

Characterization and sequence of a hydrogen/sodium anti-porter gene in the plasma membrane of the plant *Kochia scoparia*

ناهد نیکخواه^۱، لیلا فهمیده^{۲*}، زیبا فولادوند^۳

Nahid Nikkhah¹, Leila Fahmideh^{2*} and Ziba Fooladvand³

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ^۲استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی،
دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

^۳مربي پژوهشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل

1, M.Sc. 2, Assistant Professor of Department of plant Breeding and
Biotechnology, University of Zabol,
3, Assistant of Agriculture and Biotechnology Research Institute, university of
Zabol.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:
Leila.fahmideh@yahoo.com و L.fahmideh@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۸)

چکیده

یکی از راهکارهای گیاهان برای کاهش مقدار سدیم سیتوزولی، دفع سدیم به خارج سلول است. این دفع خارج سلولی، مانع از اثرهای سمی سدیم در فرآیندهای سلولی سیتوزول می‌شود. ناقل‌های سدیم/هیدروژن غشاء پلاسمایی (SOS_1) یکی از بهترین پروتئین‌های درگیر در این فرآیند هستند. در این پژوهش از گیاه دولپه و سورزی *Kochia scoparia* به عنوان منبع برای جداسازی ژن استفاده شد. بر همین اساس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در مناطق حفاظت شده در گیاهان دیگر، طول تقریبی ۳۶۰۰ نوکلوتیدی و به تعبیت از آن توالی ۱۲۰۰ اسید‌آمینه‌ای از توالی کدکننده این ژن شناسایی و تعیین توالی شد. میزان شbahat این توالی در سطح نوکلوتیدی با حداقل ۸۴ درصد همولوژی و در سطح اسید‌آمینه‌ای ۹۲ درصد با استفاده از بررسی BLAST تأیید شد. تجزیه و تحلیل‌های بعدی برای تعیین خصوصیات پروتئینی و ارتباط آن با پروتئین‌های دیگر با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک انجام شد و نتایج نشان داد که منطقه حاوی مارپیچ‌های آلفای آیگریز به عنوان قطعه گذرنده از غشاء پلاسمایی است و در مقابل آن دنباله با تعداد کمتر مارپیچ‌های آلفای و خاصیت آبدوستی به عنوان قطعه داخل سلولی پروتئین می‌باشد. این نتایج نقش دفع سدیم توسط ناقل‌های غشاء پلاسمایی را برای وجود واکنش مقاومت به شوری در گیاه کوشیا تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی

جداسازی ژن،
شوری،
کوشیا،
ناقل‌های غشاء پلاسمایی

مقدمه

می‌کند. دمین خود تنظیمی مکان هدفی برای فسفوریل‌اسیون توسط SOS2 است. پس از فسفوریل‌اسیون SOS1 دمین خود تنظیمی از مکان بالادرست رها شده و فعالیت حمل و نقل آن زیاد می‌شود (Shi *et al.*, 2000; Brett *et al.*, 2005; Quan *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2007) (Mott and Wang, 2007). بر اساس مقایسه توالی SOS₁ با پروتئین‌های دیگر و دمین‌های کروی پیش‌بینی شده سه ناحیه در این پروتئین وجود دارد. انتهای N-ترمینال که از ۴۴۰ اسید‌آmine تشکیل شده است و به صورت ۱۲ مارپیچ آلفای محافظت شده گذرنده از غشای هیدروفوب، حفره غشایی را تشکیل می‌دهد. اسید‌آmine‌های منطقه ۱۵۵-۱۹۰ که در گروه‌های مختلف شامل مارپیچ‌های آلفای ششم و هفتم است به عنوان محل اتصال برای یون سدیم می‌باشد (Guo *et al.*, 2004; Masser, 2001). دم بلند سیتوپلاسمی هیدروفیل در منطقه C-ترمینال از ۷۰۰ اسید‌آmine تشکیل شده است، که در این انتهای یک ناحیه ۳۰۰ اسید‌آmine‌ای از ۴۴۰-۷۴۰ وجود دارد که بصورت کروی شکل است و این ناحیه شباهت یا همولوژی زیادی با NHX8 نشان می‌دهد (Guo *et al.*, 2004). در ادامه از اسید‌آmine ۱۱۴۶-۷۴۰ یک توالی منحصر به فرد است و همسانی قابل توجهی به هر پروتئین دیگری به جز SOS₁ نشان نمی‌دهد. پیش‌بینی می‌شود که ناحیه ۱۱۴۶-۴۴۱ بعنوان ناحیه‌ای برای فسفوریل‌اسیون توسط SOS₂ کیناز محسوب می‌شود (Guo *et al.*, 2004). علاوه بر این SOS₁ نیز در تحمل به تنش اکسیداتیو ایفا نمی‌کند. دخالت SOS₁ در پاسخ به تنش اکسیداتیو از طریق تعامل با RCD₁، که یک پروتئین مهم برای پاسخ به گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS است، امکان پذیر است. طبق گزارشات در انتهای C-ترمینال SOS₁ دو ناحیه موجود در اسید‌آmine‌های ۸۰۶-۴۴۰ و ۱۱۰۳-۹۳۶ برای تعامل با RCD₁ مهم هستند (Katiyar *et al.*, 2006). از آنجایی که گیاهان هالوفیت قادر به رشد و تحمل شرایط شوری بالا هستند، می‌توانند به عنوان بهترین ابزار جهت درک اساس مولکولی

