

The expression pattern of *ZmNHX1*, *ZmHKT1*, and *ZmMYB30* genes in maize under salinity stress

Mir Esmail Banifatemeh

MSc. Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran. Email: esmaeilbanifatemeh@yahoo.com

Reza Darvishzadeh 

*Corresponding Author: Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran & Professor, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran. Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir.

Sorour Arzhang 

PhD. Student of Plant Breeding-Molecular Genetics and Genetic Engineering, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran. Email: sorour.arzhang@gmail.com.

Abstract

Objective

Environmental stresses affect the growth and development of crops during the growing season. Soil salinity is one of the most important environmental stresses that reduce crop yield. Understanding the mechanisms of coping with stress in plants at the molecular level can be effective in providing an efficient way to improve stress-tolerant plants. To save energy, plants do not express all their genes, simultaneously. Rather, depending on environmental conditions, they activate genes that are needed in a particular situation. For instance, in response to salinity stress, the expression of several genes in plants including *HKT1* and *NHX1* transporters is changed. In this study, variation in the expression of *ZmHKT1* and *ZmNHX1* genes along with the *ZmMYB30* transcription factor were investigated in two salt-tolerant and salt-sensitive maize lines with real time polymerase chain reaction technology.

Materials and methods

Maize salt-tolerant line (P14L2) and salt-sensitive line (MO17) seeds were grown in plastic pots containing perlite and peat moss in 2:3 ratios under controlled conditions in growth chamber, and

Hoagland solution was used to irrigate plants. In the eight-leaf stage, salinity stress from NaCl source was gradually applied to half of the pots starting from a concentration of 5 ds/m for three days, and from the fourth day onwards, salt stress was applied at a concentration of 8 ds/m for 7 days. The other half was used as control. Then, 24 hours (as short-time salt stress) and 7 days (as long-time salt stress) after the salinity stress, the roots and leaves of the plants were sampled in liquid nitrogen. RNA extraction was performed from leaf and root samples, and cDNA was then synthesized. Gene expression was assessed with real-time PCR. The *Actin* gene was used as the reference gene. The experiment was performed in 2 biological (experimental) and 3 technical (laboratory) replicates. Finally, the changes in the expression of genes were measured.

Results

Increased expression of *ZmNHX1* gene in root tissue during the short-time and in leaf tissue during the long-time in the tolerant line, and also increased expression of *ZmHKT1* gene in the root tissue during the long-time in the tolerant line compared to the sensitive line probably indicate a positive role of these genes in resistance to salinity stress in maize. The highest relative expression of *MYB30* gene in both tolerant and sensitive lines was related to root tissue during the short-time, which over time a significant decrease in the expression of this gene was observed in both lines.

Conclusions

The results of this study can be potentially useful in maize breeding programs to produce salinity resistant cultivars.

Keywords: Abiotic stress, Corn, Real-time PCR, Salt resistance, Transcriptome.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Banifatemeh ME, Darvishzadeh R, Arzhang S (2021) The expression pattern of *ZmNHX1*, *ZmHKT1*, and *ZmMYB30* genes in maize under salinity stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (1), 137-158.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (1), 137-158.

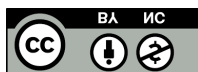
DOI: 10.22103/jab.2021.15923.1239

Received: February 11, 2021.

Accepted: March 7, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production,

Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors


مطالعه الگوی بیان نسبی ژن های *ZmMYB30* و *ZmHKT1*، *ZmNHX1* در ذرت تحت تنش

شوری

میر اسماعیل بنی فاطمه

دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه.

ارومیه، ایران. ایمیل: esmaeilbanifatemeh@yahoo.com

رضا درویش زاده 

* نویسنده مسئول: استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه. استاد، پژوهشکده زیست

فناوری دانشگاه ارومیه. ارومیه، ایران. ایمیل: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

سرور ارژنگ 

دانشجوی دکتری اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

دانشگاه ارومیه. ارومیه، ایران. ایمیل: sorour.arzhang@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۳

چکیده

هدف: تنش های محیطی رشد و توسعه گیاهان زراعی را در طول فصل رشد تحت تأثیر قرار می دهند. شوری خاک یکی از مهمترین تنش های محیطی است که باعث کاهش شدید عملکرد گیاهان زراعی می شود. آشنایی با سازوکار مقابله گیاهان با تنش در سطح مولکولی می تواند در ارزیابی روشی کارآمد برای اصلاح گیاهان حساس به تنش مؤثر باشد. گیاهان برای صرفه جویی در مصرف انرژی همه ژن های خود را همزمان فعال نمی کنند، بلکه بسته به شرایط محیطی ژن هایی را که در یک وضعیت خاص (تنش) مورد نیاز باشد را فعال می نمایند. برای نمونه، در پاسخ به تنش شوری بیان ژن های متعددی در گیاهان تغییر می یابد که از آنها می توان به ترانسپورترهای *HKT1* و *NHX1* اشاره کرد. در این مطالعه تغییرات بیان ژن های *ZmHKT1* و *ZmNHX1* به همراه عامل

رونویسی *ZmMYB30* در دو لاین متحمل و حساس به شوری ذرت با فناوری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: بذور دو لاین ذرت متحمل (P14L2) و حساس (MO17) به شوری در گلدان‌های پلاستیکی حاوی پرلیت و پیت ماس با نسبت دو به سه در شرایط کنترل شده اتاق رشد کشت شدند و از محلول هوگلند جهت تغذیه و آبیاری گیاهان استفاده گردید. در مرحله هشت برگی به نصف گلدان‌ها تنش شوری از منبع NaCl به تدریج با شروع از غلظت ۵ ds/m به مدت سه روز اعمال گردید و از روز چهارم به بعد اعمال تنش با غلظت ۸ ds/m به مدت ۷ روز ادامه پیدا کرد. نصف دیگر گلدان‌ها به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. سپس در زمان‌های ۲۴ ساعت و ۷ روز پس از اعمال آخرین مرحله تنش شوری، نمونه‌برداری از ریشه و برگ گیاهان در ازت مایع صورت گرفت. استخراج RNA از نمونه‌های برگ و ریشه انجام گرفت. سپس cDNAها سنتز شدند. بیان ژن‌ها با Real-time PCR بررسی شد. از ژن *Actin* به عنوان ژن مرجع استفاده شد. آزمایش در دو تکرار زیستی (آزمایشی) و ۳ تکرار تکنیکی (آزمایشگاهی) انجام گرفت. در نهایت سنجش تغییرات بیان ژن‌ها انجام گرفت.

نتایج: افزایش بیان ژن *ZmNHX1* در بافت ریشه در کوتاه مدت و در بافت برگ در بلند مدت در لاین متحمل، و همچنین افزایش بیان ژن *ZmHKT1* در بافت ریشه در بلند مدت در لاین متحمل در مقایسه با لاین حساس احتمالاً حاکی از نقش مثبت این ژن‌ها در مقاومت به تنش شوری در ذرت می‌باشد. بیشترین میزان بیان نسبی ژن *MYB30* هم در لاین متحمل و هم در لاین حساس در بافت ریشه و در کوتاه مدت مشاهده شد و با گذشت زمان کاهش چشمگیری در بیان این ژن در هر دو لاین مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش بالقوه می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی ذرت برای تولید ارقام مقاوم به شوری مفید واقع گردد.

