



بررسی الگوی بیان ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در شاخساره ارقام گندم حساس و مقاوم و خویشاوند وحشی *Aegilops crassa* تحت تنش شوری

زهرا زینتی^۱، عباس عالمزاده^{۲*}، اسماعیل ابراهیمی^۳، علی نیازی^۳

^۱استادیار بخش آگرواکولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب

^۲دانشیار بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

^۳دانشیار مرکز بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۳

چکیده

با توجه به اهمیت نقش پمپ پروتونی غشای پلاسمایی (H^+ -ATPase) در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک گیاه، الگوی بیانی این پمپ در شاخساره ارقام گندم مقاوم ارگ و حساس الموت و خویشاوند وحشی آن، *Aegilops crassa* تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. تنش شوری با افزودن mM ۱۵۰ کلرید سدیم اعمال و نمونه برداری از شاخساره گیاهان مذکور در ۳ زمان صفر، ۱۲ ساعت و ۳ هفته پس از اعمال تنش انجام شد. برای نرمال کردن مقدار cDNA نمونه‌های مختلف از ژن رمزکننده اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد و میزان بیان نسبی ژن با استفاده از Real-time PCR در نمونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که در سه هفته پس از اعمال تنش شوری میزان بیان نسبی ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی بیشتر از ۱۲ ساعت پس از تنش بود. همچنین بیان ژن مذکور سه هفته پس از تنش در رقم مقاوم تفاوت معنی‌داری با خویشاوند وحشی و رقم حساس داشت. نکته قابل توجه عدم تغییر معنی‌دار بیان این ژن در زمان‌های مختلف پس از اعمال شوری در رقم حساس بود. همچنین بررسی بیوانفورماتیکی پیش‌برنده ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی، مشخص کرد که چندین موتیف مربوط به پاسخ به تنش‌های مختلف غیرزیستی و پاسخ به نور در پیش‌برنده این ژن وجود دارد. در مجموع مطالعات بیوانفورماتیک و آزمایشگاهی نقش ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی را در القای مقاومت به شوری نشان داد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پمپ پروتونی، تنش شوری، گندم.

مقدمه

غشاهای سلولی و واکوئلی وجود دارند (Apse and Blumwald, 2007). نتایج حاصل از پژوهش Saeedpour *et al.* (2014) نیز بیانگر نقش ژن رمز کننده آنتی پورتر غشای واکوئلی (NHX) در پاسخ به شوری می باشد. آنتی پورترها از نیروی محرکه پروتون که توسط پمپ های پروتونی ایجاد می شوند، استفاده می کنند. در گیاهان، تنها پمپی که شیب پروتونی در غشای پلاسمایی ایجاد می کند، پمپ پروتونی یا همان پمپ H^+ -ATPase است (Palmgren, 2001) که بعداً سایر انتقال دهنده ها مثل آنتی پورترهای سدیمی/هیدروژنی از این نیروی محرکه استفاده کرده و انتقال ثانویه را انجام می دهند. به همین دلیل تصور می شود که پمپ پروتونی غشای پلاسمایی نقش مهمی در تحمل به شوری داشته باشد (Michelet and Boutry, 1995). حدود ۲۵ تا ۵۰ درصد از ATP سلولی توسط این پمپ مصرف می شود که بیانگر اهمیت این پمپ یونی می باشد (Felle, 1982). پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در بسیاری از کارکردهای فیزیولوژیک نظیر وقایع مرتبط با تورژسانس مانند رشد سلول و گیاه، باز و بسته شدن روزنه و تحمل به شوری نقش اساسی دارد (Michelet and Boutry, 1995). تنظیم این پمپ در دو سطح رونویسی و پس از ترجمه صورت می گیرد (Janicka-Russak, 2011). تنظیم پس از ترجمه بواسطه فسفریلاسیون این آنزیم (Kanczewska *et al.*, 2005) و همچنین تغییرات محیط لپیدی غشای سلولی انجام می شود (Kasamo, 2003). شواهد

گندم از عمده ترین محصولات کشاورزی ایران و تامین کننده بیشترین نیاز غذایی کشور می باشد. با توجه به حساسیت گندم به تنش های محیطی، با افزایش تحمل این گیاه نسبت به این تنش ها می توان قدم های اساسی برای افزایش عملکرد گندم و پایداری آن در سال های مختلف برداشت. تنش شوری یکی از مهمترین عوامل کاهش عملکرد گیاهان زراعی می باشد (Flowers, 2004). حداقل ۲۰٪ زمین های تحت آبیاری دنیا تحت تاثیر شوری هستند (Sahi *et al.*, 2006). انتظار می رود که افزایش شوری تا نیمه قرن حاضر منجر به از بین رفتن ۵۰٪ از زمین های زراعی دنیا شود (Tuteja, 2007). در هنگام تنش شوری، گیاه با دو تنش اسمزی و یونی روبرو می شود (Alvarez *et al.*, 2003) که ایجاد تعادل اسمزی و یونی در گیاه، از مهمترین عوامل ایجاد کننده تحمل می باشند (Niu *et al.*, 1993). تحت تنش شوری، سدیم از طریق کانال های کاتیونی غیرانتخابی و انتقال دهنده های سدیمی با تمایل کم^۱ (HKT1)، وارد ریشه گیاه می شوند (Maser *et al.*, 2002). انتقال فعال سدیم به خارج از سلول یا انباشت کردن آن در واکوئل، می تواند مانع اثرات مخرب سدیم در سلول گیاهی شود (Zhu, 2003). در گیاهان، آنتی پورترهای ثانویه سدیم/پروتون برای انتقال سدیم در خلاف جهت شیب پروتونی در

