

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

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

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ^۲ استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

^۳ مربی 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 غشای پلاسمایی (SOS_1) یکی از بهترین پروتئین‌های درگیر در این فرآیند هستند. در این پژوهش از گیاه دولپه و شورزی *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 نوکلئوتیدی و به تبعیت از آن توالی ۱۲۰۰ اسید آمینه‌ای از توالی کدکننده این ژن شناسایی و تعیین توالی شد. میزان شباهت این توالی در سطح نوکلئوتیدی با حداکثر ۸۴ درصد همولوژی و در سطح اسید آمینه‌ای 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 آبگریز به عنوان قطعه گذرنده از غشای 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 غشای پلاسمایی را برای وجود واکنش مقاومت به شوری در گیاه کوشیا تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی

جداسازی ژن،
شوری،
کوشیا،
ناقل‌های غشای پلاسمایی

مقدمه

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 (Mott and Wang, 2007). شوری زیاد صدمات جبران ناپذیر فیزیولوژیکی از جمله کاهش پتانسیل اسمزی، کاهش گسترش برگ، کاهش فتوسنتز، بسته‌شدن روزنه‌ها، اختلال در جذب یون‌های ضروری مانند پتاسیم و کلسیم و اثرها سمی بر روی غشاها و سیستم‌های آنزیمی گیاهان عالی ایجاد می‌کند (Sangam *et al.*, 2005; Munns, 2000). یک سری مطالعات سیستماتیک برای ژن‌های مقاوم به شوری، ناشی از غربالگری ژنتیکی در مؤسسه ژئو انجام شد (Wu *et al.*, 1996; 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 SOS، ژن‌های SOS₁، SOS₂، SOS₃ 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 SOS، پروتئین متصل‌شونده به کلسیم یا SOS₃، سیگنال تنش شوری را دریافت و منتقل می‌نماید. SOS₃ پروتئین SOS₂ را فعال کرده و به سمت غشای پلاسمایی هدایت می‌کند تا فسفریلاسیون ترانسپورتر سدیمی SOS₁ توسط کمپلکس SOS₂/SOS₃ فراهم شود (Qiu *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 1998). SOS₁، از پروتئین‌های بزرگ غشای سلولی با وزنی به اندازه‌ی ۱۲۷ کیلو دالتون است که در آرآبیدوپسیس 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 بالادست که شامل محل اتصال نوکلئوتید حلقوی است تعامل برقرار

می‌کند. دمین خود تنظیمی مکان هدفی برای فسفریلاسیون توسط SOS₂ است. پس از فسفریلاسیون SOS₁ دمین خود تنظیمی از مکان بالادست رها شده و فعالیت حمل و نقل آن زیاد می‌شود (Shi *et al.*, 2000; Brett *et al.*, 2005; Quan *et al.*, 2007; Quintero *et al.*, 2002). 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 اسیدآمینه تشکیل شده است و به صورت ۱۲ مارپیچ آلفای محافظت شده گذرنده از غشای هیدروفوب، حفره غشایی را تشکیل می‌دهد. اسید- آمینه‌های منطقه ۱۹۰-۱۵۵ 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 اسیدآمینه تشکیل شده است، که در این انتها یک ناحیه ۳۰۰ اسیدآمینه‌ای از ۷۴۰-۴۴۰ 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 اسیدآمینه 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 فسفریلاسیون توسط SOS₂ کیناز محسوب می‌شود (Guo *et al.*, 2004). علاوه بر این SOS₁ نیز در تحمل به تنش اکسیداتیو ایفای نقش می‌کند. 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 اسیدآمینه‌های ۸۰۶-۴۴۰ و ۱۱۰۳-۹۳۶ برای تعامل با RCD₁ مهم هستند (Katiyar- Agarwal *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

آنتی 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 C_4 از گیاهان خانواده چغندریان (Fischer et al., 2000) و گونه‌ای بسیار متحمل به شوری (Lamsal et al., 1999; Madrid et al., 1996) و از هالوفیت‌های دفع‌کننده نمک است که در برخی طبقه‌بندی‌ها 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 مجامع بین‌المللی 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 (Soleimani et al., 2008; Kafi, et al., 2010). اجرای 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 تنش می‌باشد. 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 ژن‌های مقاومت به شوری مطرح شود تا بتوان با بدست آوردن توالی ژن‌های آنتی پورتر 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: بذره‌های گیاه *Kochia scoparia* از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و به گلخانه پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل، منتقل و پس از

