تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد سیزدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۹
۱۲۴۵-۱۲۵۸
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.2295.1600

مقاله پژوهشی

آنالیز RT-qPCR برخی از اعضای خانواده ژنی *DEVIL* تحت تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl.)

سید حمیدرضا هاشمی‌پطرودی[1*]، حمیدرضا قربانی[2]

۱. استادیار گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲. استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۰۶

چکیده

DEVILها پپتیدهای کوچکی هستند که نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان داشته و در کنترل پاسخ‌های گیاه نسبت به تغییرات محیطی حاصل از تنش‌ها مؤثر می‌باشند. در این تحقیق به بررسی تغییرات بیان چهار ژن *AlDVL1*، *AlDVL2*، *AlDVL3* و *AlDVL6* به همراه ژن‌های مرجع اختصاصی بافت برگ شامل *AlGTF* و *AlU2SnRNP* و ژن‌های مرجع اختصاصی برای بافت ریشه شامل *AlPRS3* و *AlEF1a* در گیاه شورزی آلوروپوس لیتورالیس پرداخته شد. گیاهان تحت تنش شوری ۶۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و در پنج دوره زمانی صفر (کنترل)، ۳، ۶، ۴۸ ساعت و یک هفته قرار گرفتند. نتایج تحقیق نشان داد که الگوی بیانی ژن‌های *AlDVL* در اندام ریشه و برگ به شکل معنی‌داری تحت‌تأثیر تنش شوری قرارگرفته که این افزایش بیان در تمامی ژن‌ها به‌جز ژن *AlDVL6*، در اندام ریشه بیشتر از برگ گیاه بود. در بین ژن‌های موردمطالعه، بیشترین افزایش بیان برای ژن *AlDVL2* در بافت برگ در زمان ۴۸ ساعت (۱۲/۱۲) و در اندام ریشه در زمان یک هفته (۱۴/۸۳) مشاهده شد. همچنین، الگوی رفتاری ژن‌ها در بافت‌های ریشه و برگ در حالت افزایش و یا کاهش بیان نسبت به یکدیگر تفاوت داشته و وابسته به بافت بود. بررسی همبستگی بیان ژن‌ها بیانگر تغییرات الگوی رفتاری بیان ژن‌ها در بافت‌های مختلف بود به‌طوری‌که همبستگی بیان ژن *AlDVL6* و *AlDVL3* در بافت برگ و ریشه به‌صورت منفی و معنی‌دار (۰/۶-) بود که نشان‌دهنده ارتباط معکوس بیان ژن در این دو بافت بوده است. با توجه به ماهیت گیاهان شورزی در تحمل شوری محیط و نیز تغییر بیان ژن‌های موردمطالعه پس از اعمال تنش شوری، می‌توان به نقش احتمالی این ژن‌ها در افزایش قدرت تحمل گیاه اشاره نمود.

واژه‌های کلیدی: **آلوروپوس لیتورالیس، بیان ژن، پلی‌پپتیدهای کوچک، هالوفیت، هورمون گیاهی، DVL.**

مقدمه

آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) یک هالوفیت تک‌لپه چندساله ریزوم‌دار از تیره گندمیان بوده که قادر است غلظت نمک کلرید سدیم را تا ۶۰۰ میلی‌مولار (Zouari et al., 2007) الی ۱۱۰۰ میلی‌مولار (Barhoumi et al., 2007) تحمل نماید. این گیاه به‌عنوان یک علوفه طبیعی در مناطق بسیار شور و خشک (کمتر از ۲۰۰ میلی‌متر بارندگی در سال) رشد کرده و علاوه‌بر تحمل به شوری (Faraji et al., 2017)، به‌عنوان یک گیاه مقاوم در برابر خشکی، گرما و تنش‌های زنده معرفی شده است (Jam et al., 2014). آلوروپوس لیتورالیس با توجه به تحمل به شوری بالا به‌عنوان منبع ژنتیکی ارزشمندی برای درک مکانیسم‌های مولکولی پاسخ به تنش در تک‌لپه‌ای‌ها استفاده می‌شود (Saad et al., 2018).

* نگارنده پاسخگو: سیدحمیدرضا هاشمی‌پطرودی. پست الکترونیک: shr.hashemi@sanru.ac.ir

تاکنون تعداد اندکی از هورمون‌های گیاهی درگیر در مسیر رشد و توسعه گیاهان، شناسایی شده است (Vanstraelen et al., 2012). همانند سیستم پستانداران، گیاهان نیز از پپتیدهای پیام‌رسان کوچک در مدیریت فرآیندهای رشد و نمو خود، استفاده می‌کنند. این پپتیدهای پیام‌رسان کوچک با گیرنده‌های پیام‌رسان دیگر مانند گیرنده‌های کینازی مرتبط بوده، ضمن قرارگیری در سلول‌ها و بافت‌های خاص، در پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیولوژیکی گیاه نسبت به تنش‌های مختلف محیطی اعم از زیستی و غیرزیستی نقش ایفا می‌کنند (Czyzewicz et al., 2013). DEVILها (DVL) پلی‌پپتیدهای بسیار کوتاهی هستند که اولین بار توسط ون و همکاران (Wen et al., 2004) شناسایی‌شده و تاکنون این دسته از پلی‌پپتیدهای کوچک فقط در نهاندانگان گزارش‌شده‌اند. آنالیز همولوژی بر مبنای تشابه توالی در گیاه آرابیدوپسیس، منجر به شناسایی ۲۲ عضو از خانواده ژنی DVL در ژنوم این گیاه شده است (Wen et al., 2006). این پپتیدها در فرآیند رشد گیاهان همانند هورمون‌های گیاهی عمل کرده و به‌عنوان هورمون‌های پپتیدی نام‌گذاری شده‌اند (Matsubayashi, 2014; Andrews et al., 2014). ازجمله این هورمون‌های گیاهی می‌توان به فیتوسولفوکین (PSK)، به‌عنوان فاکتور رشد مرتبط با تکثیر سلولی؛ RALF، به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد ریشه؛ CLV3، مرتبط با تمایز سلول‌های بنیادی؛ LUREها، دخیل در رشد لوله گرده؛ استوماگن مرتبط با نمو روزنه‌ها؛ و درنهایت به CIF، عامل یکپارچگی نوار کاسپاری اشاره نمود (Nakaminami et al., 2018).