¹ Low-affinity sodium transporter

نشان می‌دهند که پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم/کالمودولین به عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت (van der Hoeven *et al.*, 1996) و پروتئین-کینازهای سرین/ترئونین به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی (Fuglsang *et al.*, 2007) مسئول فسفریلاسیون پمپ پروتونی غشای پلاسمایی می‌باشند. محققین نشان داده‌اند که پیام‌های ناشی از شرایط محیطی مانند شوری در گوجه‌فرنگی و توتون (Binzel, 1995; Niu *et al.*, 1993)، دمای پایین در خیار (Ahn *et al.*, 2000)، فلزات سنگین در خیار (Janicka-Russak and Klobus, 2007)، خشکی در سویا (Surowy and Boyer, 1991)، نور طبیعی در سیب‌زمینی (Harms *et al.*, 1994)، تنش مکانیکی در توتون (Oufattole *et al.*, 2000) و هورمون‌ها در ذرت (Frias *et al.*, 1996) منجر به تغییر بیان ژن‌های رمزکننده این پمپ می‌شوند. گزارش شده است که تنش شوری باعث افزایش فعالیت پمپ پروتونی غشای پلاسمایی هم در هالوفیت‌ها و هم در گلایکوفیت‌ها می‌شود (Sahu and Shaw, 2009; Lopez-Perez *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2011). تا کنون دانش اندکی در رابطه با نوع الگوی بیان ژن‌های مختلف تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی در ارقام حساس و مقاوم یک گونه زراعی و مقایسه آن با گونه‌های وحشی وابسته به آنها بدست آمده است. در پژوهشی که توسط Ravash *et al.* (2013) انجام شد اهمیت پیدا کردن ژن‌های مؤثر در ایجاد تحمل به تنش‌ها در خویشاوندان وحشی گیاهان نشان داده شده است. با اینکه گندم یک گونه زراعی مهم در

سرتاسر جهان می‌باشد و تحقیقات زیادی نیز نقش پمپ پروتونی را در تحمل به شوری نشان داده‌اند اما تا کنون گزارشی از الگوی بیان ژن‌های رمزکننده این پمپ در ارقام مقاوم و حساس گندم و خویشاوندان وحشی آن تحت شوری ارائه نشده است. به همین دلیل این تحقیق به منظور مطالعه چگونگی الگوی بیانی ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در شاخساره ارقام گندم مقاوم (ارگ) و حساس (الموت) به شوری و خویشاوند وحشی *Aegilops crassa* در زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش شوری انجام شده است. همچنین با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های وحشی ذخایر با ارزشی از ژن‌های مقاوم به تنش‌های مختلف می‌باشند (Munns and Richards, 2007) و ژنوم D گندم از گونه‌های *Aegilops* منشاء گرفته است (Gorham, 1990)، بیان این ژن در ژنوتیپ وحشی *A. crassa* نیز جهت مقایسه با ارقام زراعی و یافتن همولوگ برتر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت درک چگونگی تنظیم بیان این ژن و نقش آن در سازوکارهای مولکولی تحمل به تنش‌های مختلف، ۲۰۰۰ جفت باز بالادست ناحیه -UTR ۵' ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی به عنوان پیشبرنده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تغییرات بیان ژن رمزکننده پمپ پروتونی تحت شرایط تنش شوری در ارقام گندم مقاوم ارگ و حساس الموت و

نیز با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis (فرمتناز، EP0441) و طبق دستورالعمل کیت تهیه شد.

تکثیر قطعه‌ای از ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی، همسانه‌سازی و توالی‌یابی آن

ابتدا قطعه‌ای با طول ۱۳۷ جفت باز از ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی از *A. crassa* در حجم ۲۰ میکرولیتر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۱۰ mM تریس، ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۱/۵ mM کلرید منیزیم، ۲۰۰ μM از هر یک از نوکلئوتید تری فسفات‌ها، ۰/۵ μM از هر یک از آغازگرهای اختصاصی، ۱ میکرولیتر از cDNA به عنوان رشته الگو و یک واحد آنزیم DNA پلیمرز تحت چرخه حرارتی °C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با °C ۹۴ برای ۳۰ ثانیه، °C ۵۰/۲ برای ۲۰ ثانیه و °C ۷۲ برای ۳۰ ثانیه تکثیر شد. در انتهای چرخه‌ها هم یک مرحله نهایی با دمای °C ۷۲ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سپس برای تایید صحت قطعه تکثیرشده، قطعه حاصل با استفاده از کیت TA PCR Cloning Ins clone ساخت شرکت فرمتناز (K1213) در درون ناقل pTZ57R/T الحاق شده و طبق دستورالعمل کیت به سلول‌های باکتری DH5α انتقال یافت و روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین (۵۰ μg/ml)، IPTG^۱ (۵۰ μg/ml) و X-gal^۲ (۲۰ μg/ml) کشت داده شد. روز بعد، از کلنی‌های آبی و سفید تشکیل شده،

خویشاوند وحشی آن، *Aegilops crassa* آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز در سال‌های ۹۰ و ۹۱ انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل ژنوتیپ، ارقام گندم زراعی ارگ (مقاوم به شوری) و الموت (حساس به شوری)، و یک خویشاوند وحشی (*A. crassa*) (دارنده ژنوم DD)، و زمان نمونه‌برداری در سه سطح (صفر ساعت، ۱۲ ساعت و ۳ هفته پس از اعمال تنش) بودند. در این تحقیق از کشت هیدروپونیک و محیط کشت مایع هوگلند استفاده شد (Kerepesi and Galiba, 2000). گیاهچه‌های ۲۱ روزه به مدت سه هفته تحت تنش شوری، ۱۵۰ mM کلرید سدیم، قرار گرفته و نمونه‌برداری از بافت شاخساره در سه زمان صفر، ۱۲ ساعت و ۳ هفته پس از اعمال تنش شوری انجام شد.