واژه‌های کلیدی: تنش‌های غیرزیستی، ترنسکریپتومیکس، ذرت، مقاومت به شوری، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: بنی فاطمه میر اسماعیل، درویش زاده رضا، ارزنگ سرور (۱۴۰۰) مطالعه الگوی بیان نسبی ژن‌های *ZmNHX1*

ZmMYB30 و *ZmHKT1* در ذرت تحت تنش شوری. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۳(۱)، ۱۳۷-۱۵۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production,

Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

ذرت با نام علمی *Zea mays* L. متعلق به تیره *Poaceae*، گیاهی یک‌ساله، تک پایه، دگرگشن و دیپلوئید با $2n=2x=20$ کروموزوم می‌باشد. این گیاه یک منبع غنی از روغن و پروتئین است و بین ۸ تا ۱۵ درصد از پروتئین مورد نیاز دنیا را تأمین می‌نماید (Alizadeh et al. 2009). سطح زیر کشت ذرت در دنیا و در ایران به ترتیب ۱۹۷ میلیون هکتار و ۱۹۲ هزار هکتار، و همچنین متوسط تولید آن در دنیا ۵/۹ تن در هکتار و در ایران ۷ تن در هکتار گزارش شده است (FAO 2018). شوری پس از خشکی مهم‌ترین تنش محیطی در سطح جهان است (Sadat Noori et al. 2011). آمارها نشان می‌دهند که حدود ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های دنیا تحت تنش شوری قرار دارند (Jiang et al. 2018). به عبارتی دیگر، حدود ۲۰ درصد از زمین‌های دیم و ۵۰ درصد از اراضی آبی جهان میزان نمک بالایی دارند (Yokoi et al. 2002). متأسفانه شوری خاک هنوز هم به دلیل آبیاری با آب شور در مناطق خشک و نیمه خشک، زهکشی نامناسب و ورود آب دریا در زمان جزر و مد به سطح زمین‌های نزدیک ساحل، به سرعت در حال گسترش است (Mahajan and Tuteja 2005).

تنش شوری باعث بروز تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی شده و بدین ترتیب اثرات سوء بر روی گیاه گذاشته و مانع از نمایش پتانسیل ژنتیکی گیاه به صورت کامل می‌شود (Rodríguez et al. 2005). بر اساس مطالعات قبلی تنش شوری یک تنش چند جانبه است. غلظت بالای نمک باعث ایجاد تنش اسمزی و تنش یونی می‌شود که عمدتاً به خاطر غلظت بالای یون سدیم است (Gupta and Huang 2014). تنش اسمزی جذب آب توسط ریشه‌های گیاه را کاهش می‌دهد که نتیجه آن اختلالات فیزیولوژیکی مختلف از جمله کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است (Munns and Tester 2008). تنش یونی نتیجه افزایش جذب یون‌ها؛ عمدتاً سدیم و کلر است که منجر به آسیب‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شود. غلظت درون سلولی سدیم مانع جذب یون پتاسیم می‌شود که یک عنصر ضروری برای پروسه‌های سلولی مختلف است (Munns 2002). بر اساس نظر Zhu (2001) تحمل شوری در گیاهان بستگی به ارتباط میان مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی دارد که در سم‌زدایی، ایجاد تعادل یونی و تنظیم رشد دخیل هستند. ابتدا، افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و تجمع اسمولیت‌ها و پروتئین‌های مختلف، باعث دفع ترکیبات ROS از گیاه شده و تا حدی سبب بهبود خسارت‌های ناشی از تنش شوری می‌شود. همزمان تعادل یونی از طریق کده‌گذاری یون‌ها به داخل واکوتل برقرار می‌شود. سرانجام القاء بیان ژن‌های مختلف منجر به حفظ رشد گیاه و عملکرد آن می‌شود.

ذرت با آستانه تحمل به شوری ۱/۷ دسی‌زیمنس بر متر (ds/m) جزء گیاهان نیمه حساس به شوری است (Mass 1986). بررسی بیان ژن‌های دخیل در پاسخ ذرت به تنش‌های غیر زیستی اطلاعات مهمی برای مهندسی ژنتیک ذرت در جهت افزایش تحمل به تنش‌های محیطی فراهم می‌نماید (Hoang et al. 2014). با وجود پیشرفت‌های علمی هنوز مکانسیم‌های مولکولی و بیوشیمیایی پاسخ گیاه به تنش شوری مخصوصاً در بلند مدت به طور کامل شناخته نشده است و بایستی آزمایشات متعددی در این باره انجام شود تا به اطلاعات کاملی دسترسی پیدا نمود (Razavi et al. 2005). کانال‌های سدیم-پتاسیم نقش مهمی در تحمل

گیاه در برابر تنش شوری از طریق تبادل یون‌های سدیم با یون‌های هیدروژن در غشاء پلاسمایی و واکنش دارند. با انتقال Na^+ به واکنش اثرات مخرب Na^+ در سیتوزول کاهش یافته و همچنین با استفاده از همان Na^+ تعادل اسمزی حفظ می‌شود، بنابراین افزایش جذب آب و تحمل به نمک در گیاهان افزایش می‌یابد (Bhaskaran and Savithamma 2011). در این رابطه دو ژن ترانسپورتر *NHX1* و *HKT1* در انتقال و تعدیل سدیم در شرایط تنش شوری نقش مهمی دارند. از طرف دیگر فاکتورهای رونویسی همچون خانواده *MYB* در تحریک و تغییر بیان ژن‌های عملکردی طی تنش‌های محیطی نقش مهمی ایفا می‌نمایند.

در اواخر دهه ۸۰ میلادی در پی مطالعات و بررسی‌های مختلف روشن شد که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidi Nejad 2017). ماده ژنتیکی^۱ یک سلول شامل تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi Nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که ارگانیسم در آن رشد می‌کند دیکته می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E. coli* کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از کل ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی در عصر پساژنومی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016). همچنین اطلاعات به دست آمده از تحلیل داده‌های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (Hadizadeh et al. 2014; al. 2013). تا بحال مطالعات اندکی در رابطه با بیان ژن‌های *ZmNHX1* و *ZmHKT1* و *ZmMYB30* در ذرت در شرایط تنش شوری انجام گرفته است. در این مطالعه تغییرات بیان ژن‌های فوق در دو لاین متحمل و حساس به شوری، طی دو زمان کوتاه مدت و بلند مدت در ذرت بررسی شده است.

^۱DNA

مواد و روش‌ها

بر اساس بررسی‌های اولیه ۹۳ لاین ذرت تحت شرایط نرمال و تنش شوری ۸ ds/m (نتایج منتشر نشده)، لاین متحمل به تنش شوری P14L2، و لاین حساس به شوری MO17 انتخاب شدند. خصوصیات آگروبیولوژیک این لاین‌ها در جدول ۱ آورده شده است. بذره‌های دو لاین متحمل و حساس ذرت در سال ۱۳۹۸ در گلدان‌های پلاستیکی (قطر دهانه ۱۷/۵ سانتی‌متر، قطر کف ۱۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵/۵ سانتی‌متر) حاوی پرلیت و پیت‌ماس با نسبت دو به سه در شرایط کنترل شده اتافک رشد کشت شدند و از محلول هوگلند با pH= ۵/۹ جهت تغذیه و آبیاری گیاهان استفاده گردید. در مرحله هشت برگی به نصف گلدان‌ها تنش شوری ۸ ds/m از منبع NaCl (شرکت Merck آلمان) بصورت سری اعمال گردید، به این صورت که جهت جلوگیری از وارد آمدن تنش ناگهانی به گیاهان، ابتدا تنش شوری با غلظت‌های ۵ ds/m، ۶ ds/m و ۷ ds/m به مدت سه روز به گلدان‌ها اعمال شد و در روز چهارم غلظت ۸ ds/m به طور ثابت و به مدت ۷ روز اعمال گردید. نصف دیگر گلدان‌ها که به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند، با آب معمولی (محلول هوگلند) آبیاری شدند. سپس در زمان‌های ۲۴ ساعت و ۷ روز پس از اعمال آخرین مرحله تنش شوری، نمونه‌برداری از ریشه و برگ گیاهان در ازت مایع انجام گرفت و نمونه‌ها بلافاصله به یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

استخراج RNA: جهت استخراج RNA از محلول RNX-PLUS طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناکلون، ایران) با اندکی تغییرات استفاده شد. برای اطمینان از صحت استخراج RNAها بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند (شکل ۱). همچنین جهت سنجش کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ^۲ استفاده شد و جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر ثبت گردید و با توجه به داده‌های حاصل از نانودراپ رقیق سازی RNAها انجام گرفت.

