

## 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>، محمد رضا عظیمی<sup>۱</sup>، فرید شکاری<sup>۱</sup>، زهرا السادات شیر<sup>۲</sup>

۱- به ترتیب دانش آموخته 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 و ۱/۵ گرم کلریدسدیم در هر کیلوگرم خاک) و پرایمینگ بذر با سالیسیلیک اسید (۰/۱۲۰ میکرومولار) مورد مطالعه قرار گرفت. تنش شوری موجب کاهش معنی دار ( $P \leq 0.01$ ) وزن خشک گیاهچه در مورد هر دو ژنوتیپ شد. گیاهان پرایم شده با سالیسیلیک اسید که تحت تنش شوری ۱/۵ گرم کلریدسدیم 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 کلریدسدیم و سالیسیلیک اسید به طور معنی داری 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 *SOS1* و *NHX1* را تنظیم کرده و سرانجام تحمل به تنش شوری را افزایش دهد.

### واژه‌های کلیدی

سالیسیلیک اسید  
شوری  
گندم  
*NHX1*  
*SOS1*

## مقدمه

نقش روش های به نزدی و به زراعی در افزایش عملکرد گندم در مناطق خشک بر کسی پوشیده نیست، با این حال، در سال های اخیر کاربرد ترکیبات تنظیم کننده های رشد، جهت افزایش Arfan (et al. 2007) با وجود آگاهی از نقش سالیسیلیک اسید در تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیابی گیاه و نیز اثرات آن بر صفت مقاومت به تنش شوری، نحوه و مکانیسم عمل آن چندان مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا، هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر بیان ژن های *SOS1* و *NHXI* در ریشه گندم تحت تنش شوری در مرحله گیاهچه ای می باشد.

## مواد و روش ها

بذر ارقام گندم بم به عنوان رقم متحمل به شوری (Saber et al. 2013) و قدس به عنوان 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 سالیسیلیک اسید افزوده شد. بذرها طی ۲۴ ساعت در دمای  $8\pm 2$  درجه سانتی گراد در تاریکی خشک شدند و پس از ضدعفونی با قارچ کش کاربوکسین تیرام (۰:۱۰۰۰) در گلدان های محتوى خاک و ماسه به نسبت ۱:۲ کشت شدند. سطوح شوری کلرید سدیم با افزودن مقادیر صفر، ۰/۵، یک و ۱/۵ گرم کلرید سدیم در هر کیلوگرم خاک اعمال شد. هدایت الکتریکی خاک مورد استفاده جهت کشت برابر با یک دسی زیمنس بود که پس از اعمال تنش شوری، به ترتیب به ۳، ۷ و ۱۰ دسی زیمنس رسید. در هر گلدان چهار عدد بذر کشت شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در شش تکرار، طراحی و در گلخانه گروه زراعت و اصلاح بنات دانشگاه زنجان اجرا شد. فاکتورها شامل نوع ژنتیپ (دو سطح)، سطوح شوری (چهار سطح) و پرایمینگ با سالیسیلیک اسید (دو سطح) بود. آبیاری با آب معمولی، به صورت وزنی و با توجه به ظرفیت زراعی خاک انجام شد. پس از سبز شدن، تغذیه گیاهان با کود کامل، به صورت

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 تأمین می کنند (FAO 2007). گندم و جو بیشترین سطح زیر کشت محصولات زراعی در ایران را به خود اختصاص داده اند (FAO 2011). بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین های زراعی سراسر جهان به دلیل شوری ۳۹۷ میلیون هکتار (یا شرایط مرتبط با قلیاییت (۴۳۴ میلیون هکتار) تحت تنش شوری قرار دارند که این میزان بیش از ۶ درصد از کل زمین های زراعی دنیا است (FAO 2008).

اگرچه ریشه های گندم توانایی بالایی در کنترل غلظت یون های  $\text{Na}^+$  و  $\text{Cl}^-$  دارند و در شوری های بالا، غلظت یونی در ریشه ها افزایش نمی یابد (Gorham et al. 1990)، با این حال، شوری از عوامل مهم محدود کننده تولید محصول در گندم به شمار می رود. به طور کلی، در فاز اول تاثیر شوری بر گیاه (مرحله تنش اسمزی)، سیگنال های هورمونی بیش از روابط آبی رشد گیاه را کنترل می کنند. بنابراین مطالعه تنظیم کننده های رشد در تنش شوری اهمیت زیادی دارد (Munns 2005).