شواهد دلالت بر این داشته که پلی‌پپتیدهای کوچک، به‌عنوان عناصر حیاتی ارتباطات سلولی در گیاهان، نقش ایفا می‌نمایند. پس از تعیین خصوصیات سیستمین گوجه‌فرنگی، اولین هورمون پلی‌پپتیدی گیاهی شناسایی‌شده (Pearce et al., 1991) هفت گروه دیگر از پلی‌پپتیدهای پیام‌رسان کوچک در گیاهان کشف‌شده‌اند. در اندک مطالعات صورت گرفته در خصوص بررسی عملکردی این پروتئین‌ها، کارکرد آن‌ها در مراحل مختلف رشد و نمو نیز موردبررسی قرار گرفته است. به‌عنوان‌مثال، می‌توان به بیش بیان شش ژن RTFL در آرابیدوپسیس اشاره کرد که با بروز فنوتیپی گرد شدن برگ و ریشه‌های اولیه کوتاه‌تر همراه بوده است (Guo et al., 2015). همسانه‌سازی مولکولی (DVL1 پلی‌پپتید ۵۱ آمینواسیدی) و بیش‌بیانی آن در اندام‌های هوایی گیاه آرابیدوپسیس سبب بروز فنوتیپ برگ‌های گرد، گل‌آذین‌های خوشه‌ای و میوه‌هایی با انتهای برآمده در طی دوره رشد شده است که حاکی از گستردگی عملکرد اعضای این خانواده ژنی است (Wen et al., 2004). در مطالعه دیگری که توسط ناریتا و همکاران (Narita et al., 2004) در خصوص تعیین خصوصیات ژنی اعضای خانواده ژنی RTFL/DVL در گیاه آرابیدوپسیس انجام شد، عملکردی مشابه با ژن DVL1 مشاهده شد که با عنوان ROTUNDIFOLIA4 (ROT4) نام‌گذاری گردید. در حال حاضر ۲۲ همولوگ شناسایی شده از ژن‌های DVL1 و ROT4 در ژنوم آرابیدوپسیس، در قالب یک خانواده تجمیع و با عنوان RTFL/DVL نام‌گذاری شده‌اند (Valdivia et al., 2013). پپتیدهای RTFL/DVL، دارای یک ناحیه حفاظت‌شده رایج ۳۰ آمینواسیدی در ناحیه نزدیک انتهای کربوکسیلی (RTF domain) می‌باشند (Narita et al., 2004). پپتیدهای کوچک پیام‌رسان که در اندازه، ۵ تا ۷۵ آمینواسید می‌باشند، به دو گروه: پپتیدهای سرشار از اسیدآمینه سیستئین (CRP) و پپتیدهای تغییریافته پس از ترجمه پروتئین (PTM) تقسیم‌بندی می‌شوند (De Coninck et al., 2016). در میان گروه‌های پلی‌پپتیدی کوچک پیام‌رسان، گروه اول از بیشترین فراوانی برخوردار بوده و تقریباً ۲ درصد از ژن‌های بیان‌شده موجود را شامل می‌شود (Silverstein et al., 2007). اگرچه ترکیب آمینواسیدی پپتیدهای غنی از سیستئین به‌طور گسترده در میان جمعیت‌ها و گونه‌های گیاهی متفاوت است، ولی پپتیدهای غنی از سیستئین در سه خصوصیت اندازه کوچک (کمتر از ۱۶۰ آمینواسید)، وجود یک پپتید پیام‌رسان محافظت‌شده در ناحیه انتهای آمین و وجود یک ناحیه غنی از سیستئین (دارای ۴-۱۶ اسیدآمینه سیستئین) در ناحیه انتهای کربوکسیلی، مشترک هستند (Marshall et al., 2011). پپتیدهای PTM عمدتاً دارای حداکثر ۲۰ اسیدآمینه بوده که تغییرات مختلف پس از ترجمه مانند گلیکوزیله شدن هیدروکسی پرولین، سولفاته شدن تیروزین و هیدروکسیلی شدن پرولین را متحمل می‌شوند (De Coninck et al., 2016).

تاکنون تحقیقات کمی در خصوص نقش و کارکرد اعضای خانواده ژنی DVL در تنش‌های زیستی و غیرزیستی صورت گرفته است که عمدتاً معطوف به دیگر خانواده‌های پلی‌پپتیدهای کوچک می‌شود. به‌عنوان‌مثال می‌توان به ژن CEP3 اشاره نمود که به‌عنوان یک کاهنده رشد در پاسخ به

تنش‌های محیطی عمل می‌نماید (Delay et al., 2013). در تحقیقی دیگر، جهش‌یافته حاصل از خاموشی ژن CEP3 در مقایسه با تیپ وحشی گیاه آرابیدوپسیس (WT)، در شرایط نرمال محیطی باعث افزایش قابل‌توجهی در رشد ریشه و ساقه گردید (Delay et al., 2013). در گیاه آرابیدوپسیس در شرایط تنش شوری، پپتید غنی از سیستئین AtCAPE1 با کاهش بیان ژن‌های متحمل به شوری (تنظیم منفی) ایفای نقش نمود (Chien et al., 2015). درنهایت، می‌توان به شناسایی پپتید کوچک القاء کننده تحمل به خشکی اشاره نمود که توسط ژن OsDT11 کد می‌شود. این پپتید به‌عنوان یک CRP شناخته‌شده و در تحمل به تنش خشکی وابسته به ABA در گیاه برنج، نقش ایفا می‌نماید (Li et al., 2017).

بیشتر فرآیندهای بیولوژیکی مانند برنامه‌ریزی مراحل مختلف رشد و نمو، به‌واسطه کنترل دقیق بیان ژن تنظیم می‌شوند (Agarwal et al., 2008). تجزیه‌وتحلیل بیان mRNA در گستره ژنوم نشان می‌دهد که سطوح بیانی ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی تغییر نموده، به‌صورت افزایش و یا کاهش بیان بروز می‌نماید (Rabbani et al., 2003). در برخی موارد نیز تغییرات رخ‌داده در بیان ژن‌ها و یا مسیرهای خاص می‌تواند منجر به سازگاری ژنوتیپ‌های زراعی مختلف نسبت به تنش‌های غیرزیستی شود (Aglawe et al., 2012). برای درک بهتر این فرآیندها، مطالعه الگوهای بیان ژن، بسیار ضروری است. تجزیه‌وتحلیل بیان ژن، جزء جدانشدنی مطالعات ژنومیکس عملکردی در همه موجودات زنده به شمار می‌رود. به‌طوری‌که اختراع و معرفی تکنیک PCR کمی (RT-qPCR)، سبب انقلابی در روش‌های بیولوژی مولکولی، خصوصاً مطالعات بیان ژن شده است. از مهم‌ترین مزیت‌های این تکنیک می‌توان به حساسیت بالا و کمیت‌سنجی دقیق آن، در قیاس با دیگر روش‌های بررسی بیان مانند نورترن بلات، سنجش محافظتی RNase و آنالیز رونوشت معکوس نیمه کمی (RT-PCR) اشاره نمود (Jain et al., 2006). بررسی منابع در خصوص بررسی بیان ژن‌های خانواده RTFL/DVL در تنش‌های زیستی و غیرزیستی، حاکی از عدم وجود تحقیقات کافی و گسترده در این زمینه بوده است. بررسی تحقیقات در گیاه آلوروپوس نشان می‌دهد تاکنون جنبه‌های مختلفی از این گیاه ازجمله فیزیولوژیکی (Barhoumi, 2019)، آناتومی (Barzegargolchini et al., 2017)، مورفولوژیکی و پارامترهای رشدی ((Gulzar et al., 2003)، پروتئوم (Azri et al., 2016)، اپی‌ژنتیکی (Hashemipetroudi et al., 2014)، بیوشیمیایی (Modarresi et al., 2012)، بررسی بیان (Hashemipetroudi et al., 2016a)، جداسازی EST (Fatemi et al., 2019) موردبررسی قرار گرفته‌اند. هدف از اجرای این تحقیق بررسی سطح بیان رونوشت گروه ژنی DVL در گیاه هالوفیت *A. littoralis* و مقایسه الگوی بیان آن‌ها تحت تنش شوری و کنترل به روش RT-qPCR است. با توجه به همولوژی بالای اعضای این خانواده ژنی نسبت به یکدیگر، به‌منظور برآورد میزان اختصاصیت و تشابه عملکردی این ژن‌ها (به لحاظ بیان رونوشت) در بافت خاص نیز، بررسی بیـان این ژن‌ها به‌طور جداگانه در دو بافت برگ و ریشه مدنظر است.