سنتز cDNA: جهت سنتز cDNA از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (#K1621, Thermo Scientific, USA) استفاده شد.

در لوله استریل ۰/۲ میلی‌لیتری، به مقدار ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز ریخته شد. سپس ۶ میکرولیتر RNA استخراج شده و ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dT (Oligo dT₁₈) به آن اضافه گردید. پس از انجام یک سانتریفیوژ پالسی، لوله حاوی مواد به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفت. پس از سرد کردن لوله حاوی مواد روی یخ، یک ورتکس نرم (ورتکس با زمان کوتاه و دور کند) انجام گرفت. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش ۵X، ۱ میکرولیتر آنزیم RiboLock™ RNase Inhibitor (۲۰ واحد در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار) و ۱ میکرولیتر آنزیم RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) به لوله حاوی مواد اضافه شد. بعد از انجام سانتریفیوژ پالسی، لوله حاوی مواد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲°C و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C قرار داده شد. پس از ساخت cDNA واکنش‌های کنترل مثبت و منفی به منظور بررسی صحت ساخت cDNA و عدم وجود آلودگی‌های ژنومی در نظر گرفته شد.

²NanoDrop Spectrophotometer

جدول ۱. خصوصیات آگروبیولوژیک دو لاین ذرت تحت شرایط نرمال و تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر

Table 1. Agro-biological characteristics of the maize lines under normal and 8 ds/m salt stress conditions

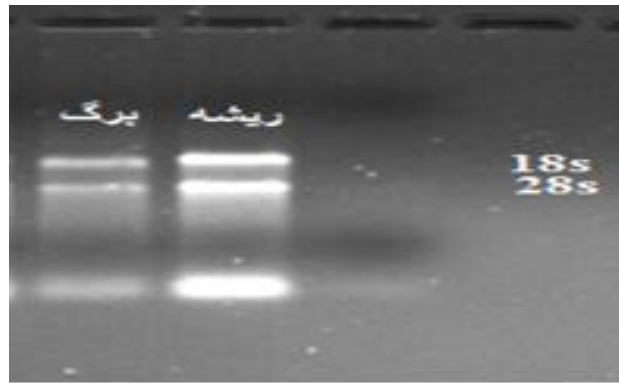
عرض برگ			طول برگ			ارتفاع بوته			قطر ساقه			واکنش لاین به تنش شوری		شماره لاین Line No.
Leaf Width (cm)			Leaf Length (cm)			Plant Height (cm)			Stem Diameter (cm)			Stress condition (ds/m)		
D	Se	Mean	D	Se	Mean	D	Se	Mean	D	Se	Mean	Line reaction to salt stress		
2.56	0.05	5.20	-5.91	0.16	31.00	29.82	0.32	145.33	0.91	0.002	2.20	0	Tolerant	10 (P14L2)
	0.05	5.33		0.61	32.83		1.11	188.67		0.002	2.18	8		
2.44	0.01	4.10	26.20	0.09	31.17	32.26	1.10	155.00	10.48	0.009	2.00	0	Sensitive	46 (MO17)
	0.02	4.20		0.33	23.00		1.59	105.00		0.010	1.79	8		

ادامه جدول ۱.

Table 1. Continue

محتوای نسبی آب برگ			عملکرد دانه			شرایط تنش		واکنش لاین به تنش شوری		شماره لاین Line No.	
K ⁺ /Na ⁺			Relative water content (RWC; %)			Grain yield (g)			Stress condition (ds/m)		
D	Se	Mean	D	Se	Mean	D	Se	Mean	Line reaction to salt stress		
1.81	0.84	41.46	13.32	0.69	79.25	0.22	1.53	270.75	0	Tolerant	10 (P14L2)
	0.56	40.71		1.27	68.69		3.00	270.17	8		
42.19	0.37	53.63	0.11	0.30	80.74	47.15	3.64	156.80	0	Sensitive	46 (MO17)
	1.07	31.00		0.59	80.66		0.54	82.87	8		

$$D = \frac{\bar{X}_{Normal} - \bar{X}_{Stress}}{\bar{X}_{Normal}} \times 100, \text{ Se: Standard error, cm: Centimeter, g: gram, K}^+/\text{Na}^+: \text{Pottasium ion/Sodium ion ratio.}$$



شکل ۱. نتایج الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد برای RNA استخراج شده از ریشه و برگ گیاه ذرت

Figure 1. Electrophoresis results of RNA, extracted from root and leaf of maize on agarose gel (1%)

طراحی آغازگر: توالی نوای کدکننده ژنهای *ZmMYB30* و *ZmHKT1*، *ZmNHX1* از پایگاه اطلاعاتی NCBI

با شماره دسترسی به ترتیب NM_001148643.2، XM_008674901.3 و NM_001196699.1 ذخیره شده و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزارهای Oligo7 و Gene Runner طراحی شدند. جهت اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرها، بلاست آن‌ها در مقابل توالی‌های نوکلئوتیدی در سایت NCBI انجام شد (Primer-blast). طراحی آغازگرها به نحوی انجام شد که حداقل یکی از دو آغازگر رفت یا برگشت در نوای اگزون پیشین- اگزون پسین قرار گیرد تا از تکثیر غیراختصاصی ناشی از آلودگی‌های ژنومی جلوگیری شود (جدول ۲).

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در زمان واقعی برای بررسی

تغییرات نسبی بیان ژن‌ها تحت تنش شوری در لاین‌های ذرت

Table 2. Characteristics of the primers used in the real time PCR for studying the relative expression of genes in maize lines under salt stress conditions

نام ژن Name gene	شماره دسترسی Accession number	دمای اتصال (°C)	آغازگر رفت (5'→3')	آغازگر برگشت (5'→3')
		Annealing temperature (C)	Forward primer (5'→3')	Revers primer (5'→3')
<i>ZmHKT1</i>	XM_008674901.3	63	CTGGACAATCTGCTCATGTTCG	CTCTCGGTGATGCAGATGACG
<i>ZmMYB30</i>	NM_001196699.1	56	GAGTTCCTGTTGATGATGCA	TTCGTTGTCTTGGTCTTGGA
<i>ZmNHX1</i>	NM_001148643.2	60	ATGCAGGGTTCCAAGTGAAG	AATATTGCCCAAGTGCAAG
<i>Actin</i>	NM_001154731.2	61	CTGAGGTTCTATTCCAGCCATC	CCACCACTGAGGACAACATTAC

جدول ۳. مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها تحت تنش شوری در ذرت

Table 3. Material used in the real time PCR for studying the relative expression of genes in maize under salt stress

Reaction materials مواد واکنش	مقدار ماده مورد استفاده در واکنش The amount of material used in the reaction
Water, nuclease-free	4 µl
Forward primer	0.5 µl
Reverse primer	0.5 µl
Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix	6.25 µl
cDNA*	1.25 µl
Total	12.5 µl

*غلظت استوک نمونه‌های cDNA ۵۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود.