استخراج RNA کل توسط کیت column RNA isolation kit (دنازیست، S-1020-1)، طبق دستورالعمل کیت انجام شد. کمیت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) و کیفیت آن با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی در RNA استخراج شده، با توجه به دستورالعمل کیت فرمتناز (K0701) تیمار DNase انجام شد. سپس به منظور اطمینان از حذف DNA ژنومی از RNAهای استخراج شده، از RNA تیمار شده در یک واکنش PCR استفاده شد. رشته اول cDNA

^۱ Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside

^۲ Bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside

با شماره دسترسی AY543630 و ژن رمزکننده اکتین به عنوان ژن مرجع با استفاده از نرم افزار AlleleID طراحی شدند (جدول ۱). الگوی بیان ژن مورد نظر توسط دستگاه Real-Time PCR با استفاده از SYBR PrimeScript RT-PCR kit (تاکارا، RR820W) و دستگاه Bioer ساخت کشور چین مطالعه شد. مواد مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR شامل ۱۰ میکرولیتر از مخلوط SYBR، ۰/۸ میکرولیتر از هر آغازگر (۰/۵ μM)، ۱ میکرولیتر از cDNA و ۷/۴ میکرولیتر آب مقطر بود. چرخه حرارتی استفاده شده در واکنش شامل ۹۴ °C به مدت ۲ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه با ۹۴ °C برای ۱۰ ثانیه، ۵۰/۲ برای ۱۵ ثانیه و ۷۲ °C برای ۳۰ ثانیه بود. به منظور اختصاصی بودن واکنش، در پایان واکنش از منحنی ذوب با برنامه دمایی ۰/۵ درجه برای هر چرخه و دمای ۵۰-۹۵ °C استفاده شد.

کلنی‌های سفید که حاوی پلاسمید نوترکیب بودند روی محیط کشت انتخابی LB شناسایی شدند. برای اطمینان از الحاق قطعه تکثیر شده در ناقل، چند کلون سفید انتخاب شده و از آنها به عنوان رشته الگو در یک واکنش PCR استفاده شد. سپس حدود ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمیدهای نوترکیب توسط Gene JET Plasmid Miniprep Kit (فرمتاز، K0502) استخراج و جهت توالی-یابی به شرکت دنا زیست ارسال شد. پس از توالی‌یابی، توالی مربوط به ناقل توسط نرم افزار Vector NT1 10.3.1 حذف و توالی نوکلئوتیدی باقی‌مانده با استفاده از برنامه‌های blastn و blastx با توالی‌های موجود در سایت NCBI مقایسه شد.

واکنش Real time PCR

جفت آغازگرهای مناسب جهت بررسی بیان ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در Real Time PCR جهت تکثیر ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی و اکتین در گندم و خویشاوند وحشی آن.

Table 1- Sequences of primers used in Real time PCR for amplification of genes encoding plasma membrane proton pump and actin in wheat and its wild relative.

نام ژن gene name	نام آغازگر primer name	توالی آغازگر sequence	دمای اتصال (°C) annealing temperature	طول قطعه تکثیر شده (bp) amplicon length
actin	actin F	5'-TATGCCAGCGGGCGAACAAAC-3'	57	351
	actin R	5'-GGAACAGCACCTCAGGGCAC-3'		
H ⁺ -ATPase	H ⁺ -ATPase F	5'-TGCCATTC AACCTACTG-3'	50.2	137
	H ⁺ -ATPase R	5'-CACCTTCTCTTCACATCC-3'		

آنالیز داده‌های Real Time PCR

ابتدا Ct (Cycle threshold) هر نمونه برای ژن اصلی و مرجع با تعیین خط پایه (base line) با استفاده از نرم افزار LineGene تعیین شد. بدین صورت که محل تقاطع با base line با ابتدای فاز نمایی نمودار تکثیر واکنش Real-time PCR. به عنوان Ct در نظر گرفته شد. آنالیز Ct‌های حاصل با استفاده از روش کمی سنجی نسبی انجام شد. در این روش از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ (نمونه ΔCT - کنترل $\Delta CT = \Delta\Delta CT$) استفاده شد (Pfaffl, 2001). در نهایت با استفاده از نرم‌افزار SAS، اختلاف معنی‌دار بیان ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در ارقام حساس و مقاوم و خویشاوند وحشی *A. crassa* در بافت شاخساره در زمان‌های صفر، ۱۲ ساعت و ۳ هفته پس از تنش توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $P \leq 0/05$ مورد مقایسه قرار گرفتند. از آن‌جا که داده‌های حاصل از آنالیز Real Time PCR بیانگر تغییر بیان ژن در شرایط تنش شوری نسبت به شرایط کنترل متناظر خود در هر زمان نمونه‌برداری می‌باشند، آزمایش با دو فاکتور شامل ژنوتیپ‌ها و زمان نمونه‌برداری آنالیز گردید.

بررسی عوامل رونویسی و جایگاه اتصال آن‌ها به پیشبرنده ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی

از آنجا که بانک اطلاعاتی برای شناسایی پیشبرنده در گندم وجود ندارد جهت بررسی پیشبرنده این ژن در گندم از همولوگ ژن رمز

کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در برنج (LOC_Os04g56160) استفاده شد. برای شناسایی و گرفتن توالی پیشبرنده ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در برنج از پایگاه اطلاعاتی Phytozome (<http://www.phytozome.net>) استفاده شد. به این منظور ۲۰۰۰ bp بالادست ناحیه 5'UTR به عنوان پیشبرنده انتخاب شد. سپس به منظور بررسی عوامل رونویسی و جایگاه اتصال آن‌ها به پیشبرنده این ژن، از سایت PlantPan (<http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw>) و PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) استفاده شد.