مواد و روش‌ها

اعمال تنش شوری

با توجه به مطالعات انجام‌شده قبلی (Hashemipetroudi et al., 2012)، نمونه‌های کلون آلوروپوس لیتورالیس استفاده گردید. کشت نمونه‌های کلن در شرایط دمای ۳±۲۵ و دوره نوری (۸ ساعت تاریکی / ۱۶ ساعت روشنایی) و شدت نوری ۱۰۰ µmol m-2 S-l صورت گرفت. سپس نمونه‌های کلون‌شده به محلول هوگلند منتقل و پس از دو ماه، تنش شوری (کلرید سدیم) به‌صورت تدریجی (اضافه نمودن ۱۰۰ میلی مولار نمک به ازای هر ۳ روز) تا غلظت نهایی ۶۰۰ میلی‌مولار برای گیاه کامل اعمال گردید. ازآنجایی‌که در خصوص زود/دیر پاسخگو بودن این ژن‌ها اطلاعاتی در دسترس نیست. نمونه‌برداری از بافت برگ و ریشه، در زمان-های صفر، ۳، ۶، ۴۸ ساعت و یک هفته پس از رسیدن به غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار انجام شد. نمونه‌ها برای مراحل بعدی در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA کل از بافت برگی و ریشه (۳ تکرار بیولوژیکی) با استفاده از کیت تریزول (Threezol, Riragene) انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA به‌ترتیب با روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد صورت گرفت. جهت حذف DNA ژنومی از تیمار *DNase I* (*DNase* I RNase-free, Thermo Scientific) استفاده شد. پس از ترکیب نمودن RNA

تکرارهای بیولوژیک، سنتز cDNA به‌وسیله کیت شرکت کیاژن (QuantiTect, Qiagene) طبق دستورالعمل شرکت، انجام و به نسبت ۵ برابر رقیق گردید.

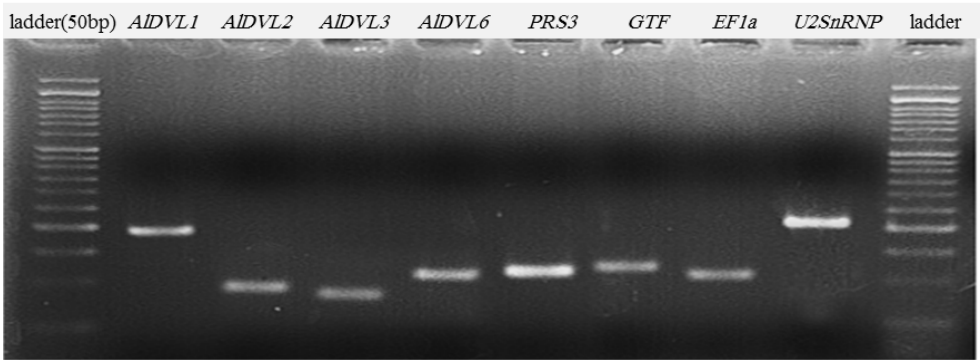
آنالیز *RT-qPCR*

طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار AlleleID انجام شد (جدول ۱). اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های هدف در دستگاه Bio-Rad, CFX96 و با استفاده از کیت (Thermo Scientific) The Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix در سه تکرار تکنیکال صورت گرفت. چرخه دمایی مورداستفاده به‌صورت، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه در ۴۰ چرخه بوده و حداقل یک کنترل منفی (NTC) برای هر پرایمر در نظر گرفته شد. آنالیز منحنی ذوب نمونه‌ها و سیکل آستانه با نرم‌افزار CFX (Bio-Rad) محاسبه گردید. نرمال‌سازی بیان ژن‌ها به روش میانگین هندسی با استفاده از ژن‌های مرجع اختصاصی هر بافت صورت گرفت. انتخاب ژن کنترل داخلی مناسب، در مطالعات تعیین بیان ژن بسیار ضروری بوده و انتخاب این ژن‌ها باید به‌گونه‌ای باشد که کمترین میزان تغییرات بیان ژن را در شرایط مختلف تنش (بافت‌ها یا زمان‌های مختلف) نشان دهند (Qi et al., 2010). در این مطالعه با توجه به تحقیقات پیشین، از دو ژن مرجع برای هر بافت استفاده گردید. ژن‌های مرجع اختصاصی برای بافت برگ شامل *GTF* و *U2SnRNP* و ژن‌های مرجع اختصاصی برای بافت ریشه شامل *PRS3* و *EF1a* بودند (Hashemipetroudi et al., 2016b). آنالیز کمی داده‌های مربوط به میزان بیان نسبی ژن موردمطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گرفت. تجزیه واریانس مقادیر بیان ژن‌ها با استفاده از روش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی، مقایسه میانگین به روش LSD و نیز محاسبه همبستگی میان آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 انجام گرفت. نتایج آنالیز منحنی ذوب آغازگرهای موردمطالعه، نشان‌دهنده وجود تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص بوده که تأییدی بر اختصاصی بودن آغازگرهای مورداستفاده است (شکل ۲).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد مطالعه در تحقیق

Table 1. Primers sequence

نام ژن Gene name	کد دسترسی Accession No.	توالی آغازگر Primers sequence	قطعه تکثیری (bp) Amplicon size	طول آغازگر Primer length
AlDVL1	Alg2587	AGCCATCACACCACAAGT GCGGAGCAACATGACAAC	190	18 18
AlDVL2	Alg12043	ATGAAGGTTGGGAGCCAG GGCGGATGATGTAGAGCTTG	95	18 20
AlDVL3	Alg9890	AGAGCGGGTTCAGCAAG CAGGAGCATGACGACGC	90	17 17
AlDVL6	Alg2586	ATGAGGACTATGAGCCAGAG GCAGAGGAGCATGACAATG	105	20 19
PRS3	JZ191044	ATTCACTGGCTGACCGGATG GTGCCAAGGGTTGTGAGGTC	107	20 20
EF1a	EE594715	TGCTGTCGGTGTCATCAA CTTCCATCAAACGCCTCATT	97	18 20
GTF	JZ191082	TTCCAAGTGGCCATCAGGTT AAAGGGCTTCCTGCCTCTTG	108	20 20
U2SnRNP	EE594692	CGTGGATGAGATTGAGAGGAA TGGAGGACTACGGCTTCTA	199	21 19

