیب می‌زند، به طوری که غلظت بالای یون Na<sup>+</sup> در سیتوپلاسم سلول‌های گیاهی مانع جذب K<sup>+</sup> به‌عنوان عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاه می‌شود (James et al. 2011). بنابراین گیاهان با تغییر پارامترهای فیزیولوژیک از جمله تولید اسمولیت‌های سازگار مانند قندهای ساده و پیچیده که از هیدرولیز نشاسته به‌عنوان محصول ذخیره‌ای فتوستتزی حاصل می‌شوند، با این تغییرات مقابله می‌کنند (Bartels et al. 2005).

<sup>1</sup> *Aeluropus littoralis*<sup>2</sup> *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)*<sup>3</sup> Oxaloacetate<sup>4</sup> Malate<sup>5</sup> Pyruvate<sup>6</sup> *NADP-dependent malic enzyme*<sup>7</sup> *NAD-dependent malic enzyme*<sup>8</sup> *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*

## مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر بذور گیاه آلوروپوس لیتورالیس در ماسه کشت شده و با محلول مغذی هوگلند ۱۰۰ درصد که حاوی عناصر ماکرو و میکرو می‌باشد، آبیاری شد. پس از گذشت دو ماه از رشد رویشی، به منظور جلوگیری از وارد آمدن شوک اسمزی ناگهانی به گیاهان، ابتدا گلدان‌ها به مدت ۶ روز و در سه نوبت با ۱۵۰ میلی‌مولار نمک به همراه محلول هوگلند آبیاری شدند (Amira and Abdul 2011). سپس تیمار کلرید سدیم (برای اعمال تنش) در دو سطح بدون نمک (شاهد) و ۶۰۰ میلی‌مولار به مدت ده روز در سه تکرار بیولوژیک اعمال شد. بعد از اعمال تنش به منظور بررسی‌های فیزیولوژیک و مطالعات مولکولی نمونه‌گیری از برگ‌های بالغ و میانی گیاهان صورت گرفت. پژوهش‌های پیشین نشان دادند که آلوروپوس می‌تواند غلظت نمک تا ۶۰۰ میلی‌مولار را تحمل کند (Gulzar et al. 2003; Li et al. 1994).

برای اندازه‌گیری یون سدیم که از طریق غده‌های نمکی از برگ خارج و در سطح برگ تجمع یافتند، برگ‌های گیاه به آرامی بریده شده و پس از شستشو در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر، جذب یون با استفاده از دستگاه نشر شعله‌ای مدل CORNING.EEL قرائت شد. بدین منظور منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول سدیم تعیین شد (Ding et al. 2010; Suarez et al. 1992; Warwick et al. 2008).

میزان کلروفیل برگ‌ها با کمک روش Hiscox and Israelsta (1979) تعیین شد (Ayeni et al. 2012). به ازای هر ۰/۰۱ گرم بافت گیاهی پودر شده ۱/۵ میلی‌لیتر محلول DMSO اضافه شد، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس میزان جذب در طول موج‌های ۶۶۳ (کلروفیل a)، ۶۴۵ (کلروفیل b) نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد با قرار دادن در فرمول شماره (۱) (Arnon 1949) میزان کلروفیل‌ها برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شدند (Ayeni et al. 2012).

(فرمول ۱)

$$a \text{ کلروفیل } (\text{mg.l}^{-1}) : (12.25 * A_{663} - 2.79 * A_{647}) * D$$

$$b \text{ کلروفیل } (\text{mg.l}^{-1}) : (21.5 * A_{647} - 5.1 * A_{663}) * D$$

پیرووات در سیتوزول کاتالیز می‌کند (Detarsio et al. 2003) آنزیم NADP-ME این واکنش شیمیایی را در حضور یک فلز دو ظرفیتی و با استفاده از (S)-malate و NADP<sup>+</sup> به عنوان سوبسترا کاتالیز می‌کند و در نهایت CO<sub>2</sub>، پیرووات و NADPH تولید می‌شود. در مقیاس کوتاه مدت فعالیت این آنزیم از طریق مکانیسم آلوستریک و توسط سوبسترای خود (مالات) کنترل می‌شود. در بلند مدت فعالیت NADP-ME به وسیله تنظیم بیان ژن کنترل می‌شود (Saigo et al. 2013). بیان ژن nadp-me به طور گسترده‌ای توسط تنش‌های محیطی تنظیم می‌شود. پژوهش‌های قبلی نشان دادند که سینگال شوری بیان ژن nadp-me را تحریک می‌کند، Liao et al. (2007) و Sun et al. (2007) گزارش کردند که بیان ژن nadp-me و تجمع پروتئین‌های آن در دو گونه Aloe vera L, Aloe saponarea Haw به وسیله شوری تحریک می‌شود و شدت آن به میزان مقاومت دو گونه در برابر تنش شوری بستگی دارد. همچنین Fu et al. (2009) نیز گزارش کردند در گندم هگزاپلوئید فعالیت ژن nadp-me بعد از ۶ ساعت تحت تیمار نمک ۲۰۰ میلی‌مولار به یک مقدار حداکثر می‌رسد که دو برابر حد نرمال است. بنابراین می‌توان گفت بیان ژن nadp-me و فعالیت آنزیمی آن نقش مهمی در ایجاد مقاومت به شوری ایفا می‌کند.

گیاهان شورزی مانند آلوروپوس لیتورالیس از یک مکانیسم خودکار و ذاتی برای مقاومت در برابر تنش شوری استفاده می‌کنند بنابراین بررسی این مکانیسم در سطح مولکولی می‌تواند اطلاعات کاربردی‌تر و دقیق‌تری برای طراحی و مهندسی گونه‌های زراعی مقاوم به شوری در اختیار پژوهشگران قرار دهد. هدف از پژوهش حاضر سنجش برخی از پارامترهای فیزیولوژیک، جداسازی توالی کدشونده ایزوفرم فتوستنزی ژن nadp-me، مطالعات بیو انفورماتیک و بررسی تغییرات کمی بیان رونوشت‌های این ژن تحت تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از روش Real-time PCR بوده است.

<sup>1</sup> Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و قرائت طول موج ۶۳۰ نانومتر و با استفاده از فرمول زیر مقدار عددی نشاسته محاسبه شد:

(فرمول ۲)

$$C_{un} = A_{un}/A_{st} * C_{st}$$

که در این رابطه  $C_{un}$  غلظت نمونه مورد نظر،  $A_{un}$  طول موج جذب نمونه مورد نظر،  $A_{st}$  طول موج جذب نمونه استاندارد (محلول‌های استاندارد گلوکز) و  $C_{st}$  غلظت نمونه استاندارد می‌باشند.

از آن‌جا که توالی رمزکننده (CDS) ژن *nadp-me* برای گونه آلوروپوس لیتورالیس در بانک ژن موجود نبود، با استفاده از شماره دسترسی‌های HQ697600، AY274836.1، FN397881.1، EU977179، D16499.1، XM\_003568737.

براساس نواحی حفظ شده بین گونه‌ای، آغازگرهای مناسب برای تکثیر قطعه‌ای با طول ۶۰۰ جفت‌باز با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 طراحی شدند (جدول ۱). برای بررسی بیان ژن *nadp-me* (Real-time PCR) براساس توالی جداسازی شده و بعد از تایید صحت توالی، آغازگرهای داخلی با طول و شرایط مناسب طراحی شدند. طول قطعه تکثیر ۹۰ جفت‌باز در نظر گرفته شد. در پژوهش حاضر بیان نسبی ژن *nadp-me* با ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی مقایسه شد آغازگرهای مناسب برای تکثیر قطعه‌ای با طول ۹۰ جفت‌باز برای ژن بتا اکتین نیز طراحی شد (جدول ۱)

$$a+b \text{ کروفیل } (mg.l^{-1}) : (7.15 * A_{663} + 18.71 * A_{647}) * D$$

که در این معادلات A جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۷، D قطر خارجی کووت اسپکتروفتومتر (cm) می‌باشد.