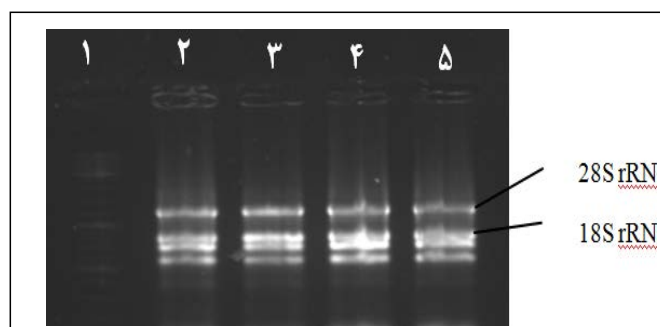
نتایج و بحث

استخراج RNA و بررسی توالی قطعه تکثیر شده طی واکنش PCR

از شاخساره *A. crassa* و ارقام حساس و مقاوم گندم RNA استخراج و روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. هر دو باند ۱۸S rRNA و ۲۸S rRNA به صورت واضح روی ژل تشخیص داده شد و باند ۲۸S rRNA تقریباً دو برابر باند ۱۸S rRNA بود که نشان دهنده کیفیت خوب RNA بود (شکل ۱). الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی و اکتین در شکل ۲ نشان داده شده است. پس از انجام PCR جهت تایید توالی تکثیر

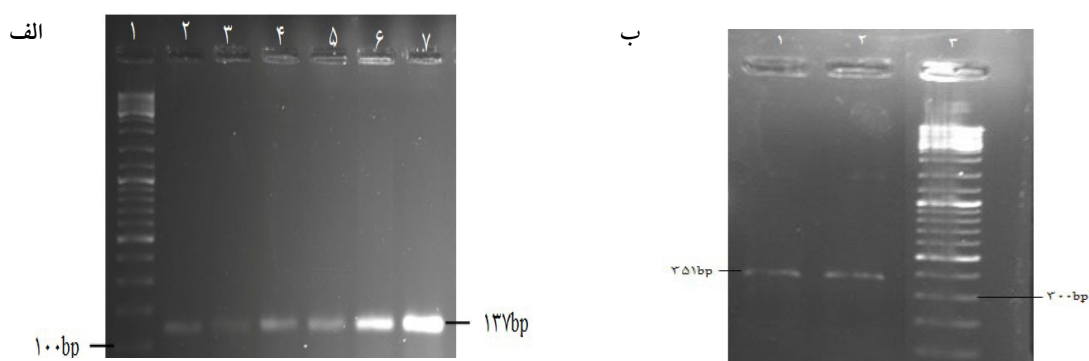
دارای تشابه ۹۸ درصدی ($E\text{-value} = 3e^{-37}$) با ژن رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در گندم بود (شکل ۳).

شده، محصولات واکنش، همسانه و توالی‌یابی شدند. نتایج blast توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده از *A. crassa* توسط آغازگر اختصاصی برای ژن رمز کننده H^+ -ATPase غشای پلاسمایی



شکل ۱- ژل تعیین کیفیت RNA کل استخراج شده از دو رقم گندم ارگ و الموت و خویشاوند وحشی *A. crassa*. ۱) نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی ۲ و ۳) ارگ ۴) الموت ۵) *A. crassa*.

Figure 1- Determining the quality of total RNA extracted from two wheat cultivars, Arg and Alamut, and wild relative *A. crassa*. 1) 100-bp size marker 2 and 3) Arg 4) Alamut 5) *A. crassa*.



شکل ۲- الف) الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ژن رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی. ۱) نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی ۲ و ۳) ارگ ۴ و ۵) الموت ۶ و ۷) *A. crassa* ب) الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی برای ژن رمز کننده اکتین. ۱ و ۲) *A. crassa* ۳) نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی.

Figure 2- a) Electrophoresis of polymerase chain reaction product with specific primers for amplification of the gene encoding plasma membrane proton pump. 1) 100-bp size marker 2 and 3) Arg 4 and 5) Alamut 6 and 7) *A. crassa*. B) Electrophoresis of polymerase chain reaction product with primers specific for the gene encoding actin. 1 and 2) *A. crassa* 3) 100-bp size marker.

T. aestivum plasma membrane H⁺-ATPase (ha1) mRNA, complete cds

```

Query 1      ATCTGCTCTGGAGCACCCCTTGCTGGCACGGTGCCAGTTACCTCGGCATCGATGTAAGTC 60
            |||
Sbjct 1286    ATCTGCTCAGGAGCACCCCTTGCTGGCACGGTGCCAGTTACCTCAGCATCGATGTAAGTC 1227

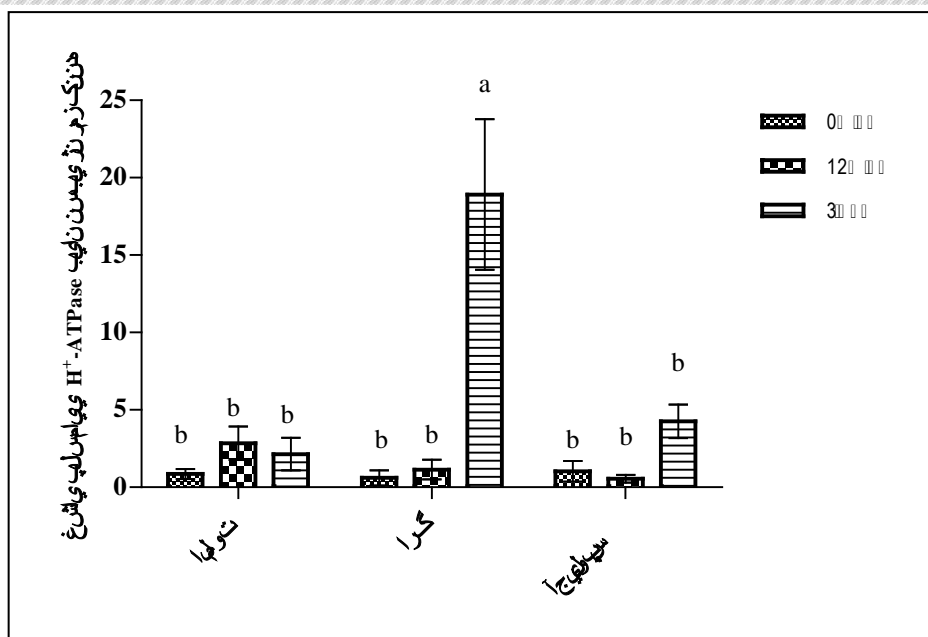
Query 61     AGAGCAGT CCTCTTGTTCAGTAGGGTTGAATGGCAA 95
            |||
Sbjct 1226    AGAGCAGT CCTCTTGTTCAGTAGGGTTGAATGGCAA 1192
    
```

شکل ۳- نتیجه توالی‌یابی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی.