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 بین‌المللی NCBI جمع‌آوری شد. توالی آغازگرها، با استفاده از بسته‌های نرم افزاری STAR (EditSeq, Meg- Align, MapDraw; Version 5.00) و GENE DOC (Multiple Sequence Alignment و Editor & Shading Utility Version 2.5.000) طراحی 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 SOS^۱: K.S. طبق دستورالعمل کیت شرکت دنایزست آسیا انجام شد. ابتدا صد میلی گرم بافت گیاه در یک هاون چینی در داخل ازت مایع به خوبی خرد و با یک میلی لیتر بافر G1 یا بافر اسیدی (حاوی گوانیدین تیوسیانات، سدیم استات)، به خوبی مخلوط شد. میزان ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میلی لیتر بافر G1 حاوی بافت اضافه و بعد از مخلوط شدن در دمای آزمایشگاه به مدت ۳ دقیقه انکوبه 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 اسپکتروفتومتر استفاده شد. در مرحله بعد سنتز cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت Gene All، جدول (۲) و آغازگرهای برگشتی مربوط به هر قطعه انجام شد.

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'-AGAAAAACAAACAATGTT-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-GAGATTACTTGGTGAATC-3

جدول ۲- مخلوط اجزای واکنش جهت سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای برگشتی 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 (۱۰ میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
dNTP (۱۰ میلی مولار)	۰/۵ میکرولیتر
10X RTase reaction buffer	۱ میکرولیتر
DTT (۰/۱ میلی مولار)	۱ میکرولیتر
HYPER Script TM Reverse Trans criptase 200u/ µl	۰/۵ میکرولیتر
Zym ALL TM 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	تا حجم ۲۵ میکرولیتر

نتایج و بحث

اهداف ایجاد مقاومت در گیاهان مهم نیازمند انجام پژوهش‌ها گسترده 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 مؤثر در این روند آنتی‌پورترهای غشای پلاسمایی است، لذا با شناسایی این ژن در این گیاه و توالی‌یابی آن می‌توان در جهت بهره‌برداری هرچه بیشتر از آن در مسیرهای مقاومت به شوری استفاده کرد.

واکنش تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از آغازگرهای دژنره 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 هم‌ردیفی با استفاده از امکانات برنامه BLAST (Basic Local 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 حداکثر ۸۴ درصد همولوژی با گونه‌های مورد نظر است و در سطح پروتئینی دارای حداکثر ۹۲ درصد تشابه با گونه‌های مورد نظر است (نتایج نشان داده نشده است).

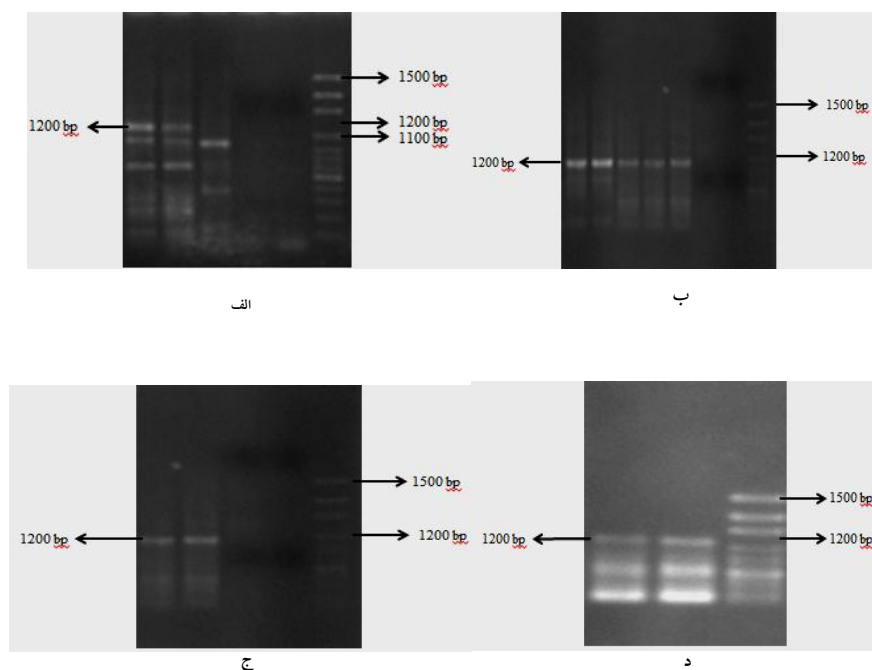
به منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی و تکاملی، تجزیه و تحلیل کلاستر توالی آمینواسیدی (شکل ۲)، با سایر گونه‌ها انجام شد. بر این اساس مشخص شد، ژن مورد بررسی ارتباط نزدیکی با ژن‌های همتای خود در گونه‌های دولپه و موجود در خانواده Chenopodiaceae دارد و از گونه‌های حساس به شوری جدا می‌باشد.