میزان نشاسته نمونه‌های گیاهی طی مراحل زیر اندازه‌گیری شد (Scott and Melvin 1953). ماده گیاهی با استفاده از ازت مایع پودر شده و ۱/۵ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰ درصد به ۰/۰۱ گرم از آن اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه با یکدیگر مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه و با دور  $6000 \times g$  سانتریفوژ شدند و پس از انتقال مایع رویی به لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری (این مرحله دوبار تکرار شد)، در آن ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا اتانول کاملاً از ظرف خارج شود. سپس ۶۵۰ میکرولیتر اسید پرکلریک ۵۲ درصد و ۵۰۰ میکرولیتر آب اتوکلاو شده به رسوب باقی‌مانده از مرحله قبل اضافه و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با دور  $6000 \times g$  مایع رویی به لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری (این مرحله دوبار تکرار شد) و با افزودن آب به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از مایع اخیر به یک تیوپ ۲ میلی‌لیتر انتقال داده و با افزودن آب به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. در مرحله بعد ۴۰۰ میکرولیتر از محلول آنترن تهیه شده (محلول ۰/۰۲ گرم آنترن در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک خنک) به نمونه‌ها اضافه شده و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها بلافاصله روی یخ قرار گرفتند. در پایان با

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر، جداسازی و بررسی بیان ژن *nadp-me* در گیاه آلوروپوس لیتورالیس

| نوع آغازگر    | ژن             | توالی (۵'→۳')                                      | طول قطعه (bp) | دمای اتصال (°C) |
|---------------|----------------|--|---------------|-----------------|
| جداسازی (ISO) | <i>nadp-me</i> | F-ACACTGCTCTGGAGGAGTTG<br>R-CAACTCCAGATGTCCAATCAG  | ۶۰۰           | ۶۵              |
| بیان ژن (GE)  | <i>nadp-me</i> | F- CGCAGAACTCATTGCTCTTG<br>R- TCGGGAGTCAACAATCAGAC | ۹۰            | ۵۹              |
| رفرنس (RE)    | $\beta$ actin  | F- GTCCGAGTACCCGACCATG<br>R- GTGGTGCCGCTGTTCGAGA   | ۹۰            | ۵۹              |

جدول ۲- نتایج بلاست توالی پروتئینی قطعه‌ی ژنی *nadp-me* با سایر گونه‌ها

| شماره دسترسی  | نام گونه                    | میزان پوشش (%) | ارزش E | درصد همسانی |
|---------------|-----------------------------|----------------|--------|-------------|
| CAZ48717.1    | <i>Megathyrsus maximus</i>  | ۱۰۰            | 1E-41  | ۹۶          |
| CAZ48489.1    | <i>Aristida rhiniochloa</i> | ۱۰۰            | 2E-41  | ۹۳          |
| CAZ485514.1   | <i>Panicum miliaceum</i>    | ۱۰۰            | 4E-41  | ۹۵          |
| BAS70802.1    | <i>Oryza sativa</i>         | ۱۰۰            | 8E-39  | ۸۶          |
| AFL65183.1    | <i>Sorghum bicolor</i>      | ۱۰۰            | 2E-38  | ۸۹          |
| XP008648302.1 | <i>Zea mays</i>             | ۱۰۰            | 5E-38  | ۸۶          |

تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان کلروفیل، میزان سدیم خروجی، میزان نشاسته، با فرایند<sup>۳</sup> GLM نرم افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ و با استفاده از مدل آماری زیر مورد بررسی قرار گرفت:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در این مدل  $Y_{ij}$  مقدار صفت مورد نظر،  $\mu$  میانگین صفت مورد نظر در جامعه،  $T_i$  اثر تیمارهای اعمال شده (غلظت های صفر و ۶۰۰ میلی مولار نمک) و  $e_{ij}$  اثر خطای تصادفی می باشد. میانگین تیمارهای مورد نظر با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

به منظور تجزیه کمی بیان ژن مورد نظر، غلظت یکسانی از RNA (دو میکروگرم) برای سنتز cDNA در هر تکرار مورد استفاده قرار گرفت. cDNA تک رشته ای با کمک دستورالعمل شرکت فرمتاز و آنزیم Reverse transcriptase سنتز شد. بعد از سنتز cDNA برای حصول اطمینان از صحت توالی و دمای اتصال آغازگرهای طراحی شده و تعیین دقیق شرایط تکثیر بهینه، واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برای انجام مراحل واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی (Real time PCR) از مخلوط واکنش Syber Green I شرکت فرمتاز در حجم ۱۵ میکرولیتر و در حضور ژن  $\beta$ -actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. همچنین برای افزایش دقت آزمایش سه تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی برای هر تیمار آزمایشی مد نظر قرار گرفت. در کنار تکثیر نمونه های اصلی چاهک هایی به نمونه های کنترل منفی (NTC) و کنترل مثبت اختصاص داده شد. چرخه های حرارتی PCR به صورت واسرشته سازی آغازین در ۹۵ درجه سانتی گراد (۱۵ دقیقه)، ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی گراد (۱۵ ثانیه)، دمای اتصال آغازگر ۵۹ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه) و بسط نهایی در ۶۰ درجه سانتی گراد (۵ ثانیه) اعمال شد. در نهایت، از روش تصحیح کارآیی طبق فرمول شماره ۳ برای تعیین بیان ژن *nadp-me* استفاده شد (Pfaffl 2004):

(فرمول ۳)

کارآیی تکثیر E:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct \text{ target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct \text{ ref (control-treated)}}$$

<sup>3</sup> Genereized linear Model

به منظور جداسازی بخشی از ناحیه کدکننده ژن *nadp-me* استخراج RNA با کمک معرف تریزول انجام شد. پس از حذف آلودگی احتمالی DNA از RNA استخراج شده با استفاده از دستوالعمل تیمار با آنزیم DNAase I شرکت فرمتاز، RNA استخراج شده با کمک آنزیم Reverse transcriptase به cDNA تبدیل شد. به منظور تکثیر توالی ژن مورد نظر، از cDNA سنتز شده و آغازگرهای رفت و برگشت (ISO) در واکنش PCR استفاده شد. چرخه های حرارتی PCR به صورت واسرشته سازی آغازین در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (۳ دقیقه)، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی گراد (۴۵ ثانیه)، دمای اتصال آغازگر (۴۵ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی گراد (۱ دقیقه) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد (۷ دقیقه) اعمال شد. پس از حصول اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، حدود ۱۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۲/۵ درصد و با بافر TAE الکتروفورز شد قطعه مورد نظر از روی ژل بریده و پس از خالص سازی، برای توالی یابی دو طرفه با آغازگرهای رفت و برگشت به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد.

بعد از دریافت نتایج توالی یابی، فایل حاوی توالی خام توسط نرم افزارهای Chromas و BioEdit مورد بررسی قرار گرفت. پس از تعیین و جستجوی ORF تجزیه بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی برای تایید توالی و مقایسه همولوژی در بانک داده ها انجام شد. همچنین با رسم درخت فیلوژنتیک توالی های نوکلئوتیدی و پروتئینی با استفاده از نرم افزار MEGA4 و روش اتصال مجاور<sup>۱</sup>، رابطه خویشاوندی توالی رمزکننده *nadp-me* آلورپوس لیتورالیس با تعدادی از گیاهان C3، C4 و CAM مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین با استفاده از ابزار CAIcalculator (Puigbo et al., 2008) متغیرهای درصد GC و همچنین شاخص تمایل کدونی (CAI<sup>۲</sup>) برای توالی مورد نظر محاسبه شد. تجزیه توالی پروتئینی NADP-ME در پژوهش حاضر با استفاده از نرم افزار Interpro انجام شد.