شوری یکی از بزرگ‌ترین محدودکننده‌های تولید محصولات کشاورزی است (Amjad *et al.*, 2008). براساس نتایج بررسی‌های به عمل آمده ۲۰ الی ۳۰ درصد زمین‌های تحت آبیاری جهان به طور نامطلوبی تحت تأثیر شوری قرار دارند (Sangam *et al.*, 2000). یک سری مطالعات پیش‌بینی این‌گونه ابتلاء را در جذب یون‌های ضروری مانند پتاسیم و کلسیم و اثرها سعی بر روی غشای سیستم‌های آنزیمی گیاهان عالی ایجاد می‌کند (Wu *et al.*, 2005; Munns, 2000). یک سری مطالعات سیستماتیک برای ژن‌های مقاوم به شوری، ناشی از غربالگری ژنتیکی در مؤسسه ژئو انجام شد (Liu and Zhu, 1997; Zhu *et al.*, 1998). پژوهش‌ها نشان داد، بعد از شبیه‌سازی توالی بر اساس نقشه و همچنین تجزیه و تحلیل عملکردها، در میان پنج پروتئین SOS₃, SOS₂, SOS₁ در مسیر سیگنالی کاهش میزان ورود سدیم که از راهکارهای حفظ پتاسیم نسبت به سدیم در گیاهان تحت تنش شوری است، دخالت دارند (Zhu, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2005). در مسیر SOS₃ پروتئین متصل‌شونده به کلسیم یا SOS₂ در این ژن‌ها نشان شوری را دریافت و منتقل می‌نماید. SOS₃ پروتئین SOS₂ را فعال کرده و به سمت غشای پلاسمایی هدایت می‌کند تا فسفوریل‌اسیون ترانسپورتر سدیمی SOS₁ توسط کمپلکس SOS₂/SOS₃ فراهم شود (Qiu *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 1998). از ۱۲۷ پروتئین‌های بزرگ غشای سلولی با وزنی به اندازه‌ی ۱ کیلو دالتون است که در آرابیدوپسیس گزارش شده است (Wu *et al.*, 1996). در انتهای C-ترمینال، SOS₁ در ناحیه ۸۴۹-۷۴۶ یک نوکلئوتید حلقوی و در ناحیه ۱۱۴۶-۹۹۸ یک دمین خود تنظیم‌کننده وجود دارد. در حالت استراحت دمین خود تنظیمی با توالی بالادرست که شامل محل اتصال نوکلئوتید حلقوی است تعامل برقرار

انجام ضد عفونی سطحی، بذرها در ماسه شسته کشت شدند. ۴۵ روز پس از کشت به منظور افزایش سطح ترانسکریپتوم پاسخ دهنده به شوری در گیاه، تیمار شوری ۴۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم اعمال شد و سپس گیاهان تیمار شده جهت استخراج RNA برداشت شدند. طراحی آغازگرها: توالی‌های ژن SOS در سایر گیاهان در پایگاه داده‌های بین المللی NCBI جمع‌آوری شد. توالی آغازگرها، با استفاده از بسته‌های نرم افزاری STAR (EditSeq, Meg- Align, MapDraw; Version GENE DOC (Multiple Sequence Alignment 5.00) و 5.000) Editor & Shading Utility Version 2.5.000) شدند (جدول ۱)، محل طراحی این آغازگرها به صورتی در نظر گرفته شده است که ژن مورد نظر به صورت دو قطعه جدا از هم و دارای مناطق همپوشان جداسازی شود. استخراج RNA، ساخت cDNA و تکثیر ژن SOS1: طبق دستورالعمل کیت شرکت دنازیست آسیا انجام شد. ابتدا صد میلی‌گرم بافت گیاه در یک هاون چینی در داخل ازت مایع به خوبی خرد و با یک میلی‌لیتر بافر G1 یا بافر اسیدی (حاوی گوانیدین تیوسیانات، سدیم استات)، به خوبی مخلوط شد. میزان ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میلی‌لیتر بافر G1 حاوی بافت اضافه و بعد از مخلوط شدن در دمای آزمایشگاه به مدت ۳ دقیقه انکوئیه شد. بعد از سانتریفوژ، فاز بالایی که حاوی RNA بود به لوله اپندورف جدیدی منتقل شد. ایزوپروپانول سرد به بافر G2 (کلرید لیتیم و اتانول ۹۶٪ است)، اضافه شد و بعد از مخلوط کردن و انکوباسیون در دمای اتاق، سانتریفوژ به منظور رسوب RNA در ته لوله انجام شد. بعد از شستشوی رسوب مورد نظر با اتانول ۷۵ درصد، و خشک شدن آن به میزان ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب فاقد RNase اضافه شد. جهت تعیین کیفیت و کمیت RNA از روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفوتومتر استفاده شد. در مرحله بعد سنتز cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت Gene All، جدول (۲) و آغازگرها برگشته مربوط به هرقطعه انجام شد.