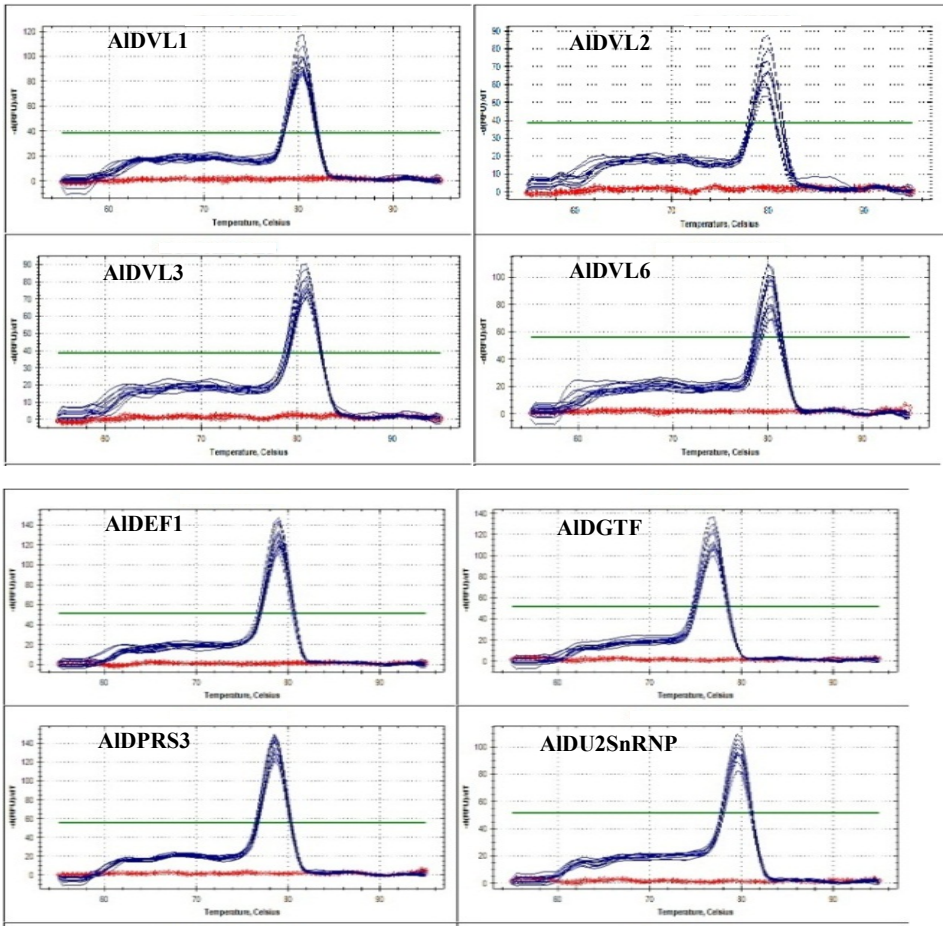


شکل ۱. شمای الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های هدف و مرجع بر روی ژل آگارز ۳ درصد.

Fig. 1. Electrophoresis profile of target and reference gene amplicons on 3% agarose gel

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های RNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، نشان داد که RNAهای استخراج‌شده از کمیت و کیفیت مناسب جهت ساخت cDNA برخوردار هستند. الکتروفورز محصول RT-qPCR بر روی ژل آگارز ۳ درصد نشان داد که تکثیر ژن موردنظر اختصاصی بوده و هیچ باند اضافی دیده نشد (شکل ۱).



شکل ۲. منحنی ذوب ژن‌های هدف و مرجع مورداستفاده در بافت‌های برگ

Fig. 2. Melting curve of the studied target and reference genes in the leave tissues

نتایج تحقیق نشان داد که الگوی بیانی ژن‌های *AlDVL1* و *AlDVL6* در اندام ریشه و برگ گیاه آلوروپوس لیتورالیس، به‌شدت تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفته و بیان ژن‌های *AlDVL* در اندام برگ، بیشتر از ریشه گیاه بود. همچنین بیان ژن‌های *AlDVL1*، *AlDVL2* و *AlDVL6* تحت تأثیر تغییر سطوح شوری و بیان تمامی ژن‌های موردمطالعه به‌جز ژن *AlDVL1* تحت تأثیر اثر متقابل بافت در مقابل سطوح شوری بوده و در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده شد (جدول ۲).

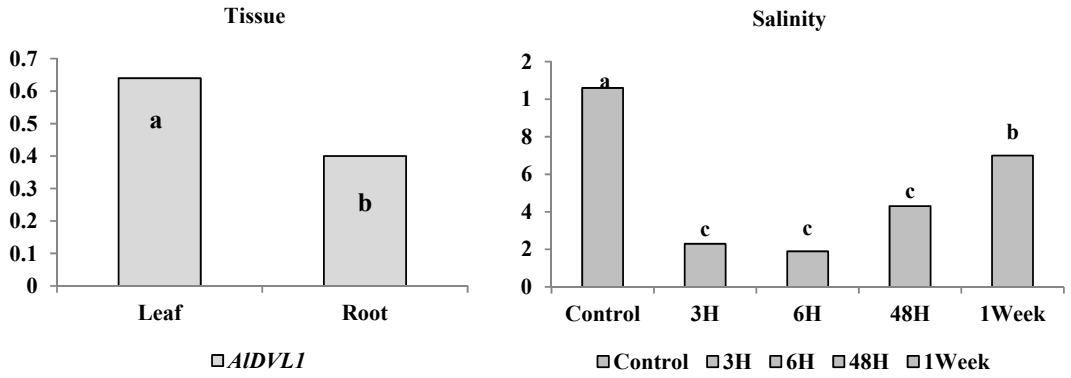
جدول ۲. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) مقادیر بیان ژن

Table 2. ANOVA (Mean of Squares) of genes expression

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی Degree of freedom	*AlDVL1*	*AlDVL2*	*AlDVL3*	*AlDVL6*
Tissue	**بافت**	1	0.42 **	4.72 ns	0.038 ns	15.62 **
Salinity	**شوری**	4	0.79 **	62.54 **	0.077 ns	0.65 *
Tissue x Salinity	**بافت در شوری**	4	0.08 ns	122.50 **	0.98 **	2.24 **
Error	**خطا**	20	0.041	5.41	0.12	0.21
C.V. (%)	**ضریب تغییرات (٪)**	-	*38.63*	*58.69*	*35.03*	*38.83*

ns، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌داری، معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد

ns, * and ** represent not significant, significant at 5% and 1% level of probability, respectively.



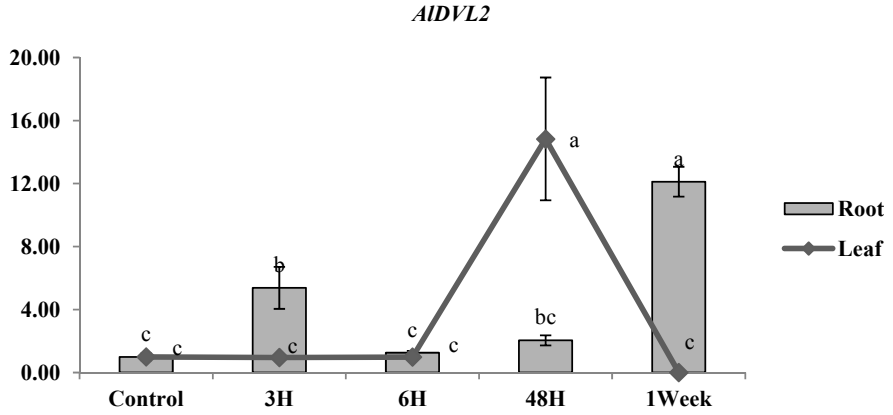
شکل ۳. الگوی بیان رونوشت ژن *AlDVL1* در دو عامل بافت و سطوح شوری.

Fig. 3. *AlDVL1* expression pattern in two factors (tissue and salinity)

سطح بیان ژن *AlDVL1* نسبت به تیمار شاهد در اندام‌های مختلف، کاهش چشمگیری نشان داد. سطح بیان این ژن در بافت برگ در زمان‌های ۳، ۶، ۴۸ ساعت و یک هفته بعد از اعمال تنش ۶۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، به‌ترتیب ۰/۲۶، ۰/۲۸، ۰/۷۵ و ۰/۸۱ برابر کمتر نسبت به تیمار شاهد و در بافت ریشه به‌ترتیب ۰/۲۰، ۰/۱۱، ۰/۱۱ و ۰/۶۰ برابر کمتر نسبت به تیمار شاهد بود (شکل ۳). در این ژن اگرچه بیان ژن کاهش یافت ولی در زمان ۴۸ ساعت و یک هفته پس از اعمال تنش، در بافت‌های موردمطالعه روند افزایشی بیان ژن مشاهده شد. این تشابه در الگوی بیان ژن بین دو بافت برگ و ریشه توسط نتایج همبستگی نیز تأیید گردید. به‌طوری‌که بیان این ژن در این دو بافت دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد (۰/۵۸) بود (جدول ۳).