<sup>1</sup> Neighbor joining

<sup>2</sup> Codon Adaptation Index

ژن هدف: *nadp-me*ژن رفرنس: *β actin*

## نتایج

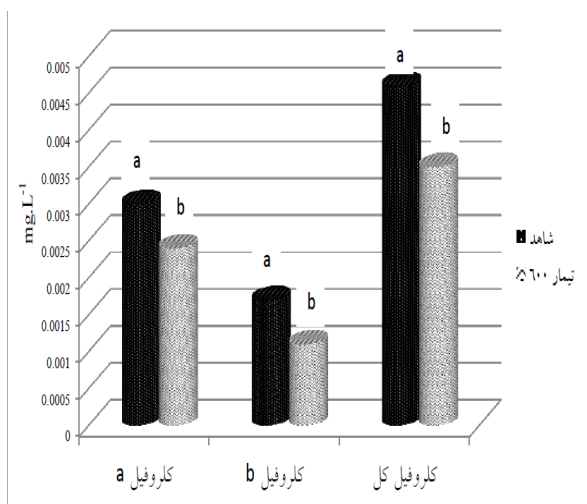
میزان کلروفیل a, b و کلروفیل کل در تیمار ۶۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۰/۰۰۲۴، ۰/۰۰۱۱، ۰/۰۰۳۵ میلی گرم بر لیتر به دست آمد، نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که این مقادیر نسبت به شاهد کاهش معنی دار آماری ( $P < 0.05$ ) را نشان می دهند (شکل ۱). میزان نشاسته به طور معنی داری ( $P < 0.05$ ) تحت تاثیر تیمار ۶۰۰ میلی مولار نمک قرار گرفت. به طوری که در این تیمار میزان نشاسته ۴/۶۹ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۲ الف). هم چنین سدیم خارج شده از برگ در تیمار ۶۰۰ میلی مولار نمک ۰/۲۲۸ ppm به دست آمد که این مقدار افزایش ۴/۴۷ برابری و معنی دار آماری را ( $P < 0.05$ ) نسبت به نمونه شاهد ( ppm ۰/۰۵۱) نشان می دهد (شکل ۲ ب).

پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، قطعه مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (ISO) تکثیر شد. الکتروفورز محصول PCR وجود یک باند با اندازه تقریبی ۶۰۰ جفت باز را مربوط به ژن *nadp-me* در آلوروپوس لیتورالیس نشان داد (شکل ۴ الف). نتایج تجزیه و تحلیل بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی (جدول ۲)، صحت قطعه جداسازی شده را تایید نمود. هم چنین این نتایج نشان داد که در سطح نوکلئوتیدی توالی به دست آمده از آلوروپوس لیتورالیس با *nadp-me* گونه های (FN397868.1) *australis* (FN397882.1) و *Megathyrsus maximus* به ترتیب ۹۳ و ۹۱ درصد تشابه و در سطح پروتئینی با گونه های *Megathyrsus maximus* (CAZ48717.1) و *Aristida rhiniochloa* (CAZ48489.1) به ترتیب ۹۶ و ۹۳ درصد همسانی دارد. هم چنین به منظور تعیین روابط خویشاوندی قطعه ژنی جداسازی شده، درخت فیلوژنیک، براساس توالی پروتئینی و نوکلئوتیدی به دست آمده و در مقایسه با برخی گونه های گیاهی دیگر موجود در پایگاه داده ها ترسیم شد. نتایج گروه بندی براساس توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی به ترتیب در شکل ۵ نشان داد که توالی رمزکننده *nadp-me* آلوروپوس لیتورالیس قرابت نزدیکی با ژن *nadp-me* دو گونه *Eleusine coracana*

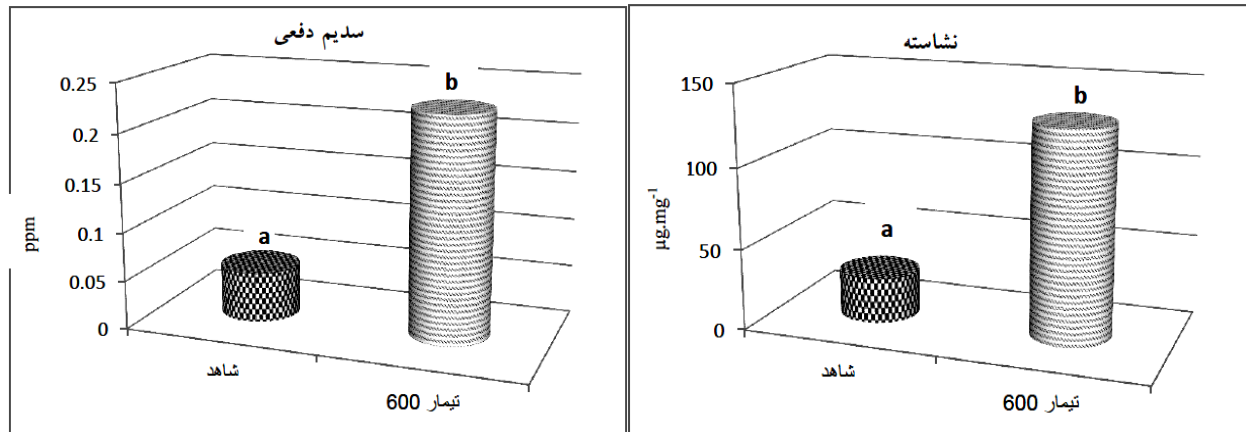
*Phragmites australis* دارد و در سطح پروتئینی نیز قرابت نزدیکی با توالی پروتئینی گونه های *Eleusine coracana* و *Panicum miliaceum* نشان داد.

با بررسی تمایل کدونی قطعه جداسازی شده ژن *nadp-me* از آلوروپوس لیتورالیس میزان درصد GC کل توالی، درصد GC در جایگاه نوکلئوتید سوم و هم چنین میزان CAI به ترتیب ۵۰ درصد، ۴۷،۲٪، ۰/۶۶۶ به دست آمد. تجزیه و تحلیل توالی پروتئینی NADP-ME آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از نرم افزار Interpro نشان داد که توالی جدا شده دارای ۷۴ آمینو اسید بوده که بخشی از دمین متصل شونده به NAD(P) (NAD(P)-binding domain) را تشکیل می دهد (شکل ۴ ج). توالی کامل پروتئینی این ژن در *Zea mays* دارای طول ۶۳۶ آمینو اسید است که دو دامین Malic enzyme, N-terminal domain و NAD(P)- domain را شامل می شود (شکل ۴ ب).

به منظور تعیین شرایط بهینه تکثیر، تایید صحت عملکرد آغازگرها (GE, RE) و بررسی کیفیت cDNA تهیه شده، از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. به دست آمدن تک باند با اندازه ۹۰ جفت باز، صحت تکثیر ژن مورد بررسی را تایید کرد (شکل ۶).



شکل ۱- مقایسه میزان کلروفیل a, b، کل بر حسب میلی گرم بر لیتر در برگ های گیاه آلوروپوس لیتورالیس در غلظت صفر (شاهد) و ۶۰۰ میلی مولار نمک ده روز بعد از اعمال تنش.