سالیسیلیک اسید یک هورمون گیاهی با ماهیت فنولی است که در گیاهان در مقادیر کم وجود دارد و محلول در آب می باشد (Raskin et al. 1992). سالیسیلیک اسید به عنوان تنظیم کننده داخلی رشد باعث تغییرات ویژه ای در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاهان می شود (Shakirova et al. 2003)، همچنین در میزان جذب یون ها و انتقال آن ها در گیاهان نقش دارد (Gunes et al. 2005). اثر سالیسیلیک اسید 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 سال های اخیر قابلیت سالیسیلیک اسید در ایجاد اثر محافظتی در گیاهان تحت تنش های غیرزنده مورد بررسی قرار گرفته است. پیش تیمار بذر با سالیسیلیک اسید یک روش ساده فیزیولوژیکی است که طبق مطالعات صورت گرفته بر روی گیاهان مختلف، می تواند در گیاهان زراعی و با غی به عنوان روشی مفید برای افزایش رشد گیاهچه های تحت تاثیر تنش های محیطی از جمله شوری، مورد استفاده قرار گیرد (Kaya et al. 2004).

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 ۱۷۰-۸۸۳۱ ساخت شرکت BIORAD) استفاده شد.

توالی تمامی ژن های مورد نظر از سایت NCBI اخذ و آغازگرهای مربوطه با کمک نرم افزار OLIGO نسخه ۵ طراحی شد. طراحی آغازگر ژن های *NHX1* و *SOS1* به گونه ای صورت گرفت که جفت آغازگر در محدوده ناحیه غیر ترجمه شونده (UTR<sup>3'</sup>)<sup>۱</sup> که برای هر ژن، اختصاصی است قرار داشته باشند تا با استفاده از هر جفت آغازگر، تنها ژن مورد نظر به طور اختصاصی تکثیر شود. ژن *TaActin* به عنوان ژن خانه دار 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 *AccuPower® 2X GreenStarTM* qPCR Master Mix (Bioneer, Korea) سه تکرار زیستی بود. از کیت Real-time PCR استفاده شد و برنامه دمایی-سایبرگرین در PCR اعمال شد و برنامه دمایی-زمانی واکنش زنجیره ای پلیمراز شامل دمای واسرتست سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۵ چرخه تکثیر با دمای واسرتست سازی ۹۵ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه در دستگاه اجرا شد.

آزمون نرمالیته اشتباہات آزمایشی و داده های مربوط به صفات زراعی به روش Anderson-Darling در نرم افزار SAS نسخه ۹ انجام و داده ها با تبدیل لگاریتمی نرمال شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها (به روش آزمون چند دامنه ای دانکن) توسط نرم افزار MSTATC انجام شد. تجزیه داده های Real-time PCR کمی به روش  $\Delta\Delta CT$  صورت گرفت.