cDNA سنتز شده، به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، جهت سنتز 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 بیوانفورماتیکی 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 رامچاندوران مرتبط با توالی اسیدآمینه‌ی ژن K.S.SOS با استفاده از سرویس آنلاین با آدرس <http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/DIHED2> صورت گرفت. 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 آرکیدوپسیس تالیانا با آدرس اینترنتی <http://www.stringdb.org> انجام شد.



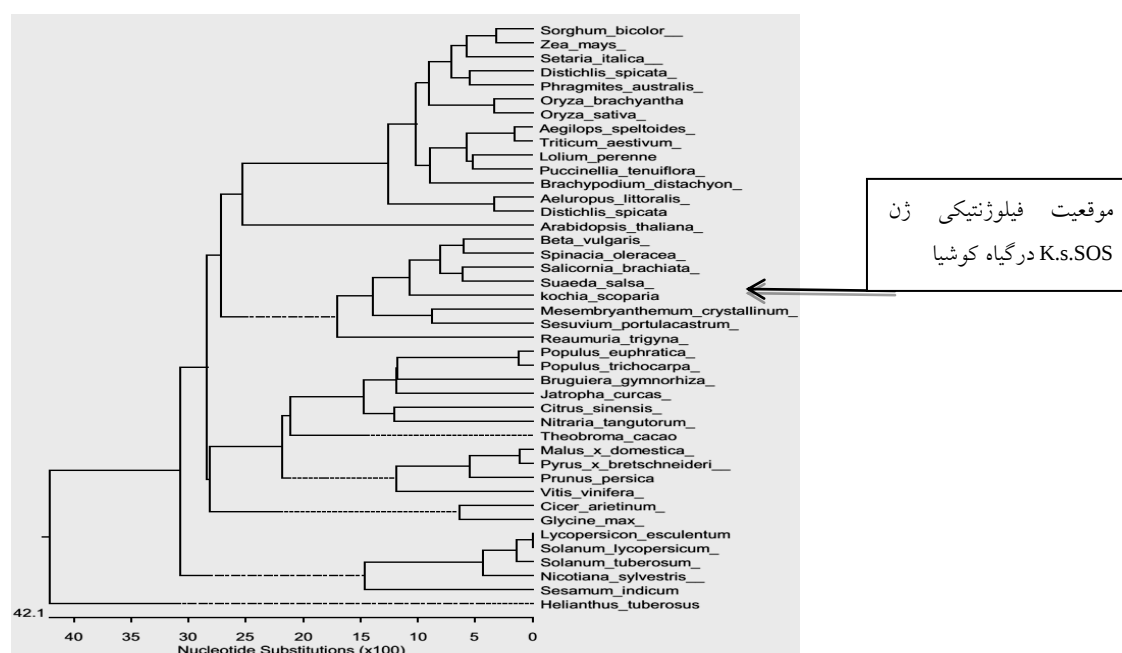
شکل ۱- تکثیر cDNA با طول مورد انتظار ۱۲۰۰ bp، مربوط به ناحیه کد کننده آنتی پورتر غشای پلاسمایی با استفاده از آغازگرهای ویژه و نمونه برگ در گیاه *K. scoparia*. نشانگر مولکولی مورد استفاده، DNA Ladder 100bp شرکت BIORON است. الف: ترکیب آغازگر P.SOS.S.FWD1/ P.SOS.S.REV1/ ب: ترکیب آغازگر P.SOS.S.FWD2/ P.SOS.S.REV2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

Figure1- cDNA amplification with expected length 1200bp, for coding sequences of plasma membrane antiporter with specific primer and leaf tissue from *K. scoparia*. DNA ladder 100bp 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>Spinica oleraceae</i>	%۸۱
۷	<i>Sesuvium portulacastum</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