شکل ۲- الف) مقایسه میزان نشاسته بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم در برگ‌های گیاه آلوروپوس لیتورالیس در غلظت صفر (شاهد) و ۶۰۰ میلی‌مولار نمک ده روز بعد از اعمال تنش، ب) مقایسه میزان سدیم دفعی بر حسب ppm از برگ‌های گیاه آلوروپوس لیتورالیس در غلظت صفر (شاهد) و ۶۰۰ میلی‌مولار نمک ده روز بعد از اعمال تنش.

```
>HQ697600.1:116-2026 Zea mays NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME) mRNA,
complete cds
ATGCTGTCCACGCGCACCCGCGCGCTCGCCGCTCCCGCTCCCGCTGGAAGCTGGGAGGAC
GGAGCGAGGGCGCGCCAGCTGCGACGGATGCCGGACCTACAGGAACACCCTGCGGAGGAGGGCCGCGCC
CGCCAAAGGTGCGCGCCTTGCCGCCAGGCGGGTGGACGCGGTCGCGATGSCCTCCAACGCGGAGACGGAG
ACGGAGAAGGAGCAGGAGGAGGGCGCGGCCAGCGAGGAGCTGCCCGTCATGCCCTGGGCCACCTCCG
TCGCAAGCGGTACACCCCTTTGAGGGATCCACACCACAAGGGTCTTGTCTTACAGAGGAGGAAAG
GGATGGACACTACTTGCGTGGACTGCTTCCCGGCGACTACTATCTCAGGAACCTCAAATTAAGAAGTTC
ATGAACACCCTGCGGCAGTACCAGACCCCTTTCAGCGGTATATAGCTATGATGAACCTTCAGGAACCG
ACGAGAGGCTTTTCTACAAGCTTTAATTGATAATGPGGTGGAGCTGCTTCTTTTGTTCACACCAAC
TGTAGGTGAGGCTGCCAGAAGTATGGGTCCATCTTTGGACGACCACAGGGTCTGTATGTCCAGCCTGAAG
GACAAGGGGAAGGCTCTAGAAGTCTTAAGGAACCTGCCACATAGGAACATCAAGTTATCTGTGTACTG
ATGGTGGAGCGAATCTTGGGACTTGGAGATTTGGGTTGTGAGGGAATGGGAATCTGTAGGCAAACTTGC
TCTATACACTGCTCTGGAGGAGTTGACCATCAGTTTGCCTTGCCTATCACAATTGATGTTGGTACAAAT
AACGAGAACTGCTTAATGATGAGTTCTACATTTGGACTCCGCCAAAACCTGCGACCGGCGAGGAGTATG
ATGAGCTTATTGAAGAGTTCATGGCTGCTGTTAAGCAGTTCTATGGTGAGAAAAGTCTCATTGAGTTGA
GGACTTTGCCAATCATAATGCTTTGATTTGCTTGAATAATATAGCAAGGCCATCTTGTGTTCAATGAT
GATATCCAGGGCACAGCATCAGTGGTCTTGCAGGTTTGTAGCAGCACTCAAGATGGTGGTGGGACCC
TGGCAGAGCAGACTTATTTGTTCTTGGTCTGCGGGAGGCTGGAACCTGGTATTGCAGAACTTATTGCTCT
TGAGATTTGGAACAGACGAATGCTCCAATTGAAGAGTGCAGCAAGAGGTTGGCTGGTGGACTCAAAG
GGTTGATTTGTTGACTCTCGTAAAGGCTCTCTCAGCCATTCAGAAACCTTGGGCGCATGAGCGGAGC
CCTTGAACCTTGTATGATGCTGTTGATGCTCAAACTACAGTTCTGATCGGGACATCTGGAGTTGG
AAGAATTCACAAAAGAAATCATTGAGGCCATGCTTCTTCAACGAGAGGCTTATCATCTTTTCACTG
TCAACCCAACTCGCATCTTGAATGCATGCTGAACAAGCATATACATGGAGTCAGGGCCGTTCAATCT
TTGCCAGTGGCAGTCCATTTGCCCGCGTGGAGTACGAAGGAAAGACTTTTGTGCTGGGCGAGTCGAACAA
TGGCTTACATTTTCCCTGGACTCGGCCCTCGGTCTTGTGATCTCTGGAGCCGTCGGTGTCCACGAGGACATG
CTCCTCGCGGCTCGAAAGCGCTAGCTGATCAGGCCACACAGGACAACCTTCGAGAAAGGCTCCATCTCC
CACCTTACCAGCATCAGAAAGATCTCTGCGCACATCGCTGCAAGCCGTTGGTGCAAAAGCCTACGAGT
CGGTCTGGCGACCCGCTGCTCCCGCCAGCGACCTGATGAAATATGCAGAGAACTGCATGTACTCTCC
GTCTACCGCAACTACCGGTAG
```

(الف)

```
>KP122942.1 Aeluropus littoralis NADP-dependent malic enzyme mRNA, partial
cds
TTGTTCCCTTGGTGTGCGGAGGCTGGAACCTGGCATCGCAGAAGCTCATTGCTCTTGAGATTTCAAGACAGA
CAAAGGCTCCGATCGAAGAGTGTGCGAAGAGGGTTTGGCTGGTGGATTCAAAGGGTCTGATTTGTTGACTC
CCGAAGAGACTCCCTTCAGTCATTCAAAAAACCTTGGGCACATGACCATGAGCCCTTTGACGTCCTTGTGA
GATGCTGTCCAG
```

(ب)

شکل ۳- الف) کل توالی نوکلئوتیدی *Zea mays* NADP-ME (شماره دسترسی: HQ697600) به‌عنوان یکی از توالی‌هایی که برای طراحی آغازگر استفاده شد و محل آغازگر بر روی توالی با رنگ قرمز مشخص شد. ب) توالی نوکلئوتیدی *nadp\_me* جداسازی شده از گیاه آلوروپوس لیتورالیس ثبت شده در پایگاه داده با شماره دسترسی: KP122942.1 و طول ۲۲۲ نوکلئوتید. محل آغازگر طراحی شده به‌منظور انجام واکنش Real time PCR با رنگ قرمز مشخص شد.

>ADW27478.1 NADP-dependent malic enzyme [Zea mays]  
 MLSTRTAAVAASASPSPWKLGGRRSEGGASCDGCRTYRNTLRRRAAPAKVRALPPRRVDAVAMASNAETE  
 TEKEQEAAAAAEEELPVMFWATSVASGYTLRLDPHNNKGLAFTEERDGHYLRGLLPPAVLSQELQIKKF  
 MNTLRQYQTPLRQYIAMNQLQETDERLFYKLLIDNVVELLFPVYTPVTGGEACQKYGSIFGRPQGLYVSLK  
 DKGVLEVLRRNPHRNIQVICVTDGERILGLDGLGCQGMGIPVGGKALYALGGVDFPVSCLPITIDVGTN  
 NEKLLNDEFYIGLRKQKATGEEYDELIEEFMAAVKQFYGEKVLIQFEDFANHNADFLLLEKYSKSHLVFND  
 DIQGTASVVLGALLAALKMVGTTLAEQTYLFLGAGEAGTGIAELIALEISKQTNAPIEECCRKKNLVDKSK  
 GLIVDSRKGSLQPFKKPWAHEREPLKTYLDAVQSIKPTVLIQTSVGVGRFTTKEIIEAMSSFNERPFIIFSL  
 SNPTSHSECTAEQAYTWSQGRSIFASGSPFAPVEYEGKTFVPGQSNNAIYIPGLGLGLVISGAVRVHEDM  
 LLAASKALADQATQDNFEKGSIFPPFTSIRKISAHIAAAVAAKAYELGLATRLPPPSDLMKYAENCMYTP  
 VYRNYR

(ب)

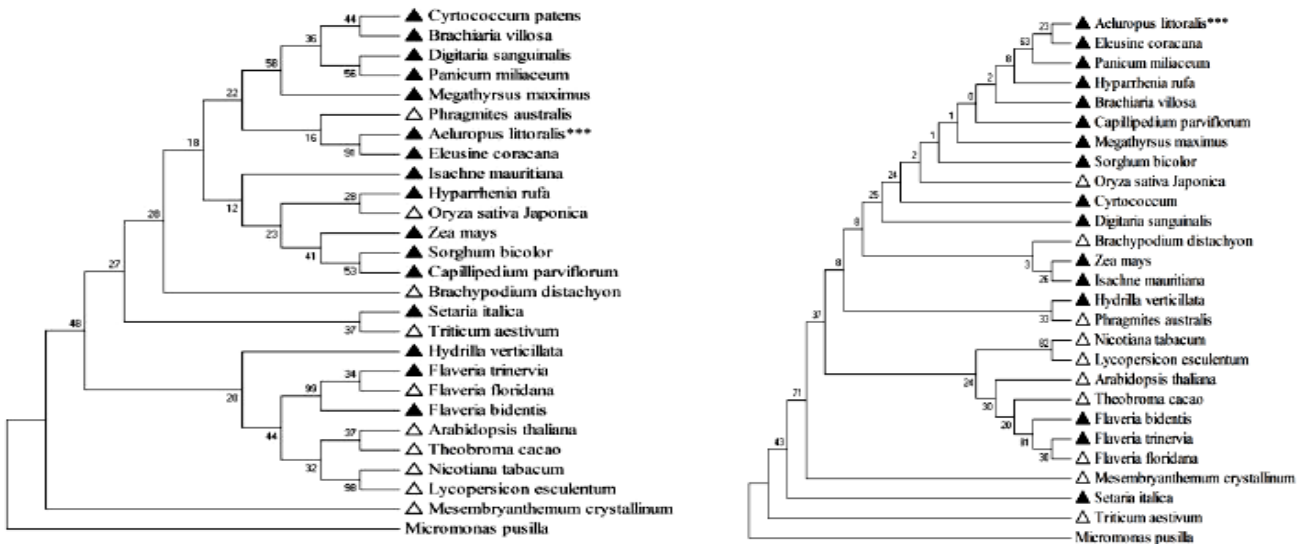


(الف)