ژن *AlDVL2* الگوی متفاوتی نسبت به ژن *AlDVL1* در بافت‌های مختلف داشت (شکل ۴). سطح رونوشتی این ژن در

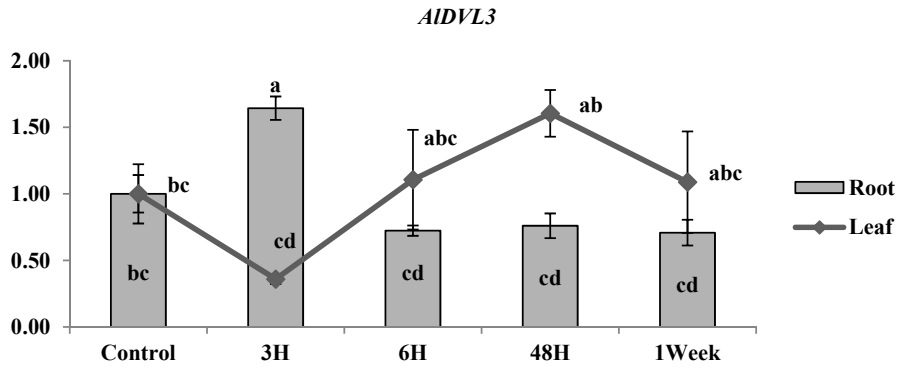
برگ در ساعات اولیه تا ۶ ساعت ثابت و بدون اختلاف معنی‌دار بود، ولی به‌طور ناگهانی و چشمگیر در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش شوری، میزان رونوشت‌های ژن در حدود ۱۴/۸۳ برابر تیمار شاهد افزایش یافت که این اختلاف ازلحاظ آماری معنی‌دار بود (جدول ۲). نکته قابل‌توجه، کاهش یک‌باره و معنی‌دار رونوشت‌های این ژن در زمان یک هفته بعد از تنش شوری است، به‌طوری‌که به میزان ۰/۰۰۱۷ برابر نسبت به شاهد کاهش یافت. در بافت ریشه تغییرات سطح رونوشتی ژن *AlDVL2* در ساعات مختلف نسبت به بافت برگ، بسیار متفاوت بود. در این بافت، ابتدا میزان رونوشت‌های ژن در زمان ۳ ساعت پس از تنش افزایش یافت (۵/۳۸ برابر تیمار شاهد) و سپس با کمی کاهش در زمان ۶ ساعت (۱/۲۶ برابر شاهد)، مجدداً روند افزایش بیان ژن در زمان ۴۸ ساعت ادامه یافت (۲/۰۵ برابر شاهد). درنهایت، میزان بیان در زمان یک هفته به حداکثر مقدار (۱۲/۱۲ برابر تیمار شاهد) خود رسید که اختلاف معنی‌داری ازلحاظ آماری با دیگر زمان‌ها داشت (جدول ۲). این در حالی بود که حداقل مقدار سطح رونوشتی در بافت برگ در زمان یک هفته پس از اعمال تنش، مشاهده شده بود.



شکل ۴. الگوی بیان رونوشت ژن *AlDVL2* در دو بافت ریشه و برگ. تیمارها شامل: شاهد، ۳ ساعت (3H)، ۶ ساعت (6H)، ۴۸ ساعت (48H) و یک هفته (1Week) بعد از تنش شوری

Fig. 4. AlDVL2 expression pattern in roots and leaves. The treatments included: control, 3 hours (3H), 6 hours (6H), 48 hours (48H) and one week after salinity stress

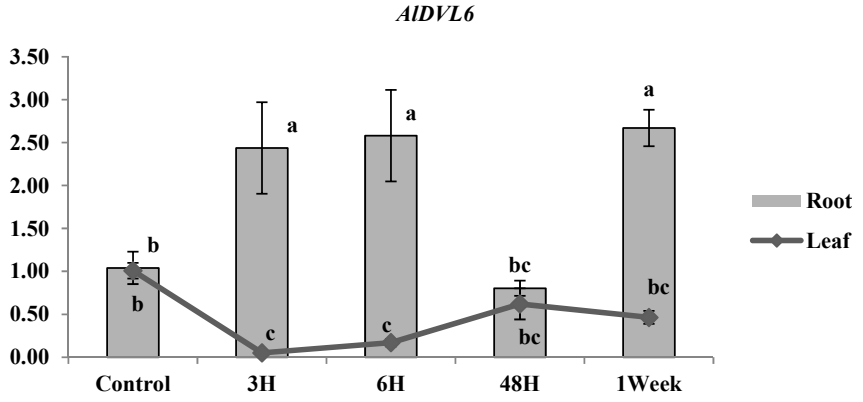
تغییرات سطح رونوشتی ژن *AlDVL3* در بافت برگ تقریباً مشابه با ژن *AlDVL2* بود (شکل ۵). در این بافت، ابتدا میزان بیان ژن *AlDVL3* نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (۰/۳۶ برابر)، درحالی‌که در ساعات بعدی تنش، روند افزایشی بیان ژن مشاهده شد. در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری، بیان این ژن به حداکثر مقدار (۱/۶۰ برابر تیمار شاهد) خود رسید و سپس تا زمان یک هفته، بیان آن به‌تدریج کاهش یافت. بیان ژن *AlDVL3* تحت تنش شوری در بافت ریشه دارای الگوی خاص خود بود. ابتدا در زمان ۳ ساعت پس از تنش، بیان ژن نسبت به تیمار شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و به حداکثر مقدار خود رسید (۱/۶۴). سپس به‌یک‌باره در زمان ۶ ساعت، میزان بیان ژن کاهش یافت (۰/۷۲ برابر شاهد) و در ساعات بعدی نیز در همین مقدار ثابت ماند. این اختلاف میان میزان بیان ژن در ساعات مختلف در بافت ریشه ازلحاظ آماری معنی‌دار بود (جدول ۳). با توجه به نتایج تحقیق حاضر، میزان همبستگی مقادیر بیان ژن *AlDVL3* در بافت برگ و ریشه در سطح احتمال پنج درصد، منفی و معنی‌دار (۰/۶-) بود که احتمالاً بیانگر ارتباط معکوس و معنی‌دار بیان ژن در این دو بافت است (جدول ۳).