آنچه پورترها به شمار آمده و نقش احتمالی آنها را در مقاومت به شوری آشکار سازند (Chinnusamy *et al.*, 2005). کوشیا (Kochia scoparia L. Schard) گیاهی دو لپه، علفی و با متابولیسم C₄ از گیاهان خانواده چغندریان (Fischer *et al.*, 2000) و گونه‌ای بسیار متحمل به شوری (Lamsal *et al.*, 1999; Madrid *et al.*, 1996) هالوفیت‌های دفع‌کننده نمک است که در برخی طبقه-بندی‌ها جزء هالوفیت‌های اختیاری قلمداد شده و منبع خوبی از علوفه را در شرایط آبیاری با آب شور فراهم می‌کند (Sherrod, *et al.*, 1971). قابل ذکر است که این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی در مجتمع بین المللی از جمله در کشور کره جنوبی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعات از میوه‌های این گیاه در فرآیندهای مربوط به سیستم ایمنی و تأثیرگذاری آن از طریق غیر فعال‌سازی فاکتور رونویسی NF_KB استفاده شده است (Kafi, *et al.*, 2010; Soleimani *et al.*, 2008) راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی در تأمین هدف مبتنی بر ایجاد مقاومت در گیاهان مهم نیازمند انجام پژوهش‌ها گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تشکیل باشد. بنابراین گیاهان شورزیست می‌توانند به عنوان مدل‌های طبیعی بخش اصلاح مولکولی در سایر گیاهان استراتژیک باشند. لذا گیاه کوشیا می‌تواند به عنوان یکی از منابع جدید برای زن‌های مقاومت به شوری مطرح شود تا بتوان با بدست آوردن توالی ژن‌های آنتی‌پورتر غشای پلاسمایی موجود در این گیاه، راه را برای استفاده هر چه بیشتر از توانایی این گیاه فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی: بذرهای گیاه Kochia scoparia از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و به گلخانه پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل، منتقل و پس از

جدول ۱- اسامی ، توالی آغازگرهای طراحی شده برای جداسازی ژن SOS1 از *K.scoparia*

Table1- Name and sequences of primer designed for SOS1 gene isolation from *K.scoparia* .

Name primer	Sequences primer
P.SOS.S.FWD1	5'-ATGGCAGCATCTCGAA-3'
P.SOS.S.REV1	5'-AGAAAACAAACAATGTT-3
P.SOS.S.FWD2	5-ACTGGAACACTGTTT-3
P.SOS.S.REV2	5-CCGTTTGATATAAGCCA-3
P.SOS.S.FWD3	5-CAAATGGGATCTGGCT-3
P.SOS.S.REV3	5-GAGATTACTGGTGAATC-3

جدول ۲- مخلوط اجزای واکنش جهت سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای برگشته طراحی شده.

Table 2: Reagents and volume for cDNA synthesis using by reverse primer designed.

اجزاء واکنش Reagents	حجم مواد Volume
Total RNA (۱۰۰ نانوگرم)	۳ میکرولیتر
Specific Primer (۰.۱ میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
dNTP (۰.۱ میلیمولار)	۰/۵ میکرولیتر
10X RTase reaction buffer	۱ میکرولیتر
DTT (۰.۱ میلیمولار)	۱ میکرولیتر
HYPER Script TM Reverse Trans criptase 200u/ µl	۰/۵ میکرولیتر
Zym ALL™ RNase inhibitor	۰/۵ میکرولیتر
Nuclease free water	۳ میکرولیتر

جدول ۳- اجزای واکنش PCR برای تکثیر قطعات ژن SOS1 در گیاه *K.scoparia*

Table3: Reagents PCR for amplification of SOS1 gene in *K.scoparia*.