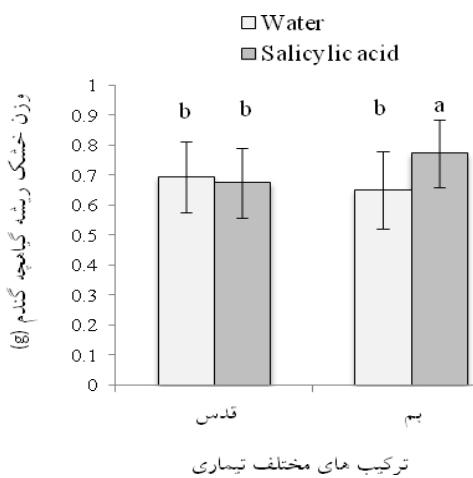
محلول ۰/۲ درصد در آب آبیاری، با فواصل زمانی یک روز انجام گرفت. ریشه ها ۲۵ روز پس از کاشت، از گلدان خارج و شسته شدند. ریشه بوته های سه تکرار پس از جدا کردن بخش هوایی گیاه، به نیتروژن مایع متقل شدند. ریشه ها و بخش هوایی سایر بوته های هر تیمار، برای اندازه گیری وزن خشک در داخل ورقه آلومینیومی در آون ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. اندازه گیری 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 دستور العمل آن انجام گرفت. بدین ترتیب که پس از سانتریفوژ مخلوط RNAX-PLUS و نمونه پودر شده، مایع شفاف و طایی رنگ فوقانی به تیوب دیگری متقل و سپس محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل (نسبت حجمی ۱:۲۴) به آن اضافه و سانتریفوژ شد، مایع شفاف فوقانی به تیوب دیگری متقل 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، تیوب به مدت ۱۶-۱۸ ساعت بر روی یخ در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سرانجام سانتریفوژ شد. سنجش کمیت RNA توسط دستگاه Spectrophotometer (مدل NANODROP 2000 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 به ازای هر RNAse، یک میکرولیتر بافر و یک واحد آنزیم DNase I free به داخل میکروتیوب اضافه شد و با افزودن آب DEPC، حجم واکنش به ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس میکروتیوب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد نگهداری شد.

<sup>۱</sup> ۳' Untranslated region

ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر (5'-3')	دماهی اتصال (°C)	اندازه محصول PCR (جفت باز)	53
AB181991.1	<i>TaActin</i>	5'-GTGTACCCTCAGAGGAATAAGG 5'-GTACCACACAATGTCGCTTAGG	151	53	رفت برگشت
AY296910.1	<i>NHXI</i>	5'-GGTCACCCATAGAGAGGAG 5'-CCCAAGAGCAAAACTGAGTG	154	55	رفت برگشت
AY326952.3	<i>SOSI</i>	5'-CGGTAGGAGAAGATGACGAC 5'-GAGGGTGGATTGAACGAAAG	89	55	رفت برگشت

خشک بخش هوایی و ریشه گیاهچه ژنتوپ بم شد. در صورتی که در مورد ژنتوپ قدس نوع پرایم بذر تاثیری بر وزن خشک گیاهچه نداشت (شکل های ۱ و ۲). بر اساس برخی مطالعات انجام شده، پیش تیمار بذرهای گندم با سالیسیلیک اسید منجر به افزایش وزن خشک و طول ریشه و بخش هوایی شد که 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).

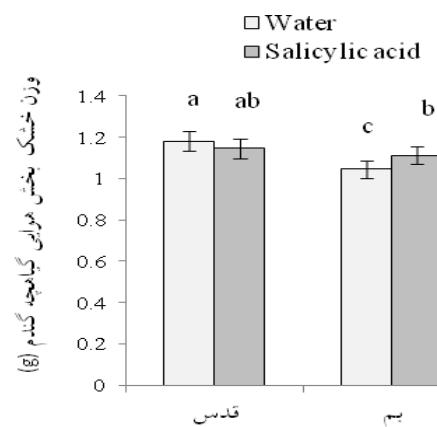


شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل ژنتوپ × پرایم با سالیسیلیک اسید برای صفت وزن خشک ریشه گیاهچه گندم

نتایج مقایسه میانگین ترکیب‌های مختلف تیماری در مورد اثر متقابل ژنتوپ × شوری نشان داد که به طور کلی در مورد هر دو ژنتوپ، با افزایش سطح تنفس شوری، وزن خشک گیاهچه گندم به طور معنی داری ( $P \leq 0.05$ ) کاهش یافت و تنها در سطح چهارم

**نتایج و بحث**

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



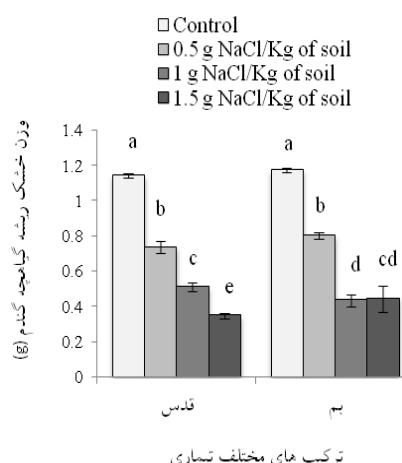
شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل ژنتوپ × پرایم با سالیسیلیک اسید برای صفت وزن خشک بخش هوایی گیاهچه گندم