Figure 3- Sequencing result of PCR product using primers specific for amplification of the gene encoding the plasma membrane proton pump.

تنش شوری، بیان نسبی ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در رقم مقاوم ارگ تفاوت معنی‌داری با رقم حساس الموت و خویشاوند وحشی *A. crassa* داشت. همچنین بیان ژن مورد بررسی در مدت زمان طولانی (پس از سه هفته) در ژنوتیپ وحشی بیش از رقم حساس افزایش یافت (شکل ۴). این موضوع می‌تواند به دلیل وجود جایگاه‌های ژنی موثر در تحمل به شوری در ژنوم آنها (Leonova and Chikida, 2011)، و رقم مقاوم ارگ و *A. crassa* الل‌های مقاوم این جایگاه‌ها را به ارث برده‌اند درحالی‌که رقم حساس الموت فاقد این الل‌های مقاوم است.

بررسی الگوی بیانی ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در ارقام گندم مقاوم ارگ، حساس الموت و خویشاوند وحشی *A. crassa* نتایج مقایسه میانگین مربوط به بیان ژن مورد نظر بین *A. crassa* و ارقام حساس و مقاوم گندم در زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش، در شکل ۴ آورده شده است. سه هفته پس از اعمال تنش شوری، بیان ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در رقم مقاوم ارگ، خویشاوند وحشی *A. crassa* و رقم حساس الموت رشد یافته تحت شرایط تنش شوری به ترتیب ۱۸/۹۱۳۴۸، ۴/۲۵۶۹۰ و ۲/۱۴۳۴۳ برابر در مقایسه با گیاهان رشد یافته در شرایط عدم تنش بود. نتایج نشان داد که سه هفته پس از اعمال



شکل ۴- بیان نسبی ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در زمان‌های مختلف صفر، ۱۲ ساعت و ۳ هفته پس از اعمال تنش شوری در خویشاوند وحشی *A. crassa*، ارقام مقاوم ارگ و حساس الموت. میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۰.۰۵٪ اختلاف آماری معنی‌دار با یکدیگر ندارند.

Figure 4- Relative expression of gene encoding plasma membrane proton pump at different times after applying salinity treatment (0, 12 hours and 3 weeks) in *A. crassa* as wild relative, Arg (resistant cultivar) and Alamut (sensitive cultivar). The same letters are not significantly different using Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$).

منحصر به فردی هستند که به آنها امکان ادامه حیات تحت این شرایط را اعطا می‌کند. این گیاهان همواره سعی در حفظ انرژی دارند به همین دلیل احتمالاً گیاه با عدم افزایش رونویسی از ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی تحت شرایط تنش در کوتاه مدت، از استفاده انرژی بیشتر توسط این پمپ جلوگیری به عمل می‌آورد و از سازوکارهای دیگری که گیاهان زراعی فاقد آن هستند و انرژی کمتری مصرف می‌کنند در کوتاه مدت سعی در مقابله با شرایط تنش دارد اما در بلند مدت احتمالاً بدلیل کافی

نکته مهم دیگری که در نتایج مشاهده شد، کاهش میزان بیان ژن مورد مطالعه در زمان کوتاه پس از اعمال تنش در خویشاوند وحشی بود. این کاهش معنی‌دار نبوده و در ارقام زراعی نه تنها این کاهش مشاهده نشد بلکه شاهد افزایش نیز بودیم هرچند این افزایش نیز معنی‌دار نبود (شکل ۴). علت این امر ممکن است سازوکارهای خاصی در *A. crassa* باشد که برای افزایش کارایی مصرف انرژی در طبیعت بوجود آمده‌اند (Moghadam, 2013). ژنوتیپ‌های وحشی بدلیل سازگاری با شرایط دشوار محیطی و روبرو بودن با انواع تنش‌ها احتمالاً دارای سازوکارهای

بررسی عناصر تنظیمی و کارکرد آن‌ها می‌تواند در پیش‌بینی نقش احتمالی ژن‌ها مفید باشد. آنالیز پیش‌برنده ژن رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در برنج نشان داد که چندین عنصر پاسخ‌دهنده به تنش‌ها از جمله ABRE (عنصر پاسخ‌دهنده به هورمون آبسزیک اسید)، Box-W1 (عنصر پاسخ‌دهنده به عصاره قارچی)، ERE (عنصر پاسخ‌دهنده به اتیلن)، GARE-motif (عنصر پاسخ‌دهنده به جیبرلین)، TC-rich repeats (عنصر پاسخ‌دهنده به تنش و دفاع گیاهی)، HSE (عنصر پاسخ‌دهنده به تنش گرمایی)، TCA-element (عنصر پاسخ‌دهنده به سالیسیک اسید)، CGTCA-motif و -TGACG motif (عناصر پاسخ‌دهنده به متیل-جاسمونات)، GT-1 motif (عنصر پاسخ به شوری و عامل بیماریزا) و عناصر پاسخ‌دهنده به نور در این ناحیه وجود دارند (شکل ۵). همچنین در این ناحیه تعدادی از جایگاه‌های عوامل رونویسی مربوط به ABI4 (AP2 domain transcription factor)، MYB4، Dof1، ERELEE4 (Ethylene-responsive transcription factor 4)، MYB1AT، Dof، zinc finger protein PBF، WRKY71، GT-1، like transcription factor موجود می‌باشند که نقش آن‌ها در پاسخ به تنش‌های مختلف غیرزیستی مشخص شده است (Park et al., 2004; Mattana et al., 2005; Vannini et al., 2006; Huerta-Ocampo et al., 2011; Mizoi et al., 2012; Narsai et al., 2013). با توجه به اینکه پیش‌برنده ژن رمز کننده پمپ پروتونی غشای