اجزاء واکنش Reagents	حجم مواد Volume
Forward primer	۰/۵ میکرولیتر
Revers primer	۰/۵ میکرولیتر
cDNA Template	۱ میکرولیتر
(Red BioRun) Master Mix	۱۲/۵ میکرو لیتر
Nuclease free water	تاخجم ۲۵ میکرولیتر

نتایج و بحث

اهداف ایجاد مقاومت در گیاهان مهم نیازمند انجام پژوهش‌ها گستردۀ در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تنش می‌باشد. یکی از این نمونه‌های بارز گیاهان شورزیست هستند که می‌توانند به عنوان مدل‌های طبیعی مقاومت به شوری مورد مطالعه قرار بگیرند، از آنجایی که یکی از عوامل مقاومت به شوری در گیاهان شورزیست مکانیسم‌هایی است که در آن، سدیم اضافی به خارج از سلول رانده می‌شود و عامل موثر در این روند آنتیپورترهای غشای پلاسمایی است، لذا با شناسایی این ژن در این گیاه و توالی یابی آن می‌توان در جهت بهره برداری هرچه بیشتر از آن در مسیرهای مقاومت به شوری استفاده کرد.

واکنش تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از آغازگرهای دژنه و نمونه cDNA برگ به عنوان الگو منجر به تکثیر قطعه‌های با اندازه‌های مورد انتظار شد (شکل ۱). قطعه DNA بدست آمده پس از استخراج از روی ژل، تعیین توالی شد. تجزیه و تحلیل هم BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) ردیفی با استفاده از امکانات برنامه Alignment Search Tools موجود در پایگاه داده‌ای NCBI در سطح نوکلئوتیدی انجام شد (جدول ۲) این نتایج نشان می‌دهد، ژن مورد بررسی، همولوژی بالایی در سطح DNA و اسید آمینه با ژن‌های همتای خود در گونه‌های گیاهی دیگر دارد. بر این اساس در سطح نوکلئوتیدی دارای حداقل ۸۴ درصد همولوژی با گونه‌های مورد نظر است و در سطح پروتئینی دارای حداقل ۹۲ درصد تشابه با گونه‌های مورد نظر است (نتایج نشان داده نشده است).

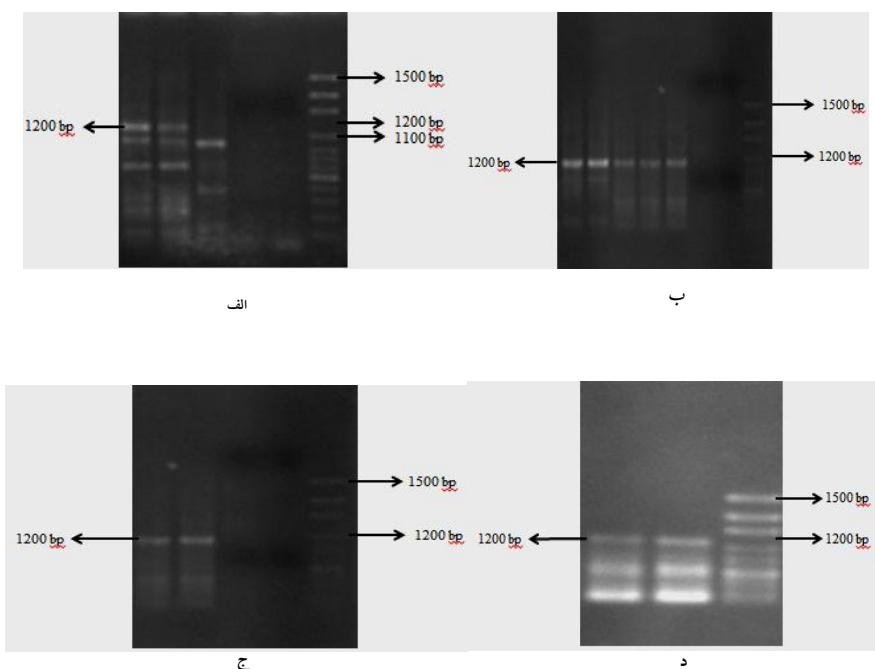
به منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی و تکاملی، تجزیه و تحلیل کلستر توالی آمینواسیدی (شکل ۲)، با سایر گونه‌ها انجام شد. بر این اساس مشخص شد، ژن مورد بررسی ارتباط نزدیکی با ژن‌های همتای خود در گونه‌های دولیه و موجود در خانواده Chenopodiaceae دارد و از گونه‌های حساس به شوری جدا می‌باشد.

cDNA ستر شده، به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جهت ستر DNA دو رشته‌ای و تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای مورد نظر برای هر رشته در نظر گرفته شد، جدول (۳). شرایط این تکثیر شامل: واسرشت اولیه ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه به صورت واسرشت سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای اتصال (مناسب برای جفت آغازگر مورد نظر) و طویل سازی ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه و در نهایت طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. قطعات بدست آمده با طول مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA از روی ژل شرکت دنا زیست جداسازی و تعیین توالی به روش تمام اتوماتیک فلورسانس و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد.

تجزیه و تحلیل‌های In silico: بعد از اعلام توالی، سرهم بندی قطعات مورد نظر با استفاده از نقاط همپوشان و توسط نرم افزار SEQman موجود در بسته نرم افزاری DNA STAR انجام شد. این توالی‌ها با شماره‌های مربوط در پایگاه NCBI ثبت شده‌اند و در زمان مقرر قابل دسترسی می‌باشند.