نتایج مقایسه میانگین ترکیب‌های مختلف تیماری در مورد اثر متقابل ژنتوپ × پرایم با سالیسیلیک اسید نشان داد که کاربرد سالیسیلیک اسید به طور معنی داری ( $P \leq 0.01$ ) 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 بخش هوایی	وزن خشک ریشه	منابع تغییر
درجه آزادی	درجه آزادی	
۰/۰۰۸ ns	۱	۰/۰۰۲ ns
۰/۰۰۶ ns	۱	۰/۱۱ **
۰/۰۲۱ **	۱	۰/۰۰۴ ns
۰/۹۶۲ **	۳	۰/۰۹ **
۰/۰۴۱ **	۱	۰/۰۴۲ **
۰/۰۱ *	۳	۰/۰۱ *
۰/۰۳ **	۳	۰/۰۲ **
۰/۰۱ *	۳	۰/۰۲۶ **
۰/۰۰۲	۱۵	۰/۰۰۲
		تکرار
		ژنتیپ
		پرایم با سالیسیلیک اسید
		شوری
		ژنتیپ × پرایم با سالیسیلیک اسید
		شوری × ژنتیپ
		شوری × پرایم با سالیسیلیک اسید
		ژنتیپ × پرایم با سالیسیلیک اسید × شوری
		خطا
		ضریب تغییرات (درصد)
۷/۰۱	۴/۳۴	

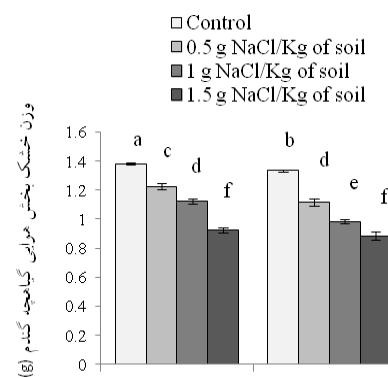
ns و \*\* به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد



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

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

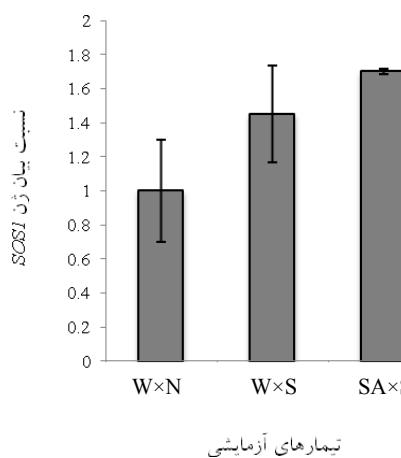
از تنش شوری، وزن خشک ریشه گیاهچه ژنتیپ بم در مقایسه با ژنتیپ قدس بیشتر بود (شکل‌های ۳ و ۴). طبق مطالعات صورت گرفته سطوح بالای شوری منجر به کاهش معنی دار پارامترهای رشد مثل سطح برگ، طول برگ و وزن خشک ریشه و بخش هوایی گیاه می‌شود (Ashrafuzzaman et al. 2002; Munns et al. 2000) همچنین تنش شوری مانع از افزایش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



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

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

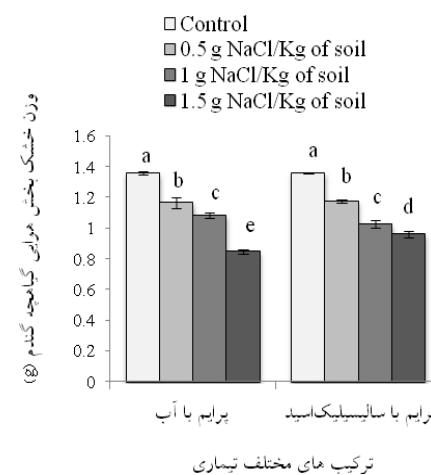
طبق گزارشات موجود، افزایش دو برابری در بررسی بیان نسبی ژن به روش  $\Delta\Delta CT$  به عنوان حداقل اختلاف معنی دار در نظر گرفته می شود (Vaerman et al. 2004; Secenji et al. 2010). به طور کلی در این آزمایش، با اعمال تنش شوری بیان ژن SOS1 در ریشه گیاهچه های گندم افزایش یافت، مقدار این افزایش بیان، در حالت 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 پارانشیم ریشه، بارگیری سدیم به داخل آوند چوبی طی تنش شوری ملایم است (Shi et al. 2000).