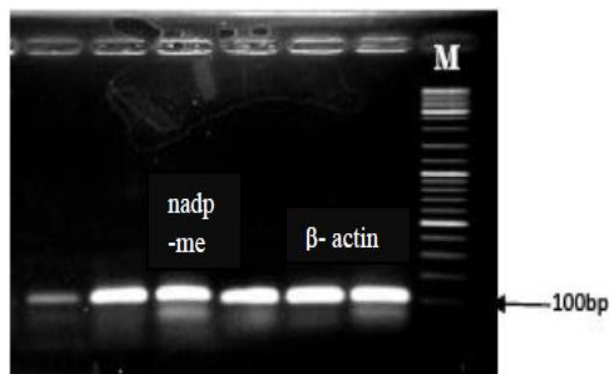
>AJR16757.1 NADP-dependent malic enzyme, partial [Aeluropus littoralis]  
 LFLGAGEAGTGIAELIALEISRQTKAPIEECRKRVWLVDSKGLIVDSRRDLSQSFKKPWAHDHEPLTSL  
 DAVQ

(ج)

شکل ۴- الف) نمونه‌ای از توالی تکثیر شده ژن *nadp-me* همراه با نشانگر وزن مولکولی شرکت فرمتاز (M: SM0311.#) ب) توالی کامل پروتئینی *Zea NADP- ME* (شماره دسترسی: KPI122942.1) با طول ۶۳۶ آمینواسید. محل دو دمین پروتئینی Malic enzyme, N-terminal domain (از نوکلئوتید ۹۶ تا ۳۴۹) و NAD(P)-binding domain (از نوکلئوتید ۳۵۰ تا ۶۳۵) که به ترتیب بارنگ قرمز و رنگ آبی در تصویر نشان داده شد. ج) توالی پروتئینی *NADP- ME* آلورپوس (شماره دسترسی: AJR16757) با طول ۷۴ آمینو اسید که بخشی از دمین NAD(P)-binding domain این پروتئین می‌باشد.



شکل ۵- مقایسه قرابت توالی نوکلئوتیدی *nadp-me* (راست)، توالی پروتئینی NADP-ME، آلورپوس لیتورالیس با سایر گونه‌ها (چپ). درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 و روش اتصال مجاور (Neighborjoining) ترسیم شد. و فراسنجه تکرار در ترسیم، ۱۰۰۰ در نظر گرفته شد.



شکل ۶- نمونه‌هایی از محصول PCR برای تایید صحت عملکرد آغازگرهای GE و RE. طول قطعه تکثیر شده ۹۰ جفت‌باز است. M: نشانگر وزن مولکولی

#SM1153



در تنش شوری حفظ تعادل  $k^+$  و  $Na^+$  بسیار حیاتی است (Anschütz et al. 2014). گونه آلوروپوس لیتورالیس در گروه رکتوهایوفیت‌ها (Recretohalophytes) که قادر به ترشح نمک از طریق غده‌ها و پرزهای نمکی به خارج از برگ هستند دسته‌بندی می‌شود (Flowers et al. 2015). دفع مقادیر زیادی سدیم در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار NaCl کارآمدی این گیاه را در دفع سدیم از طریق غده‌های نمکی نشان می‌دهد (شکل ۲ ب)، با توجه به آنکه داده‌های فیزیولوژیکی مختلف نشان می‌دهد که فرایند ترشح نمک به مقدار زیادی انرژی نیاز دارد (Yuan et al. 2015)، می‌توان پیش‌بینی کرد که یکی از دلایل ضعف گیاه در غلظت‌های بالای نمک مصرف انرژی زیاد طی پروسه‌ی حذف نمک است.

پاسخ سازگاری یا مقاومت به تنش شوری در گیاه شامل کمپلکس پیچیده‌ای از ویژگی‌های فیزیولوژیک، مسیرهای متابولیکی، شبکه‌های ژنی یا مولکولی است. در نتیجه به‌منظور بررسی پاسخ فتوسنتزی گیاه آلوروپوس لیتورالیس در سطح مولکولی توالی نوکلئوتیدی ژن *nadp-me* به‌صورت ناقص جداسازی شد و بعد از بررسی‌های بیو انفورماتیک و تایید توالی در پایگاه داده با شماره دسترسی KP122942.1 ثبت و سپس تغییرات بیان آن در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار نمک مورد بررسی قرار گرفت.

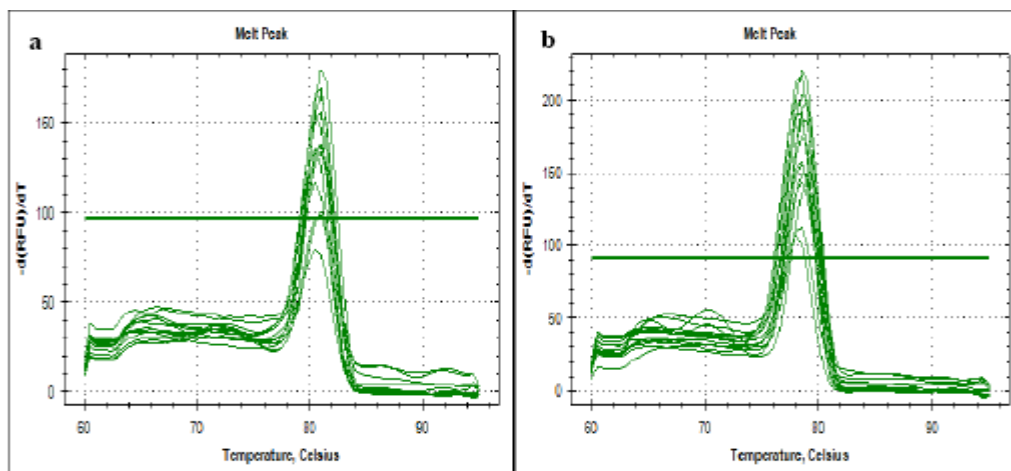
توالی نوکلئوتیدی *nadp-me* آلوروپوس لیتورالیس به‌ترتیب ۹۳ و ۹۱ درصد با *nadp-me* گونه‌های *Megathyrsus maximus* (FN397868.1) و *australis Phragmites* (FN397882.1) و در سطح پروتئینی به‌ترتیب ۹۶ و ۹۳ درصد با گونه‌های *Megathyrsus maximus* (CAZ48717.1) و *Aristida rhiniochloa* (CAZ48489.1) همسانی داشت (جدول ۲). تجزیه‌های فیلوژنتیک تخمینی از چگونگی اشتقاق اعضای یک خانواده در طی تکامل هستند. این روابط به‌وسیله مطالعه جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد و جهش با آرایش مجدد که در معرض انتخاب طبیعی می‌باشد تعیین می‌شوند (Golovnina et al. 2007). در پژوهش حاضر با ترسیم درخت فیلوژنتیک نمونه‌های مورد نظر در سطح پروتئینی و نوکلئوتیدی به‌طور نسبی به دو گروه عمده تقسیم شدند (شکل ۵).