تجزیه و تحلیل‌های بیانفورماتیکی درخت فیلوژنتیکی به روش ClustalW، توسط نرم افزار meg align موجود در بسته نرم افزاری DNA STAR انجام شد. تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه به روش SOPMA و برای ساختار سوم به روش SWISS model به صورت آنلاین توسط سرور <http://www.expasy.org> صورت پذیرفت.

بررسی نمودار راماچاندران مرتبط با توالی اسیدآمینه‌ی ژن K.S.SOS با استفاده از سرویس آنلاین با آدرس <http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/DIHED2> صورت گفت. ساختار هیدروپاتی، جهت سنجش میزان هیدروفیل و هیدروفوب بودن قسمت‌های مختلف ساختار پروتئین پیش‌بینی شده برای ژن K.S.SOS با استفاده از Pepwindow موجود در سرور <http://www.ebi.ac.uk> به دست آمد. پیش‌بینی شبکه پروتئینی نیز با استفاده از مدل‌سازی در گیاه آراییدوپسیس تالیانا با آدرس اینترنتی <http://www.stringdb.org> انجام شد.



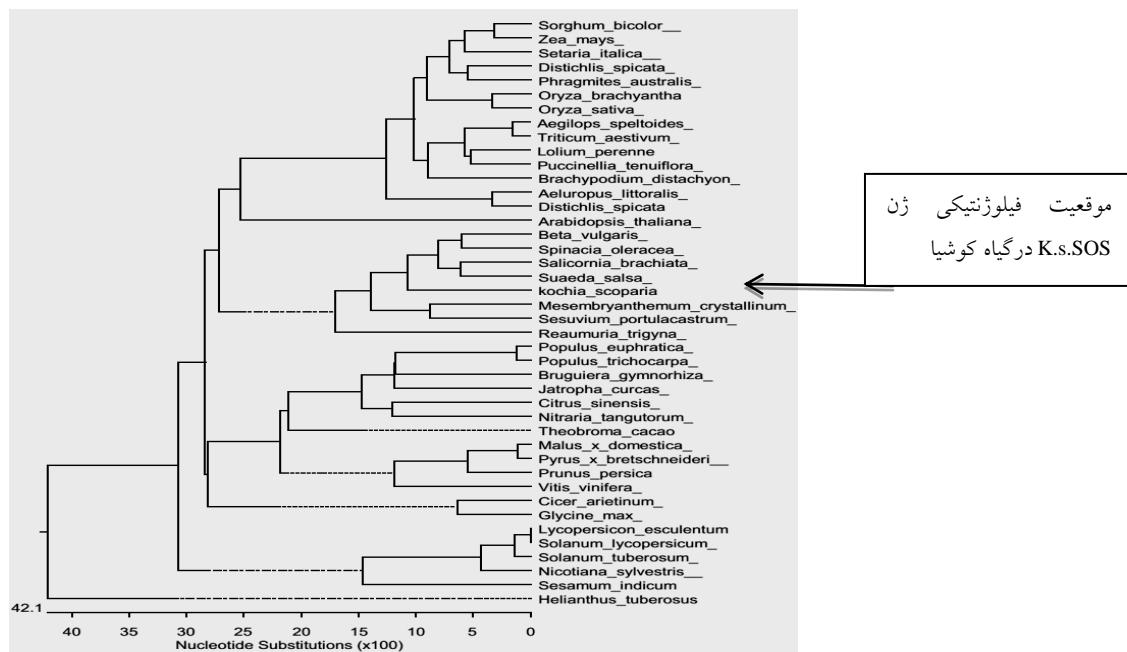
شکل ۱- تکثیر cDNA با طول مورد انتظار ۱۲۰۰ bp، مربوط به ناحیه کد کننده آنتی پورتر غشاء پلاسمایی با استفاده از آغازگرهای ویژه و نمونه برگ در گیاه *K. scoparia*، نشانگر مولکولی مورد استفاده، شرکت BIORON DNA Ladder 100bp است. a: ترکیب آغازگر P.SOS.S.REV1/ P.SOS.S.FWD1 ب: ترکیب آغازگر P.SOS.S.FWD4/P.SOS.S.REV4 c: ترکیب آغازگر P.SOS.S.FWD3/P.SOS.S.REV3 d: ترکیب آغازگر P.SOS.S.FWD2/P.SOS.S.REV2

Figure1- cDNA amplification with expected length 1200bp, for coding sequences of plasma membrane antiporter with specific primer and leaf tissue from *K. scoparia*.DNA ladder100bp BIORON Company. a: P.SOS.S.FWD1/P.SOS.S.REV1, b: P.SOS.S.FWD2/P.SOS.S.REV2, c: P.SOS.S.FWD3/P.SOS.S.REV3,d: P.SOS.S.FWD4/P.SOS.S.REV4.