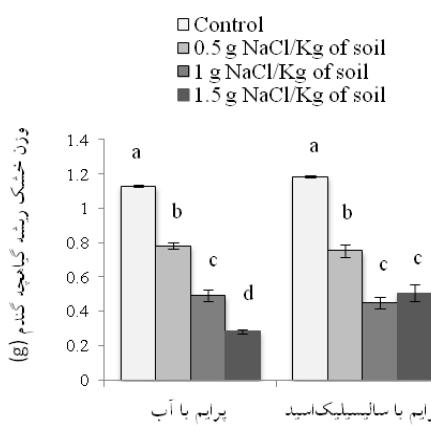
شکل ۷- نمودار مقایسه بیان ژن SOS1 در ریشه گیاهچه تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد در گندم رقم بم: W (پرایم با آب مقطر؛ SA) (پرایم با سالیسیلیک اسید؛ S) اعمال تنش شوری ۱/۵ گرم کلریدسدیم در کیلوگرم خاک؛ (N) عدم اعمال تنش شوری

در مسیر SOS که یک مسیر اختصاصی پاسخ به تنش شوری است، شبکه های حسگر و پیام رسان، موجب پاسخ های زودهنگام به تنش شوری می شوند (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 Tracy et al. 2008) و این افزایش، موجب بارخی اطلاعات ژنتیکی در سلول می شود (Tracy et al.

افزایش وزن خشک گیاهچه گندم شد (شکل های ۵ و ۶). بنابر گزارشات موجود، تیمار سالیسیلیک اسید به طور معنی داری باعث افزایش وزن تازه و خشک ریشه و بخش هوایی گندم در شرایط شوری شد (Erdal et al. 2011). همچنین پیش تیمار بذرهای 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 بذرهای گندم با سالیسیلیک اسید منجر به افزایش وزن خشک و طول ریشه و بخش هوایی شد که این افزایش، در ریشه بسیار بارز تر بود (Malamy and Klessig 1992; Pancheva et al. 1996; Rakhrankulova et al. 2010).

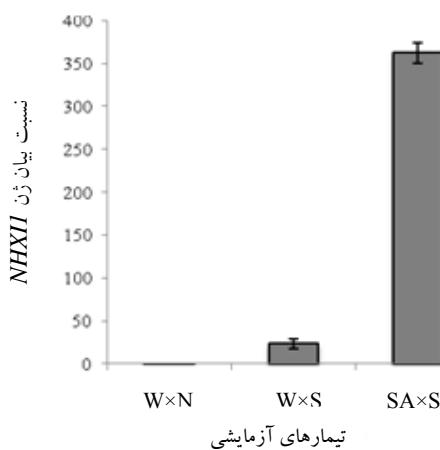


شکل ۵- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل پرایم با سالیسیلیک اسید × شوری برای صفت وزن خشک بخش هوایی گیاهچه گندم



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

افزایش می‌دهد (Apse et al. 1999; Zhang and Blumwald 2001). ژن *NHX1* در برخی گونه‌های گیاهی مانند آراییدوپسیس (Apse et al. 1999)، گندم (Zhang and Fukuda et al. 2003)، گوجه فرنگی (Zhang and Fukuda et al. 2003)، برنج (Li et al. 2006) و سویا (Blumwald 2001) 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 برنج‌های تاریخت 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 کلریدسدیم در کیلوگرم خاک، N) عدم اعمال تنش شوری

طبق مطالعات صورت گرفته، با تلفیق آنتیپورترهایی مانند *SOS1* و *NHX1* در شرایط تنش شوری، انتشار سدیم به آپولاست و بسته‌بندی آن در واکوئل سلولی، افزایش یافت (شکل ۹). در آراییدوپسیس، ارتباط این دو آنتیپورتر 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 هم‌افزایی، مهم هستند. برای مثال با افزایش بیان *SOS1* و *NHX1* در نتیجه،