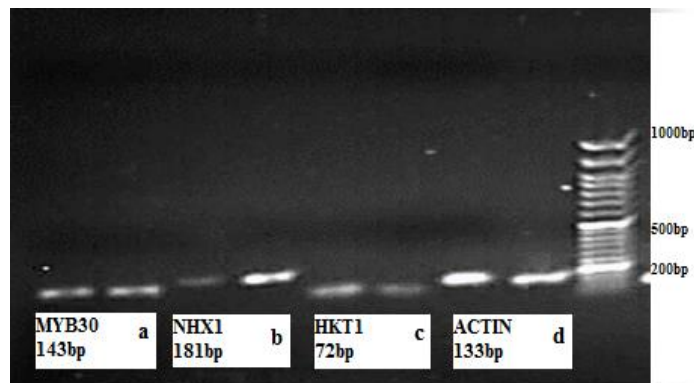
*The stock concentration of cDNA samples was 500 ng/ul.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Real time PCR): پس از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مجازی و

انجام تست برای هر یک از آغازگرها و اطمینان از صحت تکثیر محصول مورد نظر با الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر TBE ۰/۵ برابر در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۱/۵ ساعت و رنگ آمیزی ژل‌های الکتروفورز با اتیدیوم بروماید (شکل ۲)، time PCR real با استفاده از کیت (Maxima SYBR Green/Fluorescence qPCR Master Mix (2x) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر (جدول ۳)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده (فرمنتاز، آلمان) توسط دستگاه Rotor gene Q-Pure Detection –Qiagen مدل ۶۰۰۰ (شرکت کیاژن، آمریکا) انجام شد. از ژن اکتین به عنوان ژن مرجع (کنترل داخلی) جهت نرمال‌سازی بیان ژن‌ها استفاده شد. پس از انجام real time PCR، منحنی ذوب^۳ برای هر کدام از ژن‌ها با افزایش دما در هر ثانیه به اندازه ۰/۵ درجه سانتی‌گراد از ۴۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد، رسم شد و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب مربوط به هر ژن تایید شد (شکل ۳). توجه به این نکته ضروری می‌باشد که پیک‌های اضافی در منحنی ذوب همیشه نشان‌دهنده اختصاصی عمل نکردن واکنش تکثیر نیست. اگرچه به طور معمول فرض می‌شود که یک رابطه تناهنگ بین تعداد پیک‌ها و تعداد محصولات حاصل از تکثیر وجود دارد، اما بعضی وقت‌ها نحوه توزیع بازهای گوانین-سیتوزین در طول توالی باعث تولید دامنه‌های

³Melting curve

مختلف ذوب می‌شود (Masooleh et al. 2018). آزمایش در ۲ تکرار زیستی (آزمایشی) و ۳ تکرار تکنیکی (آزمایشگاهی) انجام گرفت. سنجش تغییرات در بیان ژن‌ها با استفاده از روش ارایه شده توسط Livak و Schmittgen (2001) انجام گرفت.

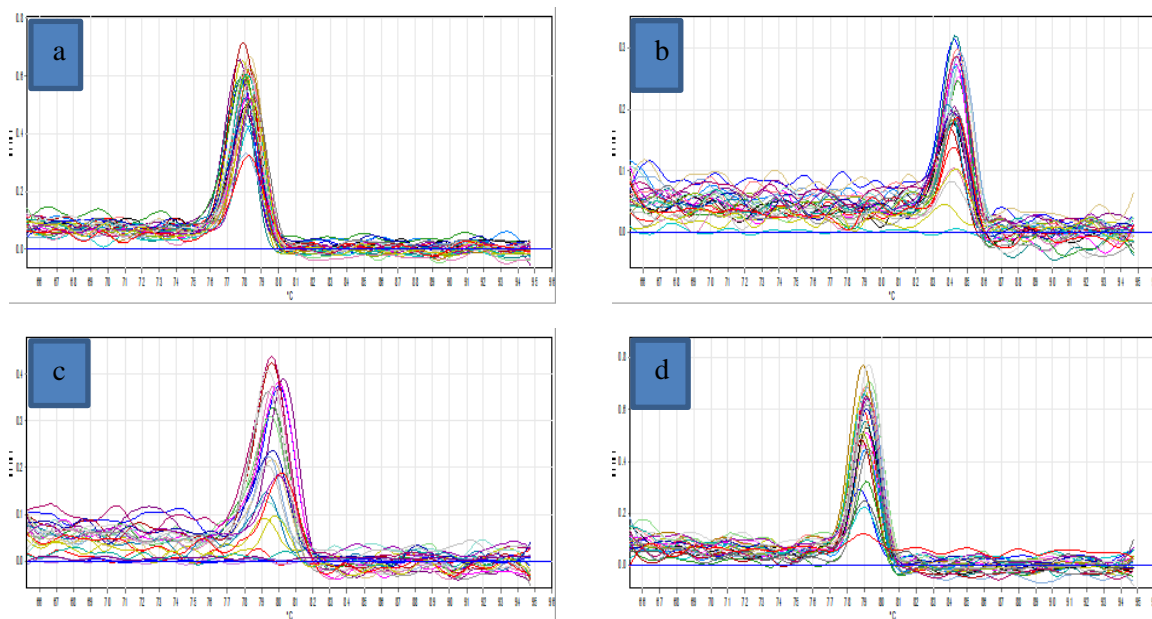


شکل ۲. نتایج الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد برای محصول PCR روی cDNA سنتز شده (a): *ZmMYB30* (b): *ZmNHX1* (c): *ZmHKT1* و (d): *Actin* ستون آخر در شکل خط‌کش مولکولی ۵۰ bp است که شامل باندهای ۱۰۰۰-۵۰ bp است (شرکت Fermentase)

Figure 2. Electrophoresis results on 1% agarose gel for the PCR product on the synthesized cDNA (a): *ZmMYB30*, (b): *ZmNHX1*, (c): *ZmHKT1* and (d): *Actin*. The last column in Figure is a molecular ruler (ladder) of 50 bp containing bands of 50-1000 bp (Fermentase Company).

نتایج و بحث

بیان نسبی ژن *NHX1*: بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌های بیان نسبی ژن *NHX1*، بجز اثر اصلی زمان و اثر دوجانبه لاین × زمان که در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) معنی‌دار بودند بقیه موارد شامل اثر اصلی لاین و بافت، اثرات دو جانبه لاین × بافت و بافت × زمان و اثر سه جانبه لاین × بافت × زمان در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بودند (جدول ۴). در بافت ریشه، بیشترین میزان بیان نسبی ژن *NHX1* در لاین متحمل در کوتاه مدت (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش) مشاهده شد. میزان بیان نسبی ژن در لاین حساس در بافت ریشه نه در کوتاه مدت و نه در بلندمدت تغییرات چندانی نداشت. در بافت برگ، بیشترین میزان بیان نسبی ژن در لاین متحمل اما در بلند مدت (۷ روز بعد از اعمال تنش) مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۳. منحنی ذوب ژن‌های (a): *ZmHKT1*, (b): *ZmMYB30*, (c): *ZmNHX1* و (d): *Actin* در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی در ذرت تحت تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر. در نمودارها محور ایکس دما (درجه سانتی‌گراد) و محور ایگرگ نسبت dF/dT به dT است که نسبت مشتق تابع فلورسنس در مقابل دمای ذوب است و نشان دهنده میزان تغییرات فلورسنس در واکنش می‌باشد.