هم‌چنین پس از خاتمه چرخه‌های تکثیر Real-time PCR اختصاصی بودن محصولات تکثیر یافته با تجزیه منحنی ذوب بررسی شد. پیک اختصاصی محصول برای ژن *nadp-me* در دمای ۷۸/۵ درجه سانتی‌گراد و ژن کنترل داخلی بتا اکتین در دمای ۸۱ درجه سانتی‌گراد در شکل ۷ نشان داده شده‌است که عدم حضور پرایمر دایمر و تکثیر غیراختصاصی را تایید می‌کند.

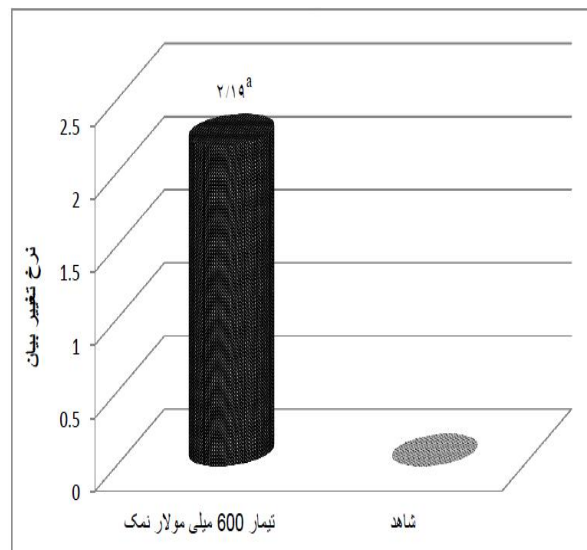
بررسی میزان تغییر در بیان ژن *nadp-me* تحت تیمار با تنش شوری نشان داد که پس از ۱۰ روز اعمال تنش (غلظت نمک ۶۰۰ میلی‌مولار)، بیان ژن مورد نظر در آلوروپوس لیتورالیس به میزان ۲/۱۹ برابر نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت (شکل ۸).

## بحث

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که محتوای کلروفیل در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl نسبت به شاهد به‌طور معنی‌دار کاهش یافته است (شکل ۱). دو عامل مهم یعنی نرخ سنتز از پیش ماده‌ی گلوتامات و میزان تخریب توسط آنزیم کلروفیلاز محتوای کلروفیل برگ را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که با توجه به آنکه گلوتامات علاوه بر کلروفیل پیش ماده پرولین به‌عنوان یک اسمولیت سازگارکننده نیز می‌باشد، در نتیجه احتمالاً در تنش شوری با رقابت ایجاد شده بین سنتز کلروفیل و پرولین، سهم سنتز کلروفیل و محتوای آن در برگ کاهش می‌یابد (Le Dily et al. 1993). از دلایل احتمالی دیگر برای کاهش محتوای کلروفیل می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم تخریب‌کننده کلروفیل (کلروفیلاز) در اثر افزایش موادی نظیر آبسیزیک اسید تحت تنش شوری اشاره کرد (Bertrand and Schoefs 1999). در پژوهش حاضر میزان نشاسته برگ نسبت به شاهد افزایش بسیار معنی‌داری را نشان داد (شکل ۲ الف). نشاسته محصول ذخیره‌ای فتوسنتز بوده که اگرچه به‌طور مستقیم در مکانیسم تحمل تنش شوری دخالت ندارد ولی تبدیل قندهای محلول (به‌عنوان محصول اولیه فتوسنتز) به نشاسته از مهار فتوسنتز از طریق فیدبک منفی قندهای محلول جلوگیری کرده و لذا باعث تداوم چرخه فتوسنتزی می‌شود (Roitsch 1999).



شکل ۷- آنالیز منحنی ذوب ژن‌های *nadp-me* (راست) و بتا اکتین در پژوهش حاضر (چپ). دمای ذوب محصولات واکنش ژن‌های *nadp-me* و بتا اکتین به ترتیب ۷۸/۵ و ۸۱ درجه سانتی‌گراد بود.



شکل ۸- مقایسه بیان ژن *nadp-me* در تیمارهای مختلف. سطح پایه (صفر) به عنوان شاهد در نظر گرفته شده است. محور طولی: تیمارهای اعمال شده، محور عرضی: میزان تغییر بیان تیمارها نسبت به شاهد نشان می‌دهد. نرمال سازی داده‌ها با استفاده از ژن بتا-اکتین انجام شد. a: بیان ژن *nadp-me* در تیمار ۶۰۰ میلی‌مولار نمک ۲/۱۹ برابر تیمار شاهد بود.

در این پژوهش در راستای بررسی‌های بیوانفورماتیک، شاخص تمایل کدونی و درصد GC قطعه ژنی جداسازی شده از *nadp-me* آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از ابزار CAIcalculator محاسبه شد. درصد GC کل توالی، درصد GC نوکلئوتید سوم و شاخص تمایل کدونی قطعه ژنی جداسازی شده برابر ۵۰، ۴۷/۲ و ۰/۶۶ برآورد شد. این مقادیر می‌توانند نشان دهنده سطح بالای بیان این ژن و نیاز به استفاده از کدون‌های بهینه در آن باشد. نشان داده شده است که تمایل کدونی در ژن‌های با سطح بیان بالا

بنابراین با توجه به آنکه این تقسیم‌بندی به‌طور کامل انجام نشد می‌توان احتمال داد که این پروتئین در سطح تکامل به‌طور کامل بین گونه‌ها تفرق حاصل نکرده است. نتایج نشان دادند که توالی موردنظر در آلوروپوس در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی با گونه C4 و گیاه شورزی *Eleusine coracana* بیشترین نزدیکی را داشت، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تغییر در توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی کارآیی این گونه‌ها را برای زندگی در محیط شور افزایش داده است.

افزایش می‌یابد (Cushman 1992). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تنظیم فرادستی ژن *nadp-me* تحت تنش شوری احتمالاً به‌وسیله فاکتورهای رونویسی وابسته به آبسیزیک اسید میانجی‌گری می‌شود.

از طرف دیگر بستن شدن روزنه‌ها می‌تواند NADP-ME را تحت تاثیر قرار دهد (Turner et al. 2001; Schroeder et al. 2001). با بسته شدن روزنه‌ها جذب CO<sub>2</sub> کاهش می‌یابد از آنجا که عملکرد NADP-ME تحویل CO<sub>2</sub> به رویسکو سلول‌های غلاف آوندی است (Zhang 2003)، گیاه با افزایش محتوای NADP-ME کارایی تحویل و تثبیت CO<sub>2</sub> را در سطح مطلوب حفظ می‌کند.

Sun et al. (2003) گزارش کردند که mRNA و فعالیت آنزیم NADP-ME در گیاهان *Aloe vera L.* و *Aloe saponarea Haw* در دوره‌های زمانی مشخص، تحت تنش شوری افزایش می‌یابد. همچنین نتایج به‌دست آمده افزایش بیان ژن *nadp-me* و تجمع پروتئین آن به‌وسیله‌ی شوری را تایید کردند. بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که افزایش بیان ژن *nadp-me* در این پژوهش می‌تواند با هدف افزایش احتمالی تجمع پروتئین و در نهایت افزایش فعالیت آنزیم رخ داده باشد. از سوی دیگر با توجه به آن‌که پروتئین NADP-ME پروتئینی آبدوست است (Schroeder et al. 2001; Li et al. 2009) می‌توان پیش‌بینی کرد که یکی از دلایل افزایش بیان در سطح mRNA این است که گیاه با افزایش تولید پروتئین‌های آبدوست فشار اسمزی سلول را افزایش داده و اثر نامطلوب کمبود آب را کنترل می‌کند.