جدول ۴- نتایج تجزیه و تحلیل هم ردیفی ژن SOS1 جداسازی شده از *K. scoparia* با استفاده از برنامه BLAST

Table 4- Results alignment using by BLAST program for SOS1 gene isolated from *K.scoparia*.

Number	Plants sp.	Identity
۱	<i>Salicornia dolichostachya</i>	%۸۴
۲	<i>Salicornia brachiata</i>	%۸۴
۳	<i>Suaeda japonica</i>	%۸۳
۴	<i>Suaeda salsa</i>	%۸۲
۵	<i>Beta vulgaris</i>	%۸۰
۶	<i>Spinacia oleraceae</i>	%۸۱
۷	<i>Sesuvium portulacastrum</i>	%۷۹
۸	<i>Mesembryanthemum</i>	%۷۷
۹	<i>Vitis vinifera</i>	%۷۷
۱۰	<i>Populus trichocarpa</i>	%۷۶
۱۱	<i>Populus eupharatica</i>	%۷۶

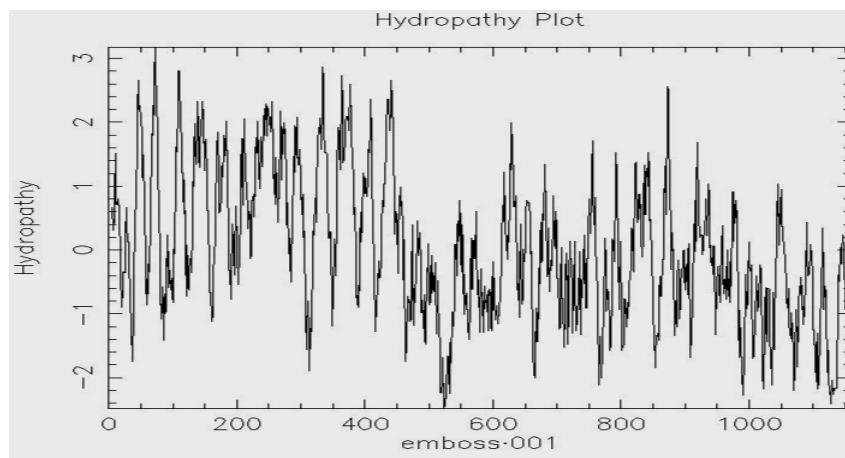


شکل ۲- درخت فیلوزنیکی ترسیم شده توالی پروتئینی ژن آنتیپورتر غشای پلاسمایی (SOS1) جداسازی شده از *K.scoparia* با گونه‌های گیاهی مختلف با استفاده از نرم افزار Meg Align به روش Cluster W. پارامتر تکرار در ترسیم درخت معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شد.

Figure 2- Phylogenetic tree based on amino acid sequences of plasma membrane antiporter (SOS1) isolated from *K.scoparia* used of me align (Cluster W). nucleotide sub situation*100.

پروتئین ۱۲ مارپیچ آلفا وجود دارد که در ناحیه مارپیچ‌های ششم و هفتم به سدیم باند می‌شود. و در انتهای C- ترمینال نواحی فسفویرلایسیون توسط SOS₂ و تعامل با RCD₁ وجود دارد. مدل‌سازی شبکه پروتئینی برای ژن شناسایی شده با استفاده از گیاه آراییدوپسیس تالیانا انجام شد، شکل (۴) برای این شبکه پروتئینی پیشنهاد شد. در این شبکه پروتئینی چندین گروه پروتئینی مهم به چشم می‌خورد، اولین گروه از این پروتئین که در مجاورت پروتئین مورد نظر ما هستند، (K⁺ efflux antiporter) (KEA) هستند که در بیرون راندن K⁺ نقش ایفا می‌کنند، این همکاری به این دلیل وجود دارد که در سلول‌ها همواره تنظیم میزان سدیم درون سلول همراه با تنظیم میزان پتانسیم درون سلولی است (Chanroj *et al.*, 2012). گروه دوم پروتئینی موجود در این شبکه پروتئینی گروه (CAX) (Cation /proton exchanger) هستند، که در روندهای مربوط به انتقال کاتیون/پروتون نقش دارند، چون تنظیم تعادل سدیم سلولی به همراه تنظیم تعادل سایر کاتیون‌ها به عنوان یک تعادل پایدار عمل خواهد کرد (Shigaki *et al.*, 2006