Figure 3. Temperature melting curves of studied genes (a): *ZmHKT1*, (b): *ZmMYB30*, (c): *ZmNHX1* and (d): *Actin* in real-time PCR in *Zea mays* L. under 8 ds/m salt stress. In all curves, X-axis represents the temperature (°C) and Y-axis represents the dF/dT ratio. dF/dT ratio is the derivative of the function 'fluorescence vs. temperature melting' that represents the rate of the fluorescence variation in the reaction.

تجزیه داده‌ها: تجزیه واریانس داده‌های حاصل از میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه بر پایه طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین تیمارها آزمون SNK در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام گرفت و نمودارها با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ رسم شدند.

جدول ۴. تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در بافت‌ها و زمان‌های متفاوت در دو لاین متحمل و حساس ذرت در پاسخ به تنش شوری

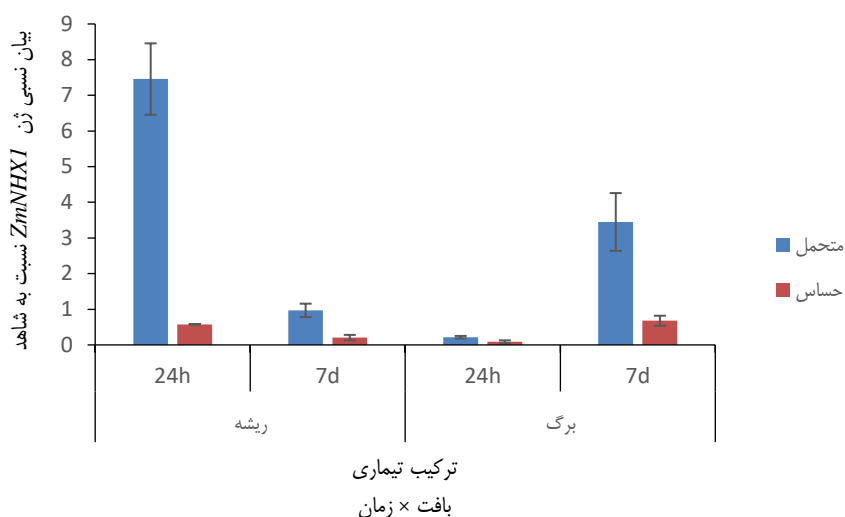
Table 4. Analysis of variance for the relative gene expression of studied genes in different tissues and times of tolerant and susceptible maize lines in response to salinity stress

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square		
		<i>ZmNHX1</i>	<i>ZmHKT1</i>	<i>ZmMYB30</i>
Tissue بافت	1	5.70**	2309.88*	200.29**
Line لاین	1	27.77**	2196.71*	12.84*
Tissue × Line بافت × لاین	1	5.61**	7597.27**	1.07 ^{ns}
Time زمان	1	2.30*	2254.60*	215.21**
Tissue × Time بافت × زمان	1	28.51**	7692.61**	107.99*
Line × Time لاین × زمان	1	3.01*	7545.96**	5.77*
Tissue × Line × Time بافت × لاین × زمان	1	19.17**	2187.12*	6.52*
Experimental error اشتباه آزمایشی	8	0.43	217.23	11.20

^{ns}، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

^{ns}, * and **: non-significant, and significant at the 5 and 1 % probability level, respectively

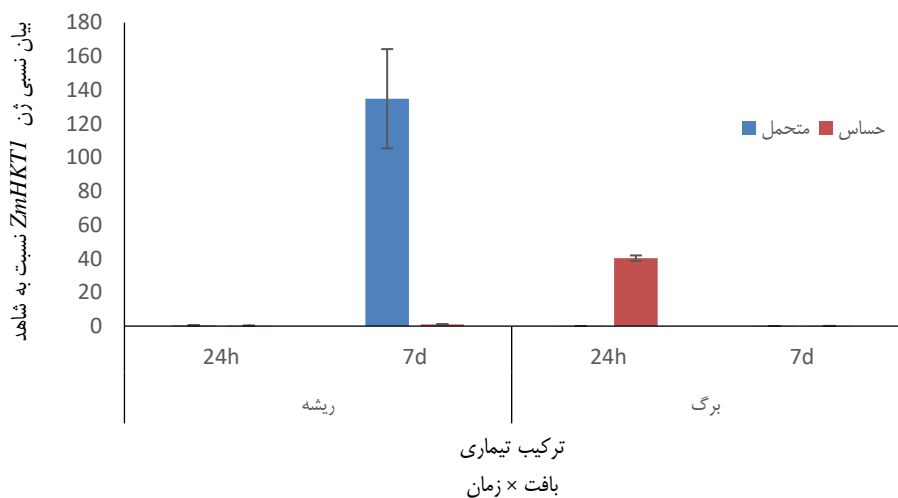
بیان نسبی ژن *HKT1* تجزیه واریانس داده‌های بیان نسبی ژن *HKT1* نشان می‌دهد تمامی اثرات اصلی و اثر متقابل سه جانبه لاین × بافت × زمان در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) و اثرات متقابل دو جانبه لاین × بافت، بافت × زمان و لاین × زمان در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) بر روی بیان ژن *HKT1* معنی‌دار می‌باشد (جدول ۴). بیشترین میزان بیان نسبی ژن *HKT1* در بافت ریشه، در لاین متحمل در بلند مدت (۷ روز بعد از اعمال تنش شوری)، و در بافت برگ، در لاین حساس در تنش شوری کوتاه مدت مشاهده شد. تغییرات بیان ژن *HKT1* در بافت ریشه لاین متحمل از کوتاه مدت به بلند مدت روندی صعودی داشت، در حالی که تغییر محسوس در بیان نسبی ژن *HKT1* در بافت ریشه لاین حساس دیده نشد. در بافت برگ لاین متحمل تغییرات بیان نسبی ژن *HKT1* محسوس نبود، اما روند بیان ژن در بافت برگ لاین حساس از کوتاه مدت (۲۴ ساعت) به بلند مدت (۷ روز) نزولی بود (شکل ۵).