مالات ماده اولیه‌ی آنزیم NADP-ME است، که افزایش تجمع آن و دیگر یون‌های منفی مانند Cl<sup>-</sup> با ورود یون Na<sup>+</sup> به سلول در طول تنش شوری به‌منظور برقراری توازن یونی گزارش شده‌است (Li et al. 1999; Cushman 1992; Zhang et al. 2009). اما سرنوشت مالات تولید شده در این مرحله کاملاً روشن نیست. از سوی دیگر برخی از مطالعات تایید کرده‌اند که افزایش سنتز NADP-ME نیز در همین مرحله اتفاق می‌افتد، در نتیجه می‌توان گفت احتمالاً این آنزیم در متابولیسم مالات تولید شده در این مرحله نیز مشارکت دارد (Wu et al. 2008; Shao et al. 2009) و بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که یکی از دلایل افزایش بیان NADP-ME افزایش تولید مالات در سلول است.

شدیدتر است و در این ژن‌ها برخی کدون‌ها نسبت به کدون‌های دیگر ترجیح داده می‌شوند (Harrison et al. 2011).

نتایج تجزیه توالی پروتئینی NADP-ME آلورپوس با استفاده از نرم‌افزار Interpro نشان داد که توالی جداشده دارای ۷۴ آمینو اسید می‌باشد (شکل ۴ ج) که بخشی از دامین متصل شونده به NAD(P) را تشکیل می‌دهد. این دامین از اعضای خانواده بزرگ Rossmann type fold بوده که شامل سه پیچش آلفا / بتا / آلفا می‌باشد. پروتئین‌های مختلفی از جمله مالیک آنزیم‌ها این دامین را دارا می‌باشند. با بررسی توالی این دامین در گونه‌های نزدیک مانند ذرت و توتون مشخص شد طول کامل این دامین در این آنزیم ۱۸۱ جفت‌باز است (Li et al. 2009).

در پژوهش حاضر بیان نسبی ژن *nadp-me* در مقایسه با ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی اندازه‌گیری شد. بتا اکتین یکی از پر کاربردترین ژن‌های مرجع در مطالعات بیان ژن می‌باشد. Tian et al. (2015) با بررسی پروفایل بیانی ۹ ژن رفرنس *GAPDH*, *TUB*, *EF-1α*, *UBQ*, *TIP41*, *SAND*, *PP2A*, *eIF-4α*, *ACTIN* در هویج تحت تنش‌های مختلف گرمایی، سرمایی، شوری و خشکی نشان دادند که ژن‌های *ACTIN* و *TUB* پایدارترین ژن‌ها در بین ژن‌های مورد مطالعه بودند. نتایج بررسی بیان ژن *nadp-me* افزایش بیان در سطح رونوشت در تیمار ۶۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۸).

تنش شوری سطح بیان بسیاری از ژن‌هایی را که به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم با محافظت گیاه ارتباط دارند تغییر می‌دهد (Carillo et al. 2003). بررسی پژوهش‌های پیشین نشان داد که مطالعات زیادی در مورد مکانیسم تنظیم بیان ژن *nadp-me* تحت تنش شوری انجام نشده‌است. احتمالاً مکانیسم‌های تنظیمی مختلفی به منظور تحمل تنش شوری با یکدیگر همکاری می‌کنند. که در این میان فیتو هورمون آبسیزیک اسید تنظیم کننده‌های مرکزی در مقاومت به تنش‌ها در گیاهان به شمار می‌رود (Cutler et al. 2010; Kim et al. 2010) و اثر خود را بر بیان ژن‌های موجود در یک رگولان توسط فاکتورهای رونویسی اعمال می‌کند (Abe et al. 2009; Busk and Pagés 1998; Saibo et al. 1997). هم‌چنین نشان داده شده‌است که غلظت NADP-ME با افزایش محتوای آبسیزیک اسید در سلول‌های محافظ روزنه تحت تنش شوری

مولکولی مقاومت در برابر تنش شوری در گیاه C4 و شوری مثل آلوروپوس لیتورالیس بتوان رهیافت‌های مهندسی ژنتیک صحیح‌تری را برای انتقال ویژگی‌های مثبت این گیاه به برخی از گیاهان استراتژیک مثل برنج، ذرت و گندم طراحی کرد.

بنابراین پیشنهاد می‌شود که برای بررسی بیشتر اساس مولکولی تنظیم بیان این ژن تحت تنش شوری، مکانیسم‌های تنظیم کننده بیان ژن در سطح رونوشت و پروتئین مورد بررسی قرار گیرد. تا با در دسترس داشتن اطلاعات جامع‌تری درباره مکانیسم‌های

### منابع

- Abe H, Yamaguchi Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.
- Amira MS, Abdul Q (2011) Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 10: 7-15.
- Anschütz U, Becker D, Shabala S (2014) Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *Journal of Plant Physiology* 171:670-687.
- Arnon DI (1949) copper enzymes in isolated chloroplast; polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology* 24:1-15.
- Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51: 163.
- Ayeni O, Ndakidemi P, Snyman R, Odendaal J (2012) Assessment of Metal Concentrations, Chlorophyll Content and Photosynthesis in *Phragmites australis* along the Lower Diep River, Cape Town, South Africa. *Energy and Environment Research* 2 : 128-139.
- Bartels D, Sunkars R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 24:23-58.
- Bertrand M, Schoefs B (1999) Photosynthetic pigment metabolism in plants during stress. In: *Handbook of plant and crop stress* (ed. Pessarakli, M.) Marcel Dekker, New York 527- 543.
- Bose J, Rodrigo-Moreno A, Shabala S (2014) ROS homeostasis in halophytes context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 65:1241-57.
- Busk PK, Pages M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* 37: 425-435.
- Carillo P, Annunziata MG, Pontecorvo G, Fuggi A, Woodrow P (2011) Salinity stress and salt tolerance. In: Arun S, editor. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations* Croatia: InTech. pp. 22-38.
- Cushman JC (1992) Characterization and expression of a NADP-malic enzyme cDNA induced by salt stress from the facultative crassulacean acid metabolism plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *European Journal of Biochemistry* 208: 259-26.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* 61: 651-679.
- Detarsio E, Gerrard Wheeler MC, Campos Bermudez VA, Andreo CS, Drincovich MF (2003) Maize CNADP-malic enzyme Expression in *Escherichia coli* and characterization of site-directed mutants at the putative nucleotide-binding sites. *Journal of Biological Chemistry* 278: 13757-13764.
- Ding F, Chen M, Sui N, Wang BS (2010) Ca<sup>2+</sup> significantly enhanced development and salt-secretion rate of salt glands of *Limonium bicolor* under NaCl treatment. *South African Journal of Botany* 76: 95-101.
- Echevarría C, García-Maurin S, Alvarez R, Soler A, Vidal J (2001) Salt stress increases the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in *Sorghum* plants. *Planta* 214:283-287.
- Edwards GE, Franceschi VR, Voznesenskaya EV (2004) Single cell C(4) photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annual Review of Plant Biology* 55: 173-196.
- Flowers TJ, Colmer TD (2008) Salinity tolerance in halophytes. *The New Phytologist* 179:945-963.
- Flowers TJ, Munns R, Colmer TD (2015) Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany* 115: 419-431.
- Furumoto T, Hata S, Izui K (1999) cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase, a bundle sheath cell-specific enzyme. *Plant Molecular Biology* 41: 301-11
- Fu ZY, Zhang ZB, Hu XJ, Shao HB, Xu P (2009) Cloning, identification, expression analysis and phylogenetic relevance of two NADP-dependent malic enzyme genes from hexaploid wheat. *Comptes Rendus Biologies* 332: 591-602.
- Gulzar S, Khan MA, Ungar IA (2003) Salt tolerance of a coastal salt marsh grass. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 34: 2595-2605.
- Harrison RJ, Charlesworth B (2011) Biased gene conversion affects patterns of codon usage and amino acid usage in the *Saccharomyces sensu stricto* group of yeasts. *Molecular biology and evolution* 28: 117-129.
- Hasegawa PBR, Zhu J, Bohnert H (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 51:463-99.
- Hibberd JM, Sheehy JE, Langdale JA (2008) Using C photosynthesis to increase the yield of rice: rationale and feasibility. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 228-231.
- Hiscox JD, Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* 57: 1332-1334.