شکل ۵. الگوی بیان رونوشت ژن AlDVL3 در دو بافت ریشه و برگ. تیمارها شامل: شاهد، ۳ ساعت، ۶ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته بعد از تنش شوری

Fig. 5. *AlDVL3* expression pattern in roots and leaves. The treatments included: control, 3 hours, 6 hours, 48 hours and one week after salinity stress

تغییرات بیان ژن *AlDVL6* نیز در دو بافت ریشه و برگ تحت تنش شوری، به‌صورت متفاوت و معکوس بود. در بافت برگی، شاهد کاهش بیان ژن نسبت به تیمار شاهد بودیم، به‌طوری‌که در زمان ۳ ساعت پس از اعمال تنش، بیان ژن به‌شدت کاهش یافت (۰/۰۵ برابر). ولی به‌تدریج تا زمان ۴۸ ساعت، روند افزایشی (۰/۶۲ برابر) آرامی داشت و سپس میزان بیان در یک هفته بعد از تنش مجدداً کاهش یافت. در بافت ریشه گیاه، در زمان ۳ و ۶ ساعت پس از تنش شوری، میزان بیان ژن *AlDVL6* به‌تدریج افزایش یافت (به‌ترتیب ۲/۴۴ و ۲/۵۸ برابر). در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش، کاهش چشم‌گیر و معنی‌داری در سطح رونوشت‌های ژن مشاهده شد (جدول ۲) و در زمان یک هفته به حداکثر مقدار خود (۲/۶۷ برابر تیمار شاهد) رسید. مقدار همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد (۰/۶-) بین میزان بیان ژن در دو بافت ریشه و برگ، احتمالاً نشان‌دهنده الگوی تغییر بیان متفاوت دو بافت نسبت به یکدیگر بود (جدول ۳).



شکل ۶. الگوی بیان رونوشت ژن *AlDVL6* در دو بافت ریشه و برگ. تیمارها شامل: شاهد، ۳ ساعت (3H)، ۶ ساعت (6H)، ۴۸ ساعت (48H) و یک هفته (1Week) بعد از تنش شوری

Fig. 6. *AlDVL6* expression pattern in roots and leaves. The treatments included: control, 3 hours (3H), 6 hours (6H), 48 hours (48H) and one week after salinity stress

اکثر مطالعات مربوط به پپتیدهای کوچک پیام‌رسان بر رشد و نمو گیاهان متمرکزشده، درحالی‌که تعداد اندکی از این مطالعات به نقش پپتیدهای کوچک در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پرداخته‌اند (Cui et al., 2018). پپتید محرک گیاهی به‌نام AtPep1، به‌عنوان اولین پپتید مرتبط با فرآیند دفاعی گیاه در گیاه مدل آرابیدوپسیس شناسایی شد. این پپتید به‌واسطه افزایش بیان ژن‌های دفاعی مانند *PDF1.2* و پروتئین مرتبط با پاتوژن ۱(PR1)، در پاسخ دفاعی گیاه علیه پاتوژن‌ها ایفای نقش می‌نماید (Wang et al., 2016). نتایج نورترن بلات نشان داد که اعضای خانواده ژنی DVL در بافت‌های مختلف گیاهی بیان می‌شوند (Wen et al., 2004). به‌تازگی ژن جدیدی با عنوان *OsDSSR1* در برنج شناسایی شد که کد کننده پپتید کوچک جدیدی بوده و عمدتاً در بافت‌های ریشه، ساقه، گره، برگ و خوشه بیان می‌شود. بررسی‌ها نشان داد که بیان این ژن تحت تأثیر تنش‌های خشکی، شوری، ABA و H2O2 به‌شدت افزایش یافت (Cui et al., 2018).

با توجه به نتایج آنالیز RT-qPCR می‌توان بیان داشت که ژن‌های موردمطالعه در هر بافتی به‌صورت اختصاصی عمل می‌کنند. برای مثال، ژن *AlDVL6* در بافت ریشه بیان بسیار بالاتری نسبت به بافت برگی نشان داد. همچنین در ژن *AlDVL3* در دو بافت مختلف، الگوی تغییرات بیان ژن به‌صورت معکوس و متقابل بود، به‌طوری‌که با افزایش بیان ژن *AlDVL3* در بافت ریشه در زمان ۳ ساعت اولیه، میزان بیان در بافت برگ، کاهش محسوسی نشان داد و در ادامه، با افزایش میزان بیان در بافت برگی، میزان بیان در بافت ریشه کاهش یافت. این الگوی رفتاری در نتایج بررسی همبستگی میان بیان ژن‌ها نیز به‌وضوح نشان داده شد (جدول ۳). نتایج تحقیق روی گیاه آلوروپوس با استفاده از آنالیز RNA-seq در تنش شوری در خصوص ژن *AlDVL6* بیانگر الگوی تقریباً مشابهی از کاهش بیان در بافت‌ها و تنش‌ها بود. این کاهش بیان در سطوح مختلف بافتی و تنشی، درواقع به خاموش بودن این ژن تحت تنش شوری و فعالیت آن در شرایط کنترل (بازیابی) دلالت داشت (Hashemipetroudi et al., 2019). همچنین در خصوص ژن *AlDVL2* بیان داشتند که علی‌رغم مشاهده افزایش بیان در بافت ریشه در مواجهه با تنش شوری و بازیابی، هیچ بیانی در بافت برگی مشاهده نشد. این پدیده احتمالاً می‌تواند حاکی از بیان اختصاصی آن در بافت ریشه باشد. نتایج تحقیق حاضر، نشان‌دهنده افزایش بیان ژن *AlDVL2* تحت تنش شوری در بافت ریشه و همچنین تغییرات بیان در بافت برگی بود. ون و همکاران (Wen et al., 2004) نیز با انجام آنالیزهای نورترن و PCR در زمان واقعی، به بیان ژن *DVL2* در ساقه گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش شوری اشاره نمودند.

نتایج تحقیق نشان داد که هر بافت خاص از الگوی تقریباً مشابهی در زمان‌های مختلف، تبعیت می‌کند. برای مثال، در بافت برگی در تمام ژن‌های موردبررسی، ابتدا شاهد کاهش مقدار بیان ژن‌ها در زمان اولیه (۳ ساعت پس از تنش شوری) بوده و سپس میزان بیان تا زمان ۴۸ ساعت پس از تنش افزایش و درنهایت در زمان یک هفته کاهش یافت. این الگوی تغییر در میان ژن‌های مختلف، با کمی اختلاف جزئی در بافت برگ مشاهده شد. در بافت ریشه تغییرات الگوی بیان ژن‌ها به‌جز ژن *AlDVL3*، مشابه یکدیگر بود. بدین‌صورت که از ساعات اولیه تا زمان ۴۸ ساعت پس از تنش، میزان بیان ژن روند کاهشی داشت و در حداقل مقدار قرار گرفت. درنهایت در زمان یک هفته پس از تنش، به حداکثر مقدار رسید. افزایش بیان در تمامی ژن‌ها به‌جز ژن *AlDVL6*، در اندام ریشه بیشتر از برگ گیاه بود. در بین ژن‌های موردمطالعه، بیشترین افزایش بیان برای ژن *AlDVL2* در بافت برگ در زمان ۴۸ ساعت (۱۲/۱۲) و در اندام ریشه در زمان یک هفته (۱۴/۸۳) مشاهده شد. اختصاصیت بیان ژن‌ها در بافت‌های مختلف، توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Ghorbani et al., 2017). بدین ترتیب که برخی از اعضای خانواده ARID در تمام بافت‌های گیاهی، بیان‌شده و برخی دیگر نیز اختصاصیت بالایی نسبت به بیان در بافت‌های مختلف، داشتند. تنش شوری باعث افزایش بیان ژن *AlDVL3* در ساعات اولیه تنش در بافت ریشه شد و سپس میزان بیان آن کاهش یافت. درحالی‌که نتایج بررسی بیان در روش نورترن بلات و RT-qPCR در گیاه آرابیدوپسیس، نشان‌دهنده بیان بالاتر ژن *AlDVL3* در ساقه و گل‌ها و نیز عدم بیان آن در بافت ریشه بود (Wen et al., 2004). هاشمی و همکاران (۲۰۱۹) نیز در بررسی ترانسکریپتوم آلوروپوس به روش RNA-seq، به افزایش بیان ژن *AlDVL3* در بافت برگی در هر دو تیمار تنش شوری و ریکاوری و نیز در تیمار ریکاوری در بافت ریشه اشاره داشتند. در این تحقیق، ژن *AlDVL1* در برگ‌ها بیان بالاتری نسبت به بافت ریشه داشت. ون و همکاران (Wen et al., 2004) با مطالعه روی گیاه آرابیدوپسیس نیز گزارش نمودند ژن *DVL1* در آنالیز