شکل ۴. تغییرات بیان نسبی ژن *ZmNHX1* در بافت ریشه و برگ لاین متحمل و حساس ذرت تحت تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر ۲۴ ساعت (h) و ۷ روز (d) بعد از اعمال تنش شوری

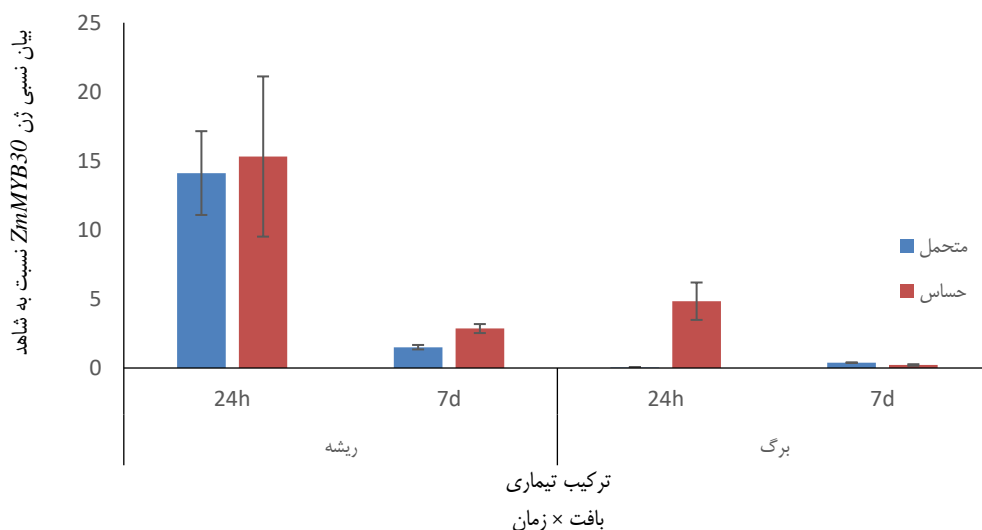
Figure 4. Variation in the relative expression of *ZmNHX1* gene in root and leaf of salt-tolerant and salt-sensitive lines of *Zea mays* L. under 8 ds/m salt stress, 24 hours and 7 days after stress applications

بیان نسبی ژن MYB30: تجزیه واریانس داده‌های بیان نسبی ژن *MYB30* نشان داد که اثر اصلی بافت و زمان در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) و اثر اصلی لاین، اثر متقابل دوجانبه بافت × زمان، لاین × زمان و اثر متقابل سه جانبه لاین × بافت × زمان در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) بر روی بیان نسبی ژن *MYB30* معنی‌دار می‌باشند (جدول ۴). میزان بیان نسبی ژن *MYB30* در بافت ریشه و در کوتاه‌مدت هم در لاین متحمل و هم در لاین حساس بیشترین مقدار را داشت ولی با گذشت زمان (۷ روز بعد از اعمال تنش شوری) کاهش در افزایش بیان ژن در هر دو لاین مشاهده شد. در بافت برگ، بیشترین افزایش بیان ژن در لاین حساس در کوتاه مدت مشاهده شد. در بلند مدت افزایش جزئی در بیان ژن در لاین متحمل در مقایسه با لاین حساس مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۵. تغییرات بیان ژن *ZmHKT1* نسبت به شاهد در بافت ریشه و برگ لاین متحمل و حساس ذرت تحت تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر ۲۴ ساعت (h) و ۷ روز (d) بعد از اعمال تنش شوری

Figure 5. Variation in the relative expression of *ZmHKT1* gene in root and leaf of tolerant and sensitive lines of *Zea mays* L. under 8 ds/m salt stress, 24 hours and 7 days after stress applications



شکل ۶. تغییرات بیان ژن *ZmMYB30* نسبت به شاهد در بافت ریشه و برگ لاین متحمل و حساس ذرت تحت تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر ۲۴ ساعت (h) و ۷ روز (d) بعد از اعمال تنش شوری

Figure 6. Variation in the relative expression of *ZmMYB30* gene in root and leaf of tolerant and sensitive lines of *Zea mays* L. under 8 ds/m salt stress, 24 hours and 7 days after stress application

در این تحقیق بیشترین میزان بیان نسبی ژن *NHX1* در بافت ریشه در لاین متحمل در کوتاه مدت (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش) مشاهده شد. در بافت برگ، بیشترین میزان بیان ژن *NHX1* در لاین متحمل اما در بلند مدت (۷ روز بعد از اعمال تنش) مشاهده شد. بیشترین میزان بیان نسبی ژن *ZmHKT1* در بافت ریشه، در لاین متحمل در بلند مدت مشاهده شد. در بافت برگ، بیشترین میزان بیان ژن *ZmHKT1* در لاین حساس و در کوتاه مدت مشاهده شد. اولین بافتی که متوجه تنش شوری می‌شود بافت ریشه است. طی مواجهه با شوری؛ گیاه با افزایش بیان ژن‌های *ZmNHX1* و *ZmHKT1* از یک طرف باعث کده‌بندی یون‌های سدیم به داخل واکوئل و از طرف دیگر پمپاژ سدیم اضافی وارد شده به سیتوپلاسم به محیط بیرون شده و بدین ترتیب ضمن بالا نگه داشتن پتانسیل اسمزی (با تجمع سدیم در واکوئل) و کمک به جذب آب توسط گیاه، آنزیم‌های داخل سلول را از آسیب‌های مخرب یون Na^+ محافظت می‌نماید. از طرفی با وجود این تدابیر ممکن است به همراه انتقال آب به سمت اندام‌های هوایی (برگ) سدیم اضافی در برگ به مرور زمان تجمع یابد که این باعث اختلال در فعالیت‌های حیاتی گیاه شود. افزایش دیر هنگام بیان ژن *ZmNHX1* در برگ لاین متحمل، بدین ترتیب احتمالاً گیاه را در مدیریت تجمع یون سدیم اضافی یاری کرده است. هرچند افزایشی در بیان ژن *ZmHKT1* در لاین حساس و در کوتاه مدت دیده می‌شود احتمالاً این ژن به تنهایی قادر به تعدیل سدیم اضافی نبوده و نتوانسته است مقاومت گیاه را به شوری افزایش دهد.

در مطالعه‌ای تغییرات بیان ژن‌های *TaHKT1*، *TaNHX1* و *TaSOS1* در گندم تحت تنش شوری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده افزایش میزان بیان نسبی ژن‌های *TaHKT1* و *TaNHX1* در ژنوتیپ متحمل هم در برگ و هم در ریشه در بلند مدت بود ولی در ژنوتیپ حساس افزایش بیان فقط در بافت ریشه و در بلندمدت دیده شد (Fakhravari 2011). ژن *AtNHX1* یک آنتی پورتر تونوپلاست Na^+/H^+ را رمزگذاری می‌کند و در جهت جابجایی سدیم به داخل واکوئل عمل می‌نماید. میل ترکیبی این ژن نسبت به سدیم بیشتر از پتاسیم است در حالیکه زیر خانواده نوع دو *AtNHX2* نسبت به هر دو عنصر واکنش یکسانی نشان می‌دهد (James et al. 2011). آنتی پورتر *ZmNHX1* به وسیله کمپلکس SOS2-SOS3 تنظیم می‌شود. این کمپلکس یکی از مسیرهای درک تنش شوری توسط گیاه می‌باشد که بوسیله افزایش کلسیم فعال می‌شود. این ژن در موقعیت دیواره تونوپلاستی سلول قرار داشته و با وارد کردن یون سدیم به داخل واکوئل از میزان سمیت آن در سلول می‌کاهد که به این عمل کده‌بندی گفته می‌شود (White and Broadley 2001). این ژن جذب پتاسیم را تسهیل می‌کند. حضور پتاسیم برای فعالیت‌های آنزیمی در داخل سلول حیاتی است، همچنین حضور پتاسیم باعث افزایش فشار اسمزی داخل سلول می‌شود (Fakhravari 2011). بیان بیش از حد آنتی پورتر *AtNHX1* به طور قابل توجهی تحمل به تنش شوری در گیاه آرابیدوپسیس را افزایش داد (Apse et al. 1999). در مطالعه‌ی Zhang et al. (2007) که برای شناسایی خصوصیات آنتی پورتر *NHX1* در گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس انجام دادند گزارش کردند که سطح رونویسی ژن *AtNHX1* در بافت ریشه‌ی گیاهان تحت تنش شوری ۴۰۰ میلی مولار طی ۶ ساعت بعد از اعمال تنش به شدت افزایش یافت، در حالیکه افزایش بیان ژن تغییرات محسوسی در اندام‌های فوقانی گیاه

نشان نداد. آنها همچنین گزارش نمودند که بیان بالای این ژن در گیاهان توتون تراریخته باعث اعطای تحمل به تنش شوری به این گیاهان شده است. از طرفی تجزیه‌ی محتوای یونی نشان داد که گیاهانی که به مدت یک ماه تحت تنش شوری بوده‌اند نسبت یونی پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) بالایی را در برگ‌ها نسبت به گیاهان تیپ وحشی دارند. نتایج مشابهی در تحقیق حاضر در رابطه با ژن *ZmNHX1* بدست آمد به طوری که بیشترین میزان بیان این ژن در کوتاه مدت در لاین متحمل و در بافت ریشه بود.