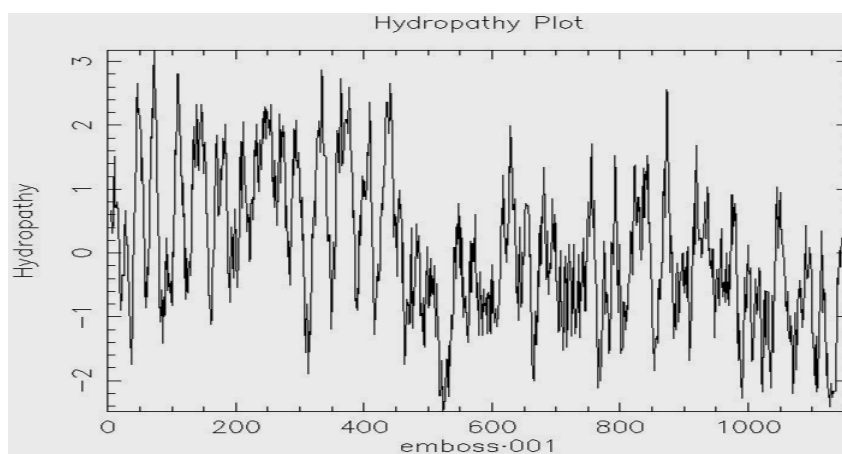


شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده توالی پروتئینی ژن آنتی پورتر غشای پلاسمایی (SOS1) جداسازی شده از *K.scoparia* با گونه‌های گیاهی مختلف با استفاده از نرم افزار Meg Align به روش Cluster W. پارامتر تکرار در ترسیم درخت معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شد.

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 فسفریلاسیون توسط SOS_2 و تعامل با RCD_1 وجود دارد. مدل‌سازی شبکه پروتئینی برای ژن شناسایی شده با استفاده از گیاه آرکیدوپسیس 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 پتاسیم 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)

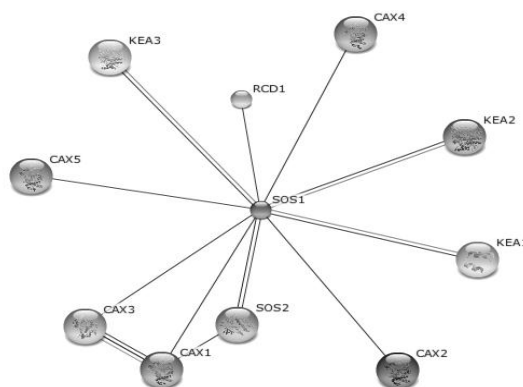
با بررسی نمودار رامچاندوران برای توالی پروتئینی مورد بررسی آشکار شد که بیشتر زوایای پیوندی در ربع پایین سمت چپ و ربع بالا سمت چپ دیده شده است که به ترتیب مربوط به ساختارهای مارپیچ آلفا و صفحات بتا می‌باشد. که با توجه به ساختارهای دوم پیش‌بینی شده این زوایا تایید شده‌اند. با بررسی ساختار ثانویه در توالی آمینواسیدی مشخص شد که در پلی‌پپتید مورد بررسی، ۴۳ درصد مارپیچ آلفا، ۲۹ درصد ساختار پیچ کوچک و ۱۷ درصد ساختار صفحات بتا و ۸ درصد پیچ بتا در کل پلی پپتید 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 هیدروفوبیسیته بالاتر دیده می‌شوند و دم C- ترمینال که دارای هیدروفوبیسیته پایین‌تری است و دارای چندین مارپیچ کوچک هستند، میزان هیدروفوبیسیته آنها پایین‌تر از مارپیچ‌های موجود در غشای پلاسمایی است. در انتهای N- ترمینال این



شکل ۳- نمودار هیدروپاتی پروتئین پیشگویی شده مربوط به ژن K.S.SOS₁ جداسازی شده از *K. scoparia*
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 غشای 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) 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 پتاسیم 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



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 گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تنش می‌باشد. با توجه به این که تحمل گیاهان شورزی نسبت به تنش 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 SOS₁ دو ناحیه موجود در اسیدآمین‌های ۴۴۰-۸۰۶ و ۹۳۶-۱۱۰۳ برای تعامل با پروتئین RCD₁ مهم هستند، که در این شبکه پروتئینی به نمایش درآمده‌اند (Hiltscher 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 Pakestan* 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.

Hiltscher 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 (RCD1) 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* SOS₂ 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 SOS₁ interacts with RCD1 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. Regulation of SOS₁, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *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 SOS₂ 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, Ziaee 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.