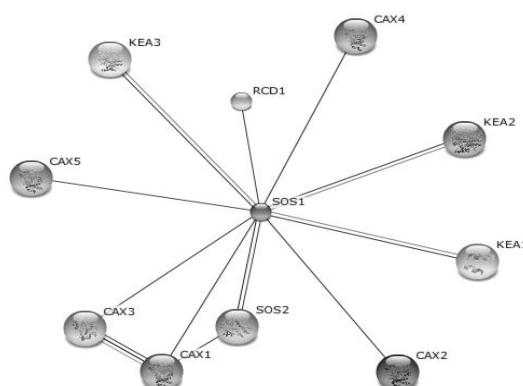
با بررسی نمودار راماچاندران برای توالی پروتئینی مورد بررسی آشکار شد که بیشتر زوایای پیوندی در ربع پایین سمت چپ و ربع بالا سمت چپ دیده شده است که به ترتیب مربوط به ساختارهای مارپیچ آلفا و صفحات بتا می‌باشد. که با توجه به ساختارهای دوم پیش‌بینی شده این زوایا تایید شده‌اند. با بررسی ساختار ثانویه در توالی آمینواسیدی مشخص شد که در پلی‌پیتید مورد بررسی، ۴۳ درصد مارپیچ آلفا، ۲۹ درصد ساختار پیچ کوچک و ۱۷ درصد ساختار صفحات بتا و ۸ درصد پیچ بتا در کل پلی‌پیتید مورد نظر وجود دارد. از طرفی برای تعیین نواحی گذرنده از غشا که به صورت مارپیچ‌های آلفا در پروتئین‌های مشابه به این پروتئین هستند، تجزیه و تحلیل هیدروپاتی انجام شد و در شکل (۳) به نمایش در آمد. در این شکل همان‌طور که مشاهده می‌شود، نواحی گذرنده از غشا بصورت نواحی مارپیچی و با هیدروفوبیسیتی بالاتر دیده می‌شوند و دم C- ترمینال که دارای هیدروفوبیسیتی پایین‌تری است و دارای چندین مارپیچ کوچک هستند، میزان هیدروفوبیسیتی آنها پایین‌تر از مارپیچ‌های موجود در غشای پلاسمایی است. در انتهای N- ترمینال این



شکل ۳- نمودار هیدرопاتی پروتئین پیشگویی شده مربوط به ژن K.S.SOS1 جداسازی شده از *K. scopari*
Figure3- Hydropathy plot of predicted plasma membrane antiporter protein in *K. Scoparia*

دارند، چون تنظیم تعادل سدیم سلولی به همراه تنظیم تعادل سایر کاتیون‌ها به عنوان یک تعادل پایدار عمل خواهد کرد (Shigaki *et al.*, 2006). پروتئین مهم دیگر در این شبکه پروتئینی ارائه شده، SOS₂ (Salt overly sensitive) می‌باشد که دومین پروتئین در آبشار SOS برای تنظیم انتقال سدیم در غشاء سلولی است و به عنوان یک پروتئین کینازی برای تغییر فسفریلاسیون پروتئین SOS₁ در سلول مطرح است (Jiping *et al.*, 2000)، دخالت SOS₁ در پاسخ به تنش اکسیداتیو از طریق تعامل با RCD₁، که یک پروتئین مهم برای پاسخ به گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS است امکان‌پذیر است.

مدل‌سازی شبکه پروتئینی برای ژن شناسایی شده با استفاده از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا انجام شد، شکل (۴) برای این شبکه پروتئینی پیشنهاد شد. در این شبکه پروتئینی چندین گروه پروتئینی مهم به چشم می‌خورد، اولین گروه از این پروتئین که در مجاورت پروتئین مورد نظر ما هستند، (K⁺ efflux antiporter) KEA (KEA) هستند که در بیرون راندن K⁺ نقش ایفا می‌کنند، این همکاری به این دلیل وجود دارد که در سلول‌ها همواره تنظیم میزان سدیم درون سلول همراه با تنظیم میزان پتانسیم درون سلولی است (Chanroj *et al.*, 2012). گروه دوم پروتئینی موجود در این شبکه پروتئینی گروه CAX (Cation /proton exchanger) (CAX) هستند، که در روندهای مربوط به انتقال کاتیون/پروتون نقش



شکل ۴- شبکه پروتئینی پیشنهاد شده برای ژن K.S.SOS جداسازی شده از *K. scoparia* با استفاده از مدل‌سازی در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا.
Figure4- Protein network proposed for K.S.SOS gene isolated from *K. scoparia* using by modeling in *Arabidopsis thaliana*

نیازمند انجام پژوهش‌ها گستردۀ در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تنفس می‌باشد. با توجه به این که تحمل گیاهان شورزی نسبت به تنفس شوری از گلیکوفیت‌ها و گیاهان خویشاوند زراعی بیشتر است، این گیاهان می‌توانند به عنوان منابع طبیعی به نژادی مولکولی جهت انتقال ژن‌های تحمل به شوری به گیاهان زراعی به کار روند.

طبق گزارشات در انتهای C-ترمینال SOS_1 دو ناحیه موجود در اسیدآمینه‌های ۹۳۶-۱۱۰۳ و ۴۴۰-۸۰۶ برای تعامل با پروتئین RCD_1 مهم هستند، که در این شبکه پروتئینی به نمایش در آمدند (Hiltzsch et al., 2014).