محققین زیادی نقش ژن *HKT1* را در رابطه با تحمل به تنش شوری مطالعه کرده و همگی بر نقش کلیدی آن در تعدیل تأثیر تنش شوری اتفاق نظر دارند (Munns and Tester 2008; Rus et al. 2004; Davenport et al. 2007). محصول این ژن پتاسیم را با نسبت بیشتری عبور می‌دهد. پمپ‌های سدیم-پتاسیمی در شرایط عادی سدیم و پتاسیم را به نسبت مساوی عبور می‌دهند اما در شرایط شوری این آنتی‌پورتر فقط راه بر روی سدیم باز می‌کند تا از سلول خارج شود و اجازه خروج پتاسیم از سلول را نمی‌دهد. این ژن نیز توسط کمپلکس SOS2-SOS3 تنظیم منفی می‌شود (Mahajan and Tuteja 2005). این ژن همچنین نقش اصلی در بازیابی سدیم از آوند چوبی دارد (Davenport et al. 2007). نتایج بدست آمده از مطالعه Jiang et al. (2018) بر روی اینبرد لاین‌های ذرت نشان داد بیان بالای ژن *ZmHKT1;5* در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شوری توانست از طریق حفظ تعادل بهینه‌ی نسبت یون سدیم به پتاسیم (Na^+/K^+) و نیز افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌هایی که میزان گونه‌های فعال اکسیژن را در سطح پایینی نگه می‌دارند، به طور موثری باعث افزایش تحمل این گیاهان به تنش شوری گردد و در نتیجه این گیاهان دارای رشد نرمالی بودند. آنها همچنین با توالی‌یابی ۵۴ وارسته مختلف ذرت جمع‌آوری شده از مناطق مختلف چین، دو SNP با نام‌های A134G و A511G در ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن *ZmHKT1;5* شناسایی کردند که مرتبط با تحمل به تنش شوری بودند. علاوه بر این، بیان بالای این ژن در گیاهان تراریخته توتون مقاومت بسیار بالاتری به تنش شوری نسبت به گیاهان تیپ وحشی ایجاد نمود. در مطالعه‌ی دیگری که توسط Wang et al. (2019) انجام گرفت، ژن *AtHKT1* با هدف افزایش تحمل به تنش شوری از طریق کاهش محتوای یون سدیم و بهبود نسبت یون پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) ضمن حفظ تعادل اسمزی، به سبب‌زمینی انتقال یافت. آنها با بررسی هفت لاین تراریخته سبب‌زمینی (با نام‌های T1, T2, T3, T5, T11, T13 و T15) در شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار NaCl و مقایسه‌ی آنها با گیاه شاهد غیرتراریخته مشاهده کردند که لاین‌های T3 و T13 بیشترین بیان ژن *AtHKT1* را همراه با بیشترین شاخص تحمل به تنش شوری (۶/۸ برابر گیاه شاهد) نشان دادند. لاین‌های مذکور پس از یک ماه از اعمال تنش، کمترین کاهش را در نسبت فتوستتوز خالص، هدایت روزنه‌ای و میزان تعرق نشان دادند که نهایتاً منجر به افزایش راندمان مصرف آب و کاهش افت عملکرد در این لاین‌ها شد.

میزان بیان نسبی ژن *MYB30* در بافت ریشه در کوتاه مدت هم در لاین متحمل و هم لاین حساس بیشترین مقدار را داشت. اولین بافتی که متوجه تنش شوری می‌شود بافت ریشه است به محض درک تنش، فاکتورهای رونویسی در بالادست ژن‌های عملکردی سریعاً و به مقدار زیادی بیان می‌شوند و بیان سایر ژن‌ها را کنترل می‌نمایند. فاکتورهای رونویسی جزء دسته ژن‌هایی هستند که معمولاً در تنش کوتاه مدت فعال می‌شوند و در بلند مدت روند بیان آنها کاهش می‌یابد یا بدون تغییر است (Gujjar et al.)

2020; Yoon et al. 2020; Rashid et al. 2020; Hoang et al. 2014). فاکتورهای رونویسی خانواده *MYB* از اعضای زیادی تشکیل شده که در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش مهمی ایفا می‌کنند. این ژن وابسته به هورمون ABA می‌باشد و در مسیر متابولیکی پروتئین کینازها فعال می‌شود. در واقع این مسیر یکی از مسیرهای دریافت پیام تنش می‌باشد. در ژنوم ذرت تاکنون ۷۲ پروتئین مرتبط با خانواده ژنی *MYB* گزارش شده است (Du et al. 2013). در تحقیقی Chen et al. (2017) داده‌های بدست آمده از بیان ۴۶ ژن از خانواده *MYB* در ذرت را در پاسخ به تنش‌های مختلف غیر زیستی تجزیه و تحلیل کردند. در مجموع ۲۲ ژن در پاسخ به شرایط مختلف تنش یافت شدند، که از بین آنها ۱۶ ژن به طور همزمان حداقل به دو تنش پاسخ دادند. این نتایج دلالت بر این موضوع دارد که این ژن‌ها می‌توانند در مسیر انتقال سیگنال‌های درگیر در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی شرکت نمایند. از بین این ژن‌ها، بیان ژن *ZmMYB30* افزایش چشمگیری تحت تنش شوری، خشکی و آبسزیک اسید نشان داد. Tang et al. (2019) با کلون کردن ژن *MYB6* که در اثر تنش شوری و خشکی در برنج القا شده بود به این نتیجه رسیدند که بیان بالای ژن *OsMYB6* در گیاهان تراریخته باعث افزایش مقاومت آنها به شوری و خشکی شد.

نتیجه‌گیری: در این آزمایش بیان ژن‌های *ZmNHX1* و *ZmHKT1* و *MYB30* در لاین‌های متحمل و حساس ذرت در دو سطح شوری و در دو زمان متفاوت بررسی شد. به طور کلی نتایج بدست آمده نشان داد که افزایش بیان ژن *ZmNHX1* در بافت ریشه در کوتاه مدت و در بافت برگ در بلند مدت در لاین متحمل، و همچنین افزایش بیان ژن *ZmHKT1* در بافت ریشه در بلند مدت در لاین متحمل در مقایسه با لاین حساس احتمالاً حاکی از نقش مثبت این ژن‌ها در مقاومت به تنش شوری در ذرت می‌باشد. بیشترین میزان بیان نسبی ژن *MYB30* در تنش شوری مربوط به بافت ریشه و در کوتاه مدت بود و تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بیان در لاین متحمل و حساس مشاهده نشد، و با گذشت زمان میزان بیان این ژن در هر دو لاین متحمل و حساس دارای روند کاهشی بود.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت مالی پژوهش حاضر و از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- احسنی محمدرضا؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلستاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.
- توحیدی نژاد فاطمه؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسمعیلی زاده کشکوئیه علی؛ نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن *Rheb* در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۴۹-۳۷.