RT-qPCR بیانی مشابه با *DVL4* در تیپ وحشی گیاه آرابیدوپسیس داشت و در برگ‌ها نسبت به ریشه و ساقه و گل، بیان بالاتر و قابل‌توجهی نشان داد. در آنالیز نورترن بلات نیز، ژن *DVL1* در هیچ‌یک از اندام‌های موردمطالعه شناسایی نشد که بیانگر سطح پایین بیان این ژن و نیز غیرقابل‌شناسایی بودن این سطح از بیان توسط این آنالیز بود. نتایج بررسی آنالیز بیان توسط روش RNA-seq بیانگر افزایش بیان ژن *AlDVL1* تنها در بافت ریشه و شرایط بازیابی نسبت به کنترل بود (Hashemipetroudi et al., 2019).

جدول ۳- همبستگی مقادیر بیان ژن‌های موردمطالعه در بافت‌های مختلف

Table 3. Correlation coefficients among genes expression values in different tissues

		Leaf برگ				Root ریشه			
		AlDVL1	***AlDVL2***	***AlDVL3***	***AlDVL6***	***AlDVL1***	***AlDVL2***	***AlDVL3***	***AlDVL6***
برگ Leaf	***AlDVL1***	1	0.13	0.39	0.84*	0.58*	0.002	-0.39	-0.49
	AlDVL2		1	0.48	0.28	-0.39	-0.31	-0.24	-0.5*
	AlDVL3			1	0.28	-0.13	-0.23	-0.6*	-0.5*
	AlDVL6				1	0.68**	-0.21	-0.32	-0.6*
ریشه Root	***AlDVL1***					1	0.13	0.01	-0.17
	AlDVL2						1	-0.04	0.56*
	AlDVL3							1	0.07
	AlDVL6								1

** و * به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد

** and * significant in 5% and 1% respectively

نتیجه‌گیری نهایی

بسیاری از مطالعات مولکولی مربوط به مکانیسم‌های دفاعی و تنش در گیاهان، بر تنظیمات بیان ژن استوار است. مطالعات میزان بیان رونوشت به ارائه درک بهتری از پاسخ‌های گیاه به تنش، کمک می‌نماید. به‌طورکلی می‌توان اشاره نمود که در این تحقیق، تنش شوری بر فراوانی رونوشت ژن‌های موردمطالعه و همچنین میزان بیان آن‌ها تأثیر گذاشته و این تغییرات حاصل از تنش شوری در بین زمان‌های مختلف و در ژن‌های موردمطالعه ازلحاظ آماری معنی‌دار بود. الگوی تغییرات بیان ژن‌ها چه به‌صورت کاهش بیان و چه به‌صورت افزایش بیان در بافت‌های مختلف، منحصر به‌فرد بود. بدین معنی که هر بافت، تابع الگوی تقریباً مشابهی در زمان‌های مختلف بود. از طرفی با توجه به نتایج حاصل، می‌توان اظهار نمود که این ژن‌ها علاوه‌بر این‌که در زمان‌های مختلف، واکنش‌های متفاوتی را از خود بروز دادند، در بافت‌های مختلف نیز می‌توانند رفتارهای اختصاصی ارائه دهند. این ژن‌های پاسخ‌گو به تنش می‌توانند باعث افزایش دانسته‌ها و درک ما نسبت به مکانیسم‌هایی شوند که پپتیدهای کوچک از طریق آن‌ها، تحمل به تنش‌ها را در گیاهان افزایش می‌دهند.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، از محل طرح تحقیقاتی مصوب به شماره T215/96 انجام شده است که بدین‌وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H., 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Reports. 27, 617-631.

Aglawe, S., Fakrudin, B., Patole, C., Bhairappanavar, S., Koti, R., Krishnaraj, P., 2012. Quantitative RT-PCR analysis of 20 transcription factor genes of MADS, ARF, HAP2, MBF and HB families in moisture stressed shoot and root tissues of sorghum. Physiology and Molecular Biology of Plants. 18, 287-300.

Andrews, S.J., Rothnagel, J.A., 2014. Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. Nature Reviews Genetics. 15, 193.

Azri, W., Barhoumi, Z., Chibani, F., Borji, M., Bessrour, M., Mliki, A., 2016. Proteomic responses in shoots of the facultative halophyte *Aeluropus littoralis* (Poaceae) under NaCl salt stress. Functional Plant Biology. 43, 1028-1047.

Barhoumi, Z., 2019. Physiological response of the facultative halophyte, Aeluropus littoralis, to different salt types and levels. Plant Biosystems. 153, 298-305.

Barhoumi, Z., Djebali, W., Chaïbi, W., Abdelly, C., Smaoui, A., 2007. Salt impact on photosynthesis and leaf ultrastructure of Aeluropus littoralis. Journal of Plant Research. 120, 529-537.

Barzegargolchini, B., Movafeghi, A., Dehestani, A., Mehrabanjoubani, P., 2017. Increased cell wall thickness of endodermis and protoxylem in Aeluropus littoralis roots under salinity: the role of LAC4 and PER64 genes. Journal of Plant Physiology. 218, 127-134.

Chien, P.S., Nam, H.G., Chen, Y.R., 2015. A salt-regulated peptide derived from the CAP superfamily protein negatively regulates salt-stress tolerance in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany. 66, 5301-5313.

Cui, Y., Li, M., Yin, X., Song, S., Xu, G., Wang, M., Li, C., Peng, C., Xia, X., 2018. OsDSSR1, a novel small peptide, enhances drought tolerance in transgenic rice. Plant Science. 270, 85-96.

Czyzewicz, N., Yue, K., Beeckman, T., De Smet, I., 2013. Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development. Journal of Experimental Botany. 64, 5281-5296.

De Coninck, B., De Smet, I., 2016. Plant peptides – taking them to the next level. Journal of Experimental Botany. 67, 4791-4795.

Delay, C., Imin, N., Djordjevic, M.A., 2013. CEP genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. Journal of Experimental Botany. 64, 5383-5394.

Faraji, S., Najafi-Zarrini, H., Hashemi-Petroudi, S., Ranjbar, G., 2017. AlGLY I gene implicated in salt stress response from halophyte Aeluropus littoralis. Russian Journal of Plant Physiology. 64, 850-860.

Fatemi, F., Hashemipetroudi, S.H., Nematzadeh, G.A., Askari, H., Abdollahi, M.R., 2019. Exploiting differential gene expression to discover ionic and osmotic-associated transcripts in the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. Biological Procedures Online. 21, 14.

Ghorbani, H.R., Samizadeh Lahiji, H., Nematzadeh, G.A., 2017. Expression pattern analysis of transcription factors from Aeluropus littoralis in response to salt stress and recovery condition. Journal of Plant Molecular Breeding. 5, 19-30.