(2008). در مسیر *SOS*، افزایش کلسمیم آزاد سیتوزولی توسط پروتئینی به نام *SOS3* یا همان *CBL4*<sup>۱</sup> حس می‌شود و تشکیل دایمر *CBL4/SOS3* با *SOS2* (CIPK24<sup>۲</sup>) را تسريع می‌کند (Halfter et al. 2000). *SOS2* یک پروتئین «سرین/ترؤنین» و در Halfter et al. 2000; Liu et al. 2002) غشای *CBL4/CIPK24* (SOS3/SOS2)، کمپلکس *CBL4/CIPK24* پلاسمایی را مورد هدف قرار می‌دهد و موجب فسفریلاسیون و فعالیت آنتیپورتر غشایی  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  یا همان *SOS1* می‌شود (Shi et al. 2002; Quintero et al. 2002; Qiu et al. 2002). وقتی گیاهان با تنش شوری مواجه می‌شوند بیان *SOS1* افزایش می‌یابد (Masmoudi 2009). نتایج بیان ژن *SOS1* در آزمایش حاضر نشان می‌دهد که در رقم گندم متتحمل به تنش شوری احتمالاً مکانیسم‌های دیگری علاوه بر مسیر *SOS* به منظور برقراری تعادل یونی و حفظ شاخص‌های رشد توسعه یافته است. علت تفاوت وزن خشک گیاهچه‌های رقم بم، تحت تیمارهای شوری و سالیسیلیک اسید احتمالاً بخش‌بندی سدیم در اندامک‌های سلولی باشد. از سوی دیگر، عدم وجود تفاوت معنی‌دار در بیان این ژن در آزمایش حاضر را می‌توان بهمیزان بالای تغییرات موجود بین تکرارهای آزمایشی نسبت داد. بنابراین توصیه می‌شود به منظور دست‌یابی به نتایج دقیق‌تر و قابل استنادتر، تعداد تکرارهای آزمایش در مطالعات بعدی افزایش یابد.

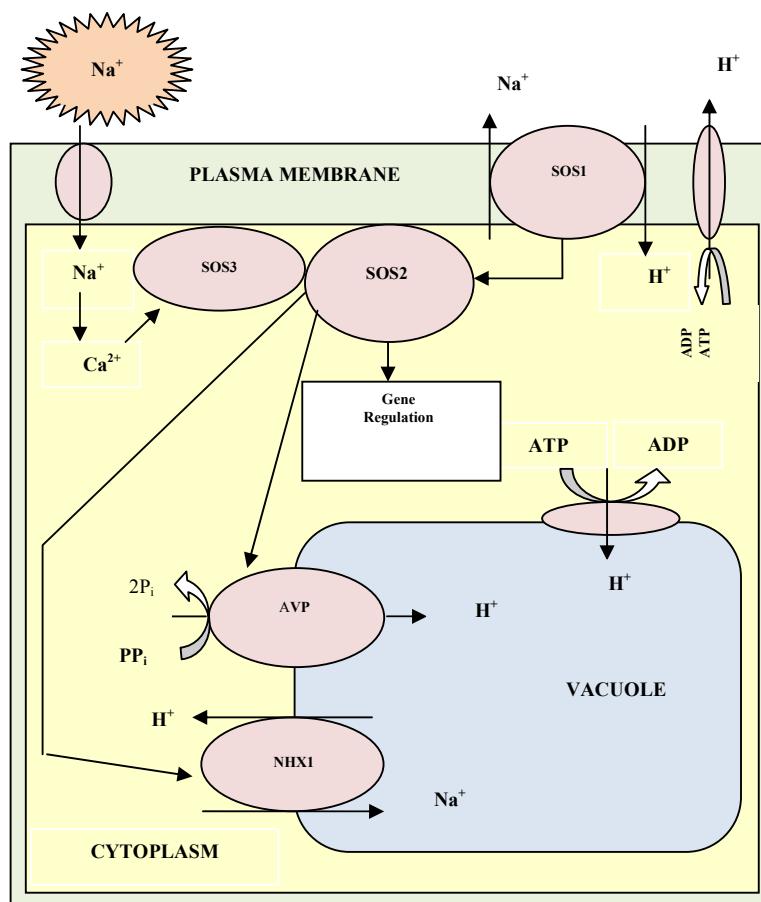
طبق نتایج پژوهش حاضر، با اعمال تنش شوری، بیان ژن *NHX1* در ریشه گیاهچه‌های گندم افزایش یافت، میزان این افزایش در مقایسه با تیمار شاهد، در حالت پرایم با آب، به ۲۳ برابر و در صورت پرایم با سالیسیلیک اسید به ۳۶۰ برابر رسید (شکل ۸). *NHX1* یک آنتیپورتر غشایی است که در غشاء تونوپلاست قرار دارد. استفاده از این ژن برای افزایش تحمل به شوری، موفقیت‌آمیز بوده (Apse et al. 1999) و حاکی از این مطلب است که این پروتئین طیف گسترده‌ای از فرآیندهای سلولی، نمو، پیرایش پروتئین‌ها و ارتباط میان آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Sottosanto et al. 2004). شواهد قانع‌کننده‌ای وجود دارد که بیان بالای ژن *NHX1* در گونه‌های مختلف، تحمل به شوری را