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش لازم به ذکر است، که کاربرد بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان زراعی نیاز به منابع پایه ژنتیکی برای تحمل به شوری و پایداری عملکرد دارد. بنابراین اجرای راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی در تأمین این هدف

منابع

- Amjad H, Shazia N, Tahira I, Hina S, Ahsanul M. 2008.** Effect of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Journal Of Botany Pakستان* 40(3): 1043-105.
- Brett CL, Donowitz M, Rao R. 2005.** Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal Physiology Cell*, 288, C223–C239.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK. 2005.** Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sciences* 45: 437-448.
- Chanroj S, Wang G, Venema K, Zhang MW, Delwiche CF, Sze H. 2012.** Conserved and diversified gene families of monovalent cation/h⁺ antiporters from algae to flowering plants. *Frontiers Plant Science*.14; 3:25.
- Fischer AJ, Messersmith CG, Nalewaja JD, Duysen ME. 2000.** Interference between spring cereals and *Kochia scoparia* related to environment and photosynthetic pathway. *Agronomy Journal* 92: 137-181.
- Guo Y, Qiu QS, Quintero FJ, Pardo JM, Ohta M, Zhang C, Schumaker KS, Zhu JK. 2004.** Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16:435–449.
- Hiltzsch H, Rudnik R, Shaikhali J, Heiber I, Mellenthin M, Meirelles Duarte I, Schuster G, Kahmann U, Baier M. 2014.** The radical induced cell death protein 1 (RCD_1) supports transcriptional activation of genes for chloroplast antioxidant enzymes. *Frontiers Plant Science* 23; 5:475.
- JK Z . 2001.** Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion Plant Biology* 4:401–406.
- Jiping Liu, Manabu Ishitani, Ursula Halfter, Cheol-Soo Kim, and Jian-Kang Zhu. 2000.** The *Arabidopsis thaliana* SOS_2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *PNAS*, 97 (7):3730–3734.
- Kafi M, Asadi H, Ganjeali A. 2010.** Possible utilization of high salinity waters and application of low amounts of water for production of the halophyte *Kochia scoparia* as alternative fodder in saline agro ecosystems. *Agriculture Water Manage* 97: 139-147.
- Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Kim K, Agarwal M, Fu X, Huang A, Zhu JK. 2006.** The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS_1 interacts with RCD_1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18816–18821.
- Lamsal K, GN Paudyal, Saeed M. 1999.** Model for assessing impact of salinity on soil water availability and crop yield. *Agriculture Water Manager* 41:57-70.
- Liu J, Zhu JK. 1997.** Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 114:591–596.
- Madrid J, Hernandez F, Pulgar MA, Cid JM. 1996.** Nutritive value of *Kochia scoparia* L. and ammoniated barley straw for goats. *Small Ruminant Research* 19: 213-218 .
- Mott IW, Wang RRC. 2007.** Comparative transcriptome analysis of salt tolerant wheat germplasm lines using wheat genome arrays. *Plant Science*, 173: 327-339.
- Munns R . 2000.** Comparative physiology of salt and water stress: *Plant Cell Environment*, 25: 239-250.
- Qiu Q S, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK. 2002.** Regulationof SOS_1 ,aplasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS_2 and SOS_3 . *Proceedings National Academy Science USA*, 99: 8436–8441.
- Quan R, Lin H, Mendoza I, Zhang Y, Cao W, Yang Y. 2007.** SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS_2 to protect

- Arabidopsis shoots from salt stress. *Plant Cell*, 19: 1415–1431.
- Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu JK, Pardo JM. 2002.** Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings National Academy Science USA*, 99:9061–9066.
- Sangam S, Jayasree D, Janardhan K. 2005.** Salt tolerance in plant transgenic approaches: *Plant Biotechnology*, 7:1-15.
- Sherrod L B. 1971.** Nutritive value of Kochia scoparia. I. yield and chemical composition at three stages of maturity. *Agronomy Journal* 63: 343-344.
- Shigaki T, Rees I, Nakhleh L, Hirschi KD. 2006.** Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters. *Journal Molecular Evolution* 63(6):815-25.
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK. 2000.** The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS₁ encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings National Academy Science USA*, 97: 6896–6901.
- Soleimani MR, Kafi M, Ziae M, Shabahang J. 2008.** Effect of limited irrigation with saline water on forage of two local populations of *Kochia scoparia* L. Schrad. *Journal Agriculture Science Technol* 22: 307-317.
- Wu SJ, Lei D, Zhu JK. 1996.** SOS₁, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8:617–627.
- Zhu JK, Liu J, Xiong L. 1998.** Genetic analysis of salt tolerance in Arabidopsis. evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10:1181–1191.
- Zhu J. 2003.** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion Plant Biology*, 6:441-445.