نبودن آن مسیرها از سازوکارهای کارتر اما با مصرف انرژی بیشتر استفاده می‌کند. افزایش بیان ژن رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در رقم مقاوم ارگ و خویشاوند وحشی *A. crassa* می‌تواند اشاره به اهمیت این پمپ در تحمل به تنش شوری داشته باشد. از آن‌جا که پمپ پروتونی غشای پلاسمایی مسئول ایجاد شیب پروتونی و تامین انرژی لازم برای انتقال یون‌ها و متابولیت‌ها از طریق این شیب پروتونی می‌باشد بنابراین افزایش بیان این ژن در رقم مقاوم و ژنوتیپ وحشی می‌تواند منجر به تعادل یونی در درون سلول و در نتیجه مقاومت به شوری شود. این یافته‌ها با نتایج سایر محققین مطابقت دارد. به طوری که (Niu et al., 1993) در مقایسه توتون گلائیکوفیت و *Atriplex nummularia* هالوفیت نشان دادند که تجمع رونوشت ژن رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در پاسخ به شوری در گیاه هالوفیت نسبت به گلائیکوفیت بیشتر بود. همچنین گزارش شده است که در شرایط تنش، میزان تجمع رونوشت ژن رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در *Suaeda maritime* (هالوفیت) و رقم مقاوم به شوری در برنج، بیشتر از رقم حساس برنج بوده است (Sahu and Shaw, 2009). همچنین مشخص شده است که فعالیت این پمپ تحت تنش شوری در رقم حساس گندم (L-Ch20) کاهش و در رقم مقاوم گندم (J24) افزایش می‌یابد (Yang et al., 2004).

پیشبرنده القا پذیر در تنش های زیستی و غیرزیستی می باشد. پیشبرنده های القا پذیر ابزار مفیدی در بهبود مقاومت به تنش های مختلف محسوب می شوند.

پلاسمایی دارای عناصر پاسخ دهنده به هورمون آبسیزیک اسید می باشد، به احتمال زیاد این ژن در مسیر وابسته به آبسیزیک اسید فعالیت دارد. همچنین با توجه به عناصر مختلف پاسخ دهنده به تنش های مختلف، پیشبرنده این ژن یک

CTGTTTAGATTCCAACCTTTTATCTTTAAACTTTTAATTTTTCCGTCACATCGAACCTTTCCTACACACGTT
 CTAATTTCTTCAAAGTAGCAATTTTGGCGTGGAAGTGAACGCAGCCCTTATTGAGCCCTTTGTGTGTG
 TGTAGGTGTGTGTGTAAGGAAAGTCAATGTGATGAAAAAGTTGTAAGTTCGAAAGAAAAA
 GAATCTAAACAGGGCCTAAGTTAGTTTAAACATTTTTGAAAGTTTGTAAAGTTTGAATTAAGTTTTAGCA
 ATATCTAAAAACATCAAATTAGTTTTATATAAACTAATATTGAATATATTGTAATAATATGTTTGT
 GTTTGAAAAACGCCACTATGTTTTATATAAACTGATCAAACCTAAGAAATTTGATTAGGAAATAAAAT
 GCAAAAACGAACTGAGGGAATTTAGCAAAAATCTAATATTGAATATATTGTAATAATGTTTGT
 TTGTGTGAAAAATGCTACTATGTTTTCTATAAAATCGAACAACTTAAGAAATTTGATTAGGAAAGA
 AAATGCAAAAACGAAATGAGGGAGTAAAAATTTAGCAATAACATGGTACTATCGTGAATTCGAGCGA
 TCATCGTGAATTTCTAAACCTGAAAGCAAGCAGATTGTTTTCCCTCTTTCTCCTCG
 GAGAGACTATGGATTCGGCACCCTCATATTTTTAAAAAATCAGGTGCAATTCTACCCACCCGATGCTTG
 TCA-element
 GTGCATAGAGTACTCTCCCTCTCTTCTTACTGTATAACACCTTTTATCAAACCTTTTCTCTCTT
 TCA-element
 AATCTTAAATTATTATATGATTTGTAATCCGATCACACGGTTATATTGTTATGATTAATCTTTAAAA
 CAAGATCTTTATTATCACACATGAAACACGTGATACATTCAGTCGTAAGTGTGAACTATTCAAACA
 ABRE
 TCGCAAAAATAAAAACGTGCAACTTTTGCAAAATGATCTAGTGTAAACATTAGAAAAATAAAAAATTTCTCT
 GCAACTTCAAATAATACCATATGTAATATGTAATATTAGTAAAAACCATTCGCAAAAATAAAAAATAA
 AAATATGAAACATGGTCAACTTTTAGTTGAAACATTATCTTCTACCTTTGAAACATAAAAAAATCAAT
 TTGTCAAAACCTATACATTTTTTCGTCAAAATATAATCATGCGAGCTATTGTTGTAAGATTAGTTGT
 CGTCA-motif
 AATAAATACAACGATGTAATCGGATATTAGATCATATAAATTTTTAAAAAGAAAAATGGTTTTGAAAT
 TCAAATTAAGGAGCCCATTTGAATCGCGGAATGAAAAACGAAGGAATAAAAAACACAGGATTCT
 AACCGTAATGGAAGTGTAAACAGAGAAATTGCAAAAATACAGGAATGACCGTTTGTGATTGGACTATAGA
 GARE-motif
 AAAAAAACAGGAATTGGAAGAAAGAGATAGACTAAAAAATTCGAAGAGCTTTGAGCTGTTGCTA
 TGACG-motif
 HSE
 AGTTTCTTCAAAAATCTCTATAGTATTATCCATTTTCATAGGAATATCAAAGGATTAGATATGATGCAA
 TCCTTAAATTTAAAGGCACTATAAGAATTTTTCTATAGAAATAAAATCCTCTAAATCCCTGTATTTT
 TCCTTCAAAATCAAATGGCCCTAAAAATATATTATATCTTACATGCAATTGTACCCCTCTCACCATATTA
 GTCAGTGGTTTTTTTTTTTTTTTGGTCTTGTCTTGGCGTATGCAGTACTGTTGCTAGAGCCGATCTT
 CGTCA-motif
 GTTGCTGTCTTGCATGTAAGCCGATTTTCTCCCATTTCCTCCGCGGAATCCTGGGCCTCACACGCGG
 TC-rich repeats
 CGTCGTGGCGAAGTCGCGACACGTGCGGCGTTCGAGCGCCGGTGCCTGCGCGCAGGCGGAGGCGCCC
 ABRE
 CGCGAAGCTCGCTCGGTCGCCATGGCGGAAACCGGAAAGACCCTATAAGACGCCCGCGCGACCC
 CCATTGCCTCGCC

شکل ۵- عناصر پاسخ دهنده به تنش در پیشبرنده ژن رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در برنج.