- Hong SY, Kim OK, Kim SG, Yang MS, Park CM. Nuclear import and DNA binding of the ZHD5 transcription factor is modulated by a competitive peptide inhibitor in *Arabidopsis*. The Journal of Biological Chemistry 286: 1659-1668.
- Garg R, Verma M, Agrawal S, Shankar R, Majee M, Jain M (2013) Deep Transcriptome Sequencing of Wild Halophyte Rice, *Porteresia coarctata*, Provides Novel Insights into the Salinity and Submergence Tolerance Factors. DNA Reseach 21:69-84.
- Golovnina KA, Glushkov SA, Blinov AG, Adkison LR Goncharov NP (2007) Molecular phylogeny of the genus *Triticum*. Plant Ecology, Evolution and Systematics 264: 195-216.
- Iglesias AA, Andreo CS (1990) Kinetic and structural properties of NADP-malic enzyme from sugarcane leaves. Plant Physiology 92: 66-72.
- James RA, Blake C, Byrt C S, Munns R (2011). Major genes for Na<sup>+</sup> exclusion, *Nax1* and *Nax2* (wheat *HKT1;4* and *HKT1;5*), decrease Na<sup>+</sup> accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. Journal of Experimental Botany 62: 2939-2947.
- Jeffrey SA (2007) Improving photosynthesis and yield potential. Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses 27-58.
- Le-Dily F, Billard JP, Le-Saos J and Huault C (1993) Effects of NaCl and gabaculine on chlorophyll and proline levels during growth of radish cotyledons. Plant physiology and biochemistry 31:303-310.
- Liao Y, Peng YG, Chen GZ (2007). Research advances in plant salt tolerance mechanism. Acta Ecologica Sinica 27: 2077-2089
- Li MY, Liu YJ (1994) Halophytes of Yellow River Delta in north Shandong Province of China. Journal of Qufu Normal University pp: 125-133
- Li WH, Hao NB, Ge QY, Zhang QD (1999) Advance in Study on CPathway in CPlant. Chinese Bulletin Botanical 16: 97-106.
- Li ZH, Zhang LJ, Cui ZH, Zhu YS, Fan JJ, Ruan YY, Wang C (2009) Bioinformatical Analysis on C NADP-ME from Maize. Biotechnology Bulletin 3: 61-64.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature biotechnology 17:287-91.
- Kaya C, Kirnak H, Higgs D and Saltali K (2002) Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. Scientia horticulturae 93: 65-74.
- Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. Annual Review of Plant Biology 61: 561-591.
- Maier A, Zell MB, and Maurino VG (2011) Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C4 and C3 photosynthesis. Journal of Experimental- Botany 62: 3061-3069.
- Maurino VG, Drincovich MF, Andreo CS (1996) NADP-malic enzyme isoforms in maize leaves. Biochemistry and Molecular Biology International 38: 239-250.
- Maurino VG, Weber APM (2013) Engineering photosynthesis in plants and synthetic microorganisms. Journal of Experimental Botany 64: 743-751.
- Nilsen ET, Orcutt DM (1996) The physiology of plants under stress: abiotic factors volum 1. Wiley, New York.
- Nardini A, Tyree MT, Salleo S (2001) Xylem cavitation in the leaf of *Prunus laurocerasus* and its impact on leaf hydraulics. Plant Physiology 125:1700-1709.
- Palidwor GA, Perkins TJ, Xia X (2010) A general model of codon bias due to GC mutational bias. PLoS One 5: e13431.
- Parida Ak, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: A review Ecotoxicology and Environmental Safety 60:324-349.
- Pfaffle MW (2004) Quantification strategies in real-time PCR. Chaper 3 pages 87 - 112 in: A-Z of quantitative PCR (Editor: S.A. Bustin) International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA publication.
- Puigbo P, Bravo IG, Garcia-Vallve S (2008) E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI) BMC Bioinformatics 9:65.
- Roitsch T(1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biology* 2: 198-206
- Saibo NJ, Lourenco T, Oliveira MM (2009) Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. Annals of botany 103: 609 - 623.
- Saigo M, Bologna FP, Maurino VG, Detarsio E, Andreo CS and Drincovich MF (2004) Maize recombinant non-C NADP-malic enzyme: a novel dimeric malic enzyme with high specific activity. Plant Molecular Biology 55: 97-107.
- Saigo M, Tronconi MA, Gerrard Wheeler MC, Alvarez CE, Drincovich MF, Andreo CS (2013) Biochemical approaches to C4 photosynthesis evolution studies: the case of malic enzymes decarboxylases. Photosynthesis Research 117: 177-87.
- Scott TA, Melvin EH (1953) Determination of dextran with anthrone. Analytical Chemistry. 25:1656-1661.
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Manivannan P, Panneerselvam R, Shao MA (2009). Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants—biotechnologically and sustainably improving agriculture and the eco-environment in arid regions of the globe. Critical Reviews in Biotechnology 29: 131-151. 27.
- Shao HB, Liu ZH, Zhang ZB, Chen QJ, Chu LY, Brestic M (2011) Biological roles of crop NADP-malic enzymes and molecular mechanisms involved in abiotic stress. African Journal of Biotechnology 10: 4947-4953.
- Shi H, Lee Bh WSJ, Zhu JK (2003) Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Nature biotechnology 21:81-5.
- Sun SB, Shen QR, Wan JM, Liu ZP (2003). Induced Expression of the Gene for NADP-malic Enzyme in Leaves of *Aloe vera* L. under Salt Stress. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 35: 423-429.

- Suarez N; Medina E (2008) Salinity effects on leaf ion composition and salt secretion rate in *Avicennia germinans* (L.) L. Brazilian Journal of Plant Physiology 20:131-140.
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ (2001) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. Nature 410:327-330.
- Tada Y, Komatsubara S, and Kurusu T (2014) Growth and physiological adaptation of whole plants and cultured cells from a halophyte turfgrass under salt stress. AoB Plants 6: plu041.
- Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang G, Xu Z, Xiong Ai (2015) Selection of Suitable Reference Genes for qPCR Normalization under Abiotic Stresses and Hormone Stimuli in Carrot Leaves. Plos One 10: e0117569.
- Turner NC, Wright GC, Siddique KHM (2001) Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. Advances in Agronomy 71:193-231.
- Udvardi MK, Kakar K, Wandrey M, Montanri O, Murray J, Andraiankaja A, Zhang J-Y, Benedito V, Hofer JMI, Cheng F, Town CD. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. Plant Physiology 144: 538-549.
- Wang J, Baochun L, Yaxiong M, Xiaole M, Yong L, Erjing S, Ke Y, Panrong R, Xunwu Sh, Huajun W (2015). Transcriptomic profiling of the salt-stress response in the halophyte *Halogeton glomeratus*. BMC Genomics 16:169.
- Warwick NWM, Halloran GM (1992) Accumulation and excretion of sodium, potassium and chloride from leaves of two accessions of *Diplachne fusca* (L.) Beauv. New Phytologist 121: 53-61.
- Wu YM, Lv JZ, Wang SJ, Li RZ (2008). Research Progress on Eco-physiological Responses of Plants to Drought Conditions. Rain Fed Crops 28: 90-93.
- Yuan F, Lyv M J, Leng BY, Zheng GY, Feng ZT, Li PH and et al (2015) Comparative transcriptome analysis of developmental stages of the *Limonium bicolor* leaf generates insights into salt gland differentiation. Plant Cell Environ 38: 1637-1657.
- Zhang F, Chi W, Wang Q, Zhang QD, Wu NH (2003). Molecular cloning of C4-specific Ppc gene of sorghum and its high level expression in transgenic rice. Chinese Science Bulletin. 48: 1835-1840.
- Zhang ZB, Shao HB, Xu P, Hu MY, Song WY, Hu XJ (2009). Focus on Agricultural Biotechnology: Prospective for Bio-watersaving Theories and their Applications in the Semi-arid and Arid Areas. African Journal of Biotechnology 8: 2779-2789.
- Zhifang G, Loescher WH (2003) Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. Plant, Cell and Environment 26:275-83.
- Zhu J. Salt and drought stress signal transduction in plants (2002) Annual Review of Plant Biology 53:247.