جعفری دره در امیر حسین؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسمعیلی زاده کشکوئیه علی؛ ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

علیزاده حمزه علی؛ لیاقت عبدالمجید؛ عباسی فریبرز (۱۳۸۸) بررسی اثر کود آبیاری جویچه‌ای بر کارایی مصرف کود و آب، عملکرد و اجزای عملکرد ذرت دانه‌ای. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی) ۲۳(۴)، ۱۴۷-۱۳۷.

فخرآوری تهمینه (۱۳۹۰) تأثیر تنش شوری بر بیان برخی ژن‌های ناقل (*TaNHX1*, *TaHKT1*, *TaSOS1*) دخیل در ایجاد تحمل به شوری طی دوره رشد رویشی گندم نان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تحصیلات تکمیلی کرمان، ۱۰۳-۸۲.

محمدآبادی محمدرضا؛ کرد محبوبه؛ نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

هادی زاده مرتضی؛ محمدآبادی محمدرضا؛ نیازی علی و همکاران (۱۳۹۲) استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در مطالعه اگزون شماره ۲ ژن GDF ۹ در بزهای تالی و بیتال. ژنتیک نوین ۸(۳)، ۲۸۸-۲۸۳.

هادی زاده مرتضی؛ نیازی علی؛ محمدآبادی محمدرضا و همکاران (۱۳۹۳). بررسی بیوانفورماتیکی اگزون شماره دو ژن *BMP15* در بزهای تالی و بیتال. ژنتیک نوین ۹(۱)، ۱۲۰-۱۱۷.

References

- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. *Iran J Appl Anim Sci* 9, 635-642.
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 11, 135-150 (In Persian).
- Alizadeh HA, Liaghat A, Abbasi F (2009) Effect of furrow fertigation on fertilizer and water use efficiency, productivity and yield components of corn (*Zea mays* L.). *J Water and Soil* 23(4), 137-147 (In Persian).
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in Arabidopsis. *Sci* 285, 1256-1258.
- Bhaskaran S, Savithramma DL (2011) Co-expression of *Pennisetum glaucum* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter and Arabidopsis H⁺-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic tomato. *J Exp Bot* 62(15), 5561-5570.

- Chen YH, Cao YY, Wang LJ et al. (2018) Identification of *MYB* transcription factor genes and their expression during abiotic stresses in maize. *Biol Plant* 62, 222-230.
- Davenport RJ, Munoz-Mayor AJhaD, Essah PA et al. (2007) The Na^+ transporter *AtHKT1*; 1 controls retrieval of Na^+ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 30(4), 497-507.
- Du HAI, Wang YONGIN, Xie YI et al. (2013) Genome-wide identification and evolutionary and expression analyses of *MYB*-related genes in land plants. *DNA Research* 20(5), 437-448.
- Fakhravari T (2011) The effect of salinity stress on the expression of some transporter genes (*TaNHX1*, *TaHKT1*, *TaSOS1*) involved in salinity tolerance during the growing period of bread wheat. MSc Thesis, Kerman Graduate University. Pp. 82-103 (In Persian).
- FAO (2018) <http://faostat.fao.org>.
- Gujjar RS, Akhtar M, Singh M (2014) Transcription factors in abiotic stress tolerance. *Ind J Plant Physiol* 19, 306-316.
- Gupta B, Huang B (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics* 2014, 1-18.
- Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A et al. (2013) Use of bioinformatics tools to study exon 2 of *GDF9* gene in Tali and Beetal goats. *Modern Genetics* 8 (334), 283-288 (In Persian).
- Hadizadeh M, Niazi A, Mohammadabadi MR et al. (2014) Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. *Modern Genetics* 9 (1), 117-120 (In Persian).
- Hoang X, Thu N, Thao N, Tran LS (2014) Transcription factors in abiotic stress responses: their potentials in crop improvement. In: Ahmad P, Wani M, Azooz M, Phan Tran LS (eds), *Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes*. Springer, New York, NY. Pp. 337-366.
- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of *CIB4* gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. *J Rumin Res* 4, 119-132 (In Persian).
- James RA, Blake C, Byrt CS, Munns R (2011) Major genes for Na^+ exclusion, *NAX1* and *NAX2* (wheat *HKT1*; 4 and *HKT1*; 5), decrease Na^+ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *J Exp Bot* 62(8), 2939-2947.
- Jiang Z, Song G, Shan X et al. (2018) Association analysis and identification of *ZmHKT1*; 5 variation with salt-stress tolerance. *Front Plant Sci* 9, 1485.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. *Methods* 25(4), 402-408.

- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. Arch Biochem Biophys 444(2), 139-158.
- Masooleh AK, Ahmadikhah A, Saidi A (2018) Green synthesis of stable silver nanoparticles by the main reduction component of green tea (*Camellia sinensis* L.). IET Nanobiotechnol 13(2), 183-188.
- Mass EV (1986) Crop tolerance to saline soil and water. Proe. US Pak Biosaline Res. Workshop, Karachi, Pakistan, pp. 205-219.
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (in Persian).
- Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of *CIB4* gene and protein in Kermani sheep. Brazil J Med Biol Res 50, e6177.
- Mohammadabadi MR, Tohidi nejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ 25(2), 239-250.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu Rev Plant Biol 59, 651-681.
- Rashid M, Ejaz S, Shah KH (2020) Regulatory role of transcription factors in abiotic stress responses in plants. In: Hasanuzzaman M (eds), Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II. Springer, Singapore.
- Razavi K, Mohsenzadeh S, Malboobi MA (2005) Molecular aspects of osmotic stresses. Dubai: International symposium on prospect of saline agriculture in the GCC countries.
- Rodríguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O (2005) Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotecnol Apl 22(1), 1-10.
- Rus A, Lee BH, Muñoz-Mayor A et al. (2004) *AtHKT1* facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. Plant Physiol 136(1), 2500-2511.
- Sadat Noori SA, Ferdosizadeh L, Izadi-Darbandi A et al. (2011) Effects of salinity and laser radiation on proline accumulation in seeds of spring wheat. J Plant Physiol Breeding 1(2), 11-20.

- Tang Y, Bao X, Zhi Y et al. (2019) Overexpression of a MYB family gene, OsMYB6, increases drought and salinity stress tolerance in transgenic rice. *Front Plant Sci* 10, 168.
- Tohidi Nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 37-49 (In Persian).
- Wang L, Liu Y, Li D et al. (2019) Improving salt tolerance in potato through overexpression of *AtHKT1* gene. *BMC Plant Biol* 357, 1336.
- White PJ, Broadley MR (2001) Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Ann Bot* 88(6), 967-988.
- Yokoi S, Bressan RA, Hasegawa PM (2002) Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report* 23(1), 25-33.
- Yoon Y, Deok HS, Shin H, Kim HJ, Kim CM, Jang G (2020) The role of stress responsive transcription factors in modulating abiotic stress tolerance in plants. *Agron* 10, 788.
- Zhang GH, Su Q, An LJ, Wu S (2007) Characterization and expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus littoralis*. *Plant Physiol Biochem* 46(2), 117-126.
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6(2), 66-71.