Figure 5- Responsive elements involved in stress responsiveness in promoter region of the gene encoding plasma membrane proton pump in rice.

تحمل به شوری و امکان استفاده کاربردی از آن به عنوان ژن هدف برای انتقال به گیاهان حساس به منظور افزایش تحمل در آنها باشد. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد با افزایش بیان ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی از طریق افزایش تعداد نسخه‌های این ژن در گیاهان، از طریق مهندسی ژنتیک، امکان افزایش تحمل آنها نسبت به تنش شوری وجود دارد.

سپاسگزاری

هزینه‌های این تحقیق توسط دانشگاه شیراز پرداخت شده است که موجب تشکر و قدردانی است.

تا به امروز فقدان دانش کافی در رابطه با سازوکارهای مولکولی تحمل به شوری و ژن‌های مؤثر در مقاومت، موجب ایجاد محدودیت در ایجاد گیاهان مقاوم به شوری شده است (Munns & Chinnusamy *et al.*, 2005; Tester, 2008). بنابراین، اطلاعات حاصل از بررسی بیان ژن‌های مرتبط با تحمل به شوری و درک سازوکارهای تحمل به تنش اهمیت زیادی دارند.

بررسی الگوی بیانی ژن رمزکننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی نشان داد که بیان نسبی آن در ژنوتیپ‌های مقاوم سه هفته پس از تنش افزایش بیشتری نسبت به رقم حساس داشت. این نتایج می‌تواند بیانگر نقش مهم این ژن در اعطای

منابع

- Ahn SJ, Im YJ, Chung GC, Seong KY, Cho BH (2000). Sensitivity of plasma membrane H⁺-ATPase of cucumber root system in response to low root temperature. *Plant Cell Reports* 19: 831-835.
- Alvarez I, Tomaro M, Benavides M (2003). Changes in polyamines, proline and ethylene in sunflower calluses treated with NaCl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 51-59.
- Apse MP, Blumwald E (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* 581: 2247-2254.
- Binzel ML (1995). NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H⁺-ATPase message in tomato. *Physiologia Plantarum* 94: 722-728.
- Chen M, Song J, Wang BS (2010). NaCl increases the activity of the plasma membrane H⁺-ATPase in C3 halophyte *Suaeda salsa* callus. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 27-36.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*. 45: 437-448.
- Felle H (1982). Effects of fusicoccin upon membrane potential resistance and current-voltage characteristics in root hairs of *Sinapis alba*. *Plant Science Letters* 25: 219-225.
- Flowers TJ (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55: 307-319.

- Frias I, Caldeira MT, Perez-Castineira JR, Navarro-Avino JP, Culianez-Macia FA, Kuppinger O, Stransky H, Pages M, Hager A, Serrano R (1996). A major isoform of the maize plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8: 1533-1544.
- Fuglsang AT, Guo Y, Cuin TA, Qiu Q, Song C, Kristiansen KA, Bych K, Schulz A, Shabala S, Schumaker KS, Palmgren MG, Zhu JK (2007). *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* 19: 1617-1634.
- Gorham J (1990). Salt tolerance in the triticeae: K/Na discrimination in *Aegilops* species. *Journal of Experimental Botany* 41: 615-621.
- Harms K, Wohner RV, Schulz B, Frommer WB (1994). Isolation and characterization of P-type H⁽⁺⁾-ATPase genes from potato. *Plant Molecular Biology* 26: 979-988.
- Huerta-Ocampo JA, Leon-Galvan MF, Ortega-Cruz LB, Barrera-Pacheco A, De Leon-Rodriguez A, Mendoza-Hernandez G, de la Rosa AP (2011). Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Plant Biology* 13: 472-482.
- Janicka-Russak M, Klobus G (2007). Modification of plasma membrane and vacuolar H⁺-ATPases in response to NaCl and ABA. *Journal of Plant Physiology* 164: 295-302.
- Janicka-Russak M (2011). Plant plasma membrane H⁺-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. In: Venkateswarlu B (ed) *Abiotic Stress Response in Plants InTech*, Rijeka, Croatia, pp. 197-218.
- Kanczewska J, Marco S, Vandermeeren C, Maudoux O, Rigaud JL, Boutry M (2005). Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11675-11680.
- Kasamo K (2003). Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity by the membrane environment. *Journal of Plant Research* 116: 517-523.
- Kerepesi I, Galiba G (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*. 40: 482-487.
- Leonova TG, Chikida NN (2011). Assessment of salt tolerance of *Aegilops* L. from the VIR collection. *Russian Agricultural Sciences* 37: 283-285.
- Lopez-Perez L, Martinez-Ballesta Mdel C, Maurel C, Carvajal M (2009). Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry* 70: 492-500.
- Maser P, Eckelman B, Vaidyanathan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, Yamagami M, Yamaguchi K, Nishimura M, Uozumi N, Robertson W, Sussman MR, Schroeder JI (2002). Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter *AtHKT1*. *FEBS Letters*. 531: 157-161.