Gulzar, S., Khan, M.A., Ungar, I.A., 2003. Effects of salinity on growth, ionic content, and plant–water status of *Aeluropus lagopoides*. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 34, 1657-1668.

Guo, P., Yoshimura, A., Ishikawa, N., Yamaguchi, T., Guo, Y., Tsukaya, H., 2015. Comparative analysis of the RTFL peptide family on the control of plant organogenesis. Journal of Plant Research. 128, 497-510.

Hashemipetroudi, S.H., Nematzadeh, G.A., Ahmadian, G.R., Yamchi, A., Kuhlmann, M., 2016a. Expression analysis of salt stress related expressed sequence tags (ESTs) from Aeluropus littoralis by quantitative real-time PCR. Bioscience Biotechnology Research Communications. 9, 445-456.

Hashemipetroudi, S.H., Nematzadeh, G.A., Ahmadian, G.R., Yamchi, A., Kuhlmann, M., 2016b. Identification and validation of Aeluropus littoralis reference genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization. Journal of Biological Research-Thessaloniki. 23, 18.

Hashemipetroudi, S.H., Nematzadeh, G.A., Askari, H., Ghahary, S., 2014. Involvement of Cytosine DNA methylation in different developmental stages of *Aeluropus littoralis*. Journal of Plant Molecular Breeding. 2, 56-67.

Hashemipetroudi, S.H., Nematzadeh, G.A., Askari, H., Ghasemi, Y., 2012. Pattern of DNA

cytosine methylation in *Aeluropus littoralis* during temperature stress. Journal of Plant Molecular Breeding. 1, 16-24.

Hashemipetroudi, S.H., Nematzadeh, G.A., Kuhlmann, M., 2019. Identification and analysis of a DEVIL paralog gene cluster in Aeluropus littoralis by comparative genomic approach. Crop Bitechnology. 9, 79-92.

Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K., Khurana, J.P., 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications. 345, 646-651.

Jam, M., Alemzadeh, A., Tale, A.M., Esmaeili-Tazangi, S., 2014. Heavy metal regulation of plasma membrane H^+-ATPase gene expression in halophyte Aeluropus littoralis. Molecular Biology Research Communications. 3, 129.

Li, X., Han, H., Chen, M., Yang, W., Liu, L., Li, N., Ding, X., Chu, Z., 2017. Overexpression of OsDT11, which encodes a novel cysteine-rich peptide, enhances drought tolerance and increases ABA concentration in rice. Plant Molecular Biology. 93, 21-34.

Marshall, E., Costa, L.M., Gutierrez-Marcos, J., 2011. Cysteine-rich peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell–cell communication in plant reproduction and development. Journal of Experimental Botany. 62, 1677-1686.

Matsubayashi, Y., 2014. Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. Annual Review of Plant Biology. 65, 385-413.

Modarresi, M., Nematzadeh, G., Moradian, F., Alavi, S., 2012. Identification and cloning of the Cu/Zn superoxide dismutase gene from halophyte plant *Aeluropus littoralis*. Russian Journal of Genetics. 48, 118-122.

Nakaminami, K., Okamoto, M., Higuchi-Takeuchi, M., Yoshizumi, T., Yamaguchi, Y., Fukao, Y., Shimizu, M., Ohashi, C., Tanaka, M., Matsui, M., 2018. AtPep3 is a hormone-like peptide that plays a role in the salinity stress tolerance of plants. Proceedings of the National Academy of Sciences. 115, 5810-5815.

Narita, N.N., Moore, S., Horiguchi, G., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Goodrich, J., Tsukaya, H., 2004. Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. 38, 699-713.

Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A., 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. Science. 253, 895-897.

Qi, J., Yu, S., Zhang, F., Shen, X., Zhao, X., Yu, Y., Zhang, D., 2010. Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction of mRNA transcript levels in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Plant Molecular Biology Reporter. 28, 597-604.

Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. Plant Physiology. 133, 1755-1767.

Saad, R.B., Halima, N.B., Ghorbel, M., Zouari, N., Romdhane, W.B., Guiderdoni, E., Al-Doss, A., Hassairi, A., 2018. AlSRG1, a novel gene encoding an RRM-type RNA-binding protein (RBP) from *Aeluropus littoralis*, confers salt and drought tolerance in transgenic tobacco. Environmental and Experimental Botany. 150, 25-36.

Silverstein, K.A., Moskal Jr, W.A., Wu, H.C., Underwood, B.A., Graham, M.A., Town, C.D., Vandenbosch, K.A., 2007. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. The Plant Journal. 51, 262-280.

Valdivia, E.R., Hertweck, K.L., Cho, S.K., C. Walker, J., 2013. DVL/RTFL. In: Kastin, A. (ed.), Handbook of Biologically Active Peptides. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 15-19.

Vanstraelen, M., Benková, E., 2012. Hormonal interactions in the regulation of plant development. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 28, 463-487.

Wang, G., Zhang, G., Wu, M., 2016. CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli. Frontiers in Plant Science. 6, 1211.

Wen, J., Lease, K.A., Walker, J.C., 2004. DVL, a novel class of small polypeptides: overexpression alters Arabidopsis development. The Plant Journal. 37, 668-677.

Wen, J., Walker, J., 2006. DVL peptides are involved in plant development. In: Kastin, A. (ed.), Handbook of Biologically Active

Peptides. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 17-22.

Zouari, N., Saad, R.B., Legavre, T., Azaza, J., Sabau, X., Jaoua, M., Masmoudi, K., Hassairi, A., 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass Aeluropus littoralis. Gene. 404, 61-69.

University of Birjand

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences
Vol. 13, No. 4, pp. 1245-1258
Winter 2021
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.2295.1600

Original article

RT-qPCR analysis of some members of *DEVIL* gene family in *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. under salinity stress

S.H.R. Hashemi-Petroudi[1*], H.R Ghorbani[2]

1. *Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran*
2. *Assistant Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, Iran*

Received 5 March 2019; Accepted 27 June 2019

Abstract

DEVILS are small peptides that play an important role in plant growth and development and are effective in controlling plant responses to environmental changes caused by stress. In this research, expression analysis of *DVL* gene family namely *AlDVL1*, *AlDVL2*, *AlDVL3* and *AlDVL6* were investigated under salinity stress in Aeluropus littoralis, a halophyte plant, at five time-points: 0, 3, 6, 48 hours and one week. RT-qPCR normalization was conducted by two different sets of reference genes for leaf tissue (*GTF* and *U2SnRNP*) and root tissue (*PRS3* and *EF1a*). The results showed that the expression pattern of *AlDVL* genes was affected by salinity stress and had a significant change in root and leaf tissue, and gene expression changes in the root was higher than the leaf except *AlDVL6*. The highest expression of gene in the leaf tissue was observed at 48 hours (12.12) and in the root at one week for *AlDVL2* gene. Also, the gene expression pattern in root and leaf tissues was different and depended on tissue type. Correlation analysis of genes expression revealed dynamic gene expression patterns in different tissues, so that *AlDVL6* and *AlDVL3* expression correlation in both leaf and root tissues had a negative and significant relation (-0.6) with inverse effects. Considering the nature of the halophyte plants in tolerance to salt stress and the change in the expression of the genes studied after applying salt stress, the probable role of these genes in increasing plant tolerance can be mentioned.

Keywords**:** *Aeluropus littoralis,* DEVIL, Halophytes, Phytohormone, Small polypeptides

[*]Correspondent author: Seyyed Hamidreza Hashemi-petroudi; E-Mail: shr.hashemi@sanru.ac.ir.