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

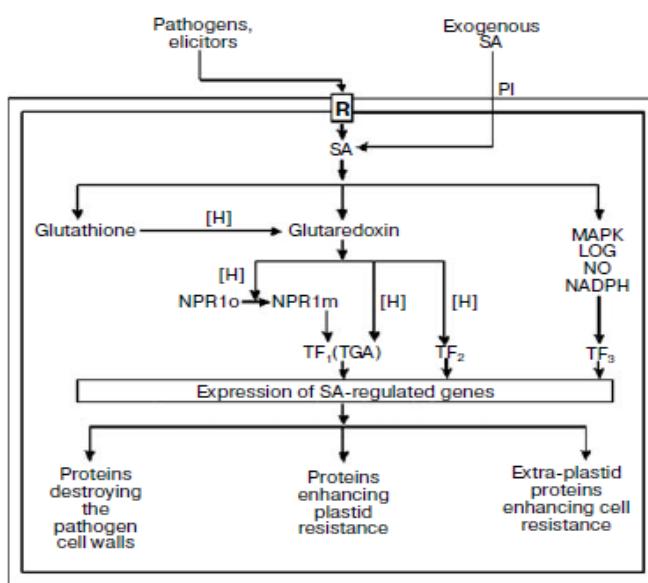
<sup>2</sup> Calcineurin B-like interacting protein kinase

برگشتی در گیاهان نقش تعیین کننده‌ای در پاسخ‌های درون سلولی حد وسطی به محرك‌های بیرونی ایفا می‌کنند. بنابراین، این گروه از کینازها در گیاهان ممکن است در مسیرهای انتقال پیام تش دخیل باشد (Singh and Gautam 2013). به عبارت دیگر، کینازها علاوه بر تنفس شوری، به تیمارهای سالیسیلیک اسید نیز واکنش نشان می‌دهند و بیان آنها، تحت تیمار سالیسیلیک اسید 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 دفع کننده‌های سدیم از جمله آنتیپورتر و اکوئلی NHX1 را تحت تاثیر قرار دهد (Jenks et al. 2007). پرایم بذرها با سالیسیلیک اسید می‌تواند با تحت تاثیر قرار دادن سطوح درون سلولی سالیسیلیک اسید و یا به طور مستقل به عنوان یک محرك بیرونی، باعث فعالیت زودهنگام پروتئین کینازها و در نتیجه آغاز سریع‌تر مسیرهای پاسخ به تنفس شوری شد، از این رو به هنگام مواجهه با تنفس، مسیرهای تدافعی را سریع‌تر فعال می‌سازد (شکل ۱۰). سالیسیلیک اسید احتمالاً با افزایش فعالیت کینازهای مانند SOS2 که در مسیر درک تنفس شوری و پاسخ به آن قرار دارد، 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 اکوئلی مانند H<sup>+</sup>-ATPase، AVP، با تامین شب پروتون، به طور غیر مستقیم بیان و فعالیت آنتیپورترهای غشایی Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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 اکوئل سلولی، بسته‌بندی می‌شود. کاربرد بیرونی سالیسیلیک اسید به منظور تطابق گیاهان با تنفس 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 دریافت کننده پیام سالیسیلیک اسید، 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 به منظور تعیین دقیق‌تر مکانیسم تاثیر