- Mattana M, Biazzi E, Consonni R, Locatelli F, Vannini C, Provera S, Coraggio I (2005). Overexpression of *Osmyb4* enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 125: 212-223.
- Michelet B, Boutry M (1995). The Plasma membrane H^+ -ATPase (A highly regulated enzyme with multiple physiological functions). *Plant Physiology* 108: 1-6.
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* 2: 86-96.
- Moghadam AA, Ebrahimie E, Taghavi SM, Niazi A, Zamansani Babgohari M, Deihimi T, javaheri MD, Ramezani A (2013). How the nucleus and mitochondria communicate in energy production during stress: nuclear *MtATP6*, an early-stress responsive gene, regulates the mitochondrial F(1)F(0)-ATP synthase complex. *Molecular Biotechnology*. 54: 756-769.
- Munns R, Richards RA (2007). Recent advances in breeding wheat for drought and salt stresses. In: Jenks M, Hasegawa P, Jain SM Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. Springer Netherlands, pp. 565-585.
- Munns R, Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Review of Plant Biology*. 59: 651-681.
- Narsai R, Wang C, Chen J, Wu J, Shou H, Whelan J (2013). Antagonistic, overlapping and distinct responses to biotic stress in rice (*Oryza sativa*) and interactions with abiotic stress. *BMC Genomics* 14: 1471-2164.
- Niu X, Narasimhan ML, Salzman RA, Bressan RA, Hasegawa PM (1993). NaCl regulation of plasma membrane $H^{(+)}$ -ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiology* 103: 713-718.
- Oufattole M, Arango M, Boutry M (2000). Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of a plasma-membrane $H^{(+)}$ -ATPase, and one of which is induced by mechanical stress. *Planta* 210: 715-722.
- Palmgren MG (2001). Plant plasma membrane H^+ -ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 817-845.
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee SH, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC, Cho MJ (2004). Pathogen- and NaCl-induced expression of the *SCaM-4* promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiology*. 135: 2150-2161.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29.
- Ravash R, Shiran B, Ebrahimie E, Houshmand SA (2013). Study of S-Like RNase expression in wheat and its wild relatives under drought stress. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 9: 27-38.
- Saeedpour A, Kavousi HR, MohamadiNejad GH, Khosravi S (2014). Gene expression analysis of *NHX* to salinity stress in safflower (*Carthamus tinctorius*L.). *Journal of Agricultural Biotechnology*. 16: 91-100.

- Sahi C, Singh A, Blumwald E, Grover A (2006). Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiologia Plantarum* 127: 1-9.
- Sahu BB, Shaw BP (2009). Salt-inducible isoform of plasma membrane H⁺ATPase gene in rice remains constitutively expressed in natural halophyte, *Suaeda maritima*. *Journal of Plant Physiology* 166: 1077-1089.
- Shen P, Wang R, Jing W, Zhang W (2011). Rice phospholipase Dalpha is involved in salt tolerance by the mediation of H⁽⁺⁾-ATPase activity and transcription. *Journal of Integrative Plant Biology* 53: 289-299.
- Surowy TK, Boyer JS (1991). Low water potentials affect expression of genes encoding vegetative storage proteins and plasma membrane proton ATPase in soybean. *Plant Molecular Biology* 16: 251-262.
- Tuteja N (2007). Abscisic Acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling and Behavior* 2: 135-138.
- van der Hoeven PC, Siderius M, Korthout HA, Drabkin AV, de Boer AH (1996). A calcium and free fatty acid-modulated protein kinase as putative effector of the fusicoccin 14-3-3 receptor. *Plant Physiology* 111: 857-865.
- Vannini C, Iriti M, Bracale M, Locatelli F, Faoro F, Croce P, Pirona R, Di Maro A, Coraggio I, Genga A (2006). The ectopic expression of the rice Osmyb4 gene in Arabidopsis increases tolerance to abiotic, environmental and biotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 26-42.
- Yang YL, Guo JK, Zhang F, Zhao LQ, Zhang LX (2004). NaCl induced changes of the H⁺-ATPase in root plasma membrane of two wheat cultivars. *Plant Science*. 166: 913-918.
- Zhu, JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 441-445.

Assessment of the expression pattern of a gene encoding plasma membrane pump under salt stress in the shoots of resistant and sensitive wheat cultivars and its wild relative, *Aegilops crassa*

Zinati Z.¹, Alemzadeh A.*², Ebrahimie E.³, Niazi A.³

¹ Assist. Prof. of plant breeding, Agroecology Department, College of Agriculture and Natural Resources of Darab, Iran

² Assoc. Prof. of molecular biotechnology, Crop Production and Plant Breeding Department, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

³ Assoc. Prof. of molecular genetics and genetic engineering, Center of Biotechnology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Abstract

Plasma membrane proton pump (H^+ -ATPase) has important roles in various physiological processes. Hence, the expression pattern of the gene which encodes a plasma membrane proton pump was surveyed in the shoots of resistant and sensitive wheat cultivars and its wild relative, *Aegilops crassa* under salinity stress. Salinity stress induced by adding 150 mM NaCl to the basic solution and sampling was performed in three intervals: 0, 12 h and 3 weeks after applying salinity treatment. A quantitative PCR technique was used to study the relative expression of the gene of interest and a gene encoding actin was used as the reference gene to normalize the samples. The results showed that the expression level of the gene encoding plasma membrane proton pump significantly increased in response to salt stress after 3 weeks in comparison to 12 h after applying salinity treatment. It also revealed that the expression level of the gene was significantly higher in the resistant cultivar, Arg, than sensitive cultivar and *Aegilops crassa*. It revealed that the expression level of the gene was not significantly different in sensitive cultivar under salinity treatment in different times after salinity treatment. The bioinformatics analysis of promoter region of the gene encoding plasma membrane proton pump showed that various motifs within this region involved in response to abiotic stress and light. Overall, bioinformatics and laboratory studies revealed that gene encoding a plasma membrane proton pump plays a role in induction of salinity tolerance.

Keywords: *Gene expression, Salt stress, Proton pump, Wheat.*

* Corresponding Author: Alemzadeh A.

Tel: 07112286134

Email: alemzadeh@shirazu.ac.ir