انتشار سدیم به آپوپلاست و واکوئل، فعالیت پمپ‌های تامین‌کننده Gaxiola et al. 1999; Bartels and Sunkar 2005 ارزشی برای فعالیت SOS1 و NHX1 افزایش می‌یابد (al. 1999; Bartels and Sunkar 2005). به طور کلی جابجایی و تعادل بیون‌ها در محیط‌های شور به پروتئین‌های حامل غشایی-سراسری شامل پروتئین‌های جابجاکننده پروتون (وابسته به Ca<sup>2+</sup>-ATPase و پیروفسفاتازها) وابسته است. این پروتئین‌ها، آنتیپورترها و کانال‌ها را فعال می‌کنند و در خروج بیون‌ها دخالت دارند (Sze et al. 1999)، هر دو آنتیپورتر SOS1 و NHX1 به منظور فعالیت به شب پروتون نیاز دارند که این H<sup>+</sup>-ATPase شب توسط H<sup>+</sup>-ATPase های غشای پلاسمایی یا وابسته به شیب پروتون (AVP1) ایجاد می‌شود (Mittler et al. 2004). به عبارت 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> مرتبط است، به بیان H<sup>+</sup>-PPase و V-type H<sup>+</sup>-ATPase نیز Chinnusamy et al. 2005; Plett and Moller 2010; Teakle and Tyerman 2010 مرتبط است (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 شب پروتونی لازم جهت فعالیت این آنتیپورترها باشد. سالیسیلیک اسید با روش‌های مختلفی از جمله دفع و بخش‌بندی سدیم، تعدلی اسمزی، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، تنظیم اکسیداتیو و ساخت پروتئین کینازها در اثر تنفس، موجب سازگاری به تنفس شوری می‌شود (Singh and Gautam 2013). با وجود مطالعات صورت گرفته، آن دسته از مکانیسم‌های پیام‌رسانی که باعث تغییر در پروتونم گیاه در پاسخ به سالیسیلیک اسید می‌شوند هنوز کاملاً شناخته نشده‌اند ولی اطلاعات موجود نشان می‌دهد که سالیسیلیک اسید، (SIPK) MAP kinases (Zhang and Klessig 1998a and b; Mikolajczyk et al. 2000) به طور کلی، فسفریله و دفسفریله شدن پروتئین‌ها در گیاهان نقش مهمی در پیام‌رسانی تنفس‌ها و تشخیص پاسخ‌های سازگاری به تنفس‌های 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 غشاء پلاسمایی توسط **SOS1** و بخش‌بندی 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 بروتئین کینازها، به طور همزمان مورد بررسی قرار گیرند.

## 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. Nutricia. *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, Aydin M, Genisel M, Taspinar MS, Dumlupinar 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.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.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.

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

- 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 *Avp1*, 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, uzelordu 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.
- Halter 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-Rendo'n 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, Cikihi Y, Kolsarici 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.*). *Tarim 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-Bouzid R, Jain SM, Drira N (2009) In vitro hermaphrodisim 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  $\text{Ca}^{2+}$  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)  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  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  $\text{Na}^+$  homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:9061-66.
- Rakhmankulova ZF, Fedyaev VV, Rakhmatulina SR, Ivanov CP, Gilanova 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 two 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, Gyo rgyey 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, Fatkhutdinova 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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter SOS1 controls long-distance  $\text{Na}^+$  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) Energization of plant cell membranes by  $\text{H}^+$ -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<sup>-</sup> transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment* 33:566-589.
- Tracy FE, Gillham M, Dodd AN, Webb AAR, Tester M (2008) NaCl-induced changes in cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant, Cell and Environment* 31:1063-1073.
- Vaerman JL, Saussoy P, Ingariola 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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf  $\text{Na}^+$ . *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.