

Evaluation of structure and expression variation of Cu/Zn SOD enzyme of *Aeluropus* and IR64 rice as an aspect of their different salinity based oxidative stress tolerance

M. Fakhrfeshani^{1*}, F.A Shahriari Ahmadi², M. Zare Mehrjerdi³, F. Keykha Akhar¹

1. Department of Genetic and plant production, Collage of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran

2. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Agriculture Faculty of Shirvan, University of Bojnord, North Khorassan, Iran

Received 4 July 2022; Accepted 24 July 2022

Extended abstract

Introduction

Among abiotic stresses, Salinity has been increasing over the time for many reasons like using of chemical fertilizers, global warming and rising sea levels. In deed salinity stress and high concentration of ions are of the most determinative factors that simultaneously affect genetical, biochemical and physiological processes of a plant. Some of plants known as halophytes have developed mechanisms that help them to avoid or tolerate the saline conditions. With the aim of understanding the probable mechanisms of saline tolerance in *Aeluropus littoralis* (as a halophyte) and the saline susceptibility of *Oriza sativa* var. IR64 (as a glycophyte), In the present study, the similarity of Cu/Zn Superoxide Dismutase (Cu/Zn SOD) gene sequences, the differential biochemical indexes such as aromatic and instability indices of them were evaluated in silico, based on amino acid composition of their Cu/Zn SOD. the gene expression pattern and fluctuation of Cu/Zn SOD as a ROS scavenger (in root and shoot) was also assessed and compared in a span of exposer time to stress and different salt concentratio

Materials and methods

The seeds of *A. littoralis* and *O. sativa* var IR64 were prepared from Center for Research of Agricultural Science and Natural Resources (CRASN) which were sown in sand as a primary culture medium, after surface sterilization. After 21 days, the seedlings that had grown uniformly were transferred to continuously aerated hydroponic pots containing Yoshida nutrient solution. we established a stress span containing short term (6 hours), mid-term (24 and 48 hours) and long term (6 and 11 days) exposure to salinity stress. the gene expression pattern and fluctuation of Cu/Zn SOD as a ROS scavenger in *Aeluropus*, was evaluated at the sampling points of 6 h/100 mM, 6 h/200 mM, 6 h/300 mM, 48 h/300 mM, 144 h/300 mM and 264 h/300 mM. the elite sampling timepoint of rice, were also 6 h/30 mM, 6 h/60 mM, 6 h/100 mM, 48 hours/100mM, 144 hours/100 mM and 264 hours/100 mM. To study the structure of genes, genomic DNAs of *A. littoralis* and *Oryza sativa* L. Var IR64 were isolated from their leaf. Amplification of Cu/Zn SOD genes was performed with specific primers designed based on NCBI sequences. Amplification of their the maximum length fragments was carried out using a hot start, high fidelity DNA polymerase. The extracted fragments were cloned using pTZ57R vector in *Escherichia coli* (DH5 α strain) and sequenced paired-end. The results were analyzed using NCBI database, and the biochemical features related to their proteins, such as isoelectric points, calculated weight, instability

* Corresponding author: Masoud Fakhrfeshani; E-Mail: Fakhrfeshani.m@jahromu.ac.ir



and aromatic indices, were analyzed Insilco using CLC Genomics Workbench 12 and Geneious Prime 2019.

Results and discussion

Comparison of the real time quantitative PCR of Cu/Zn SOD transcriptome in roots showed that Aeluropus increase the expression of these genes faster and keeps their expression in long-term while rice loses them significantly. The increased expression of Cu/Zn SOD in the roots of Aeluropus maintained but its expression in rice down regulated. rice did not show any statistically significant changes in compare to control samples and persisted in this manner until the end of investigation. But in Aeluropus, the expression showed another increase after 264 hours of being in 300mM. In the shoots of Aeluropus, the level of Cu/Zn SOD expression increased gradually and reached its highest level after 48 hours commencement of 300 mM salinity stress. While shoots of IR64 Rice did not show any statistically different expression except a very late response at 144th hour of being in 100 mM salinity stress that was only about 40 percent higher than its counterpart control samples. Analysis of amino acid sequences' indices showed that Cu/Zn SOD of Aeluropus would have a superior stability and higher aromatic value in contrast to IR64 counterpart. These indices originate from the arrangement of amino acids which they themselves are the result of nucleotide arrangement in genome.

Conclusion

The early and highly expression of Aeluropus Cu/Zn SOD gene studied in our experiment and their permanency and lasting of their activity in high concentration of salinity makes the sequence of it and its regulatory elements as a prospective candidate for future applied studies and transforming and improving salinity tolerance in many Poacea crops.

Keywords: Aromatic Index, Halophyte, Instability Index, Glycophyte, Salinity Stress, Superoxide Dismutase

بررسی تفاوت‌های ترکیب آمینواسیدی و بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز برنج و آلوروپوس به‌عنوان معیارهایی از تفاوت تحمل تنش اکسیداتیو حاصل از شوری

مسعود فخرفشانی^{۱*}، فرج اله شهریاری^۲، محمد زارع مهرجردی^۳، فاطمه کیخا آخر^۱

۱. استادیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه جهرم، جهرم

۲. استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۳. استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی شیروان، دانشگاه بجنورد، شیروان

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی: بیان ژن تنش شوری رادیکال آزاد شاخص آروماتیکی شاخص ناپایداری گلاکوفیت هالوفیت	تنش شوری و غلظت بالای یون‌ها، یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و نمو گیاهان زراعی می‌باشند. تنش شوری در واقع بروز هم‌زمان یا متوالی تنش یونی و تنش اسمزی است، در نتیجه یافتن روندهایی جهت بهبود توانایی تحمل به این تنش، در بهینه شدن دوام در هر دو شرایط اثر معناداری خواهد داشت. برخی گیاهان موسوم به هالوفیت‌ها، در برابر این تنش مجموعه‌ای از سازگاری‌ها و واکنش‌های فعال را نشان می‌دهند که موجب تحمل آن‌ها به شرایط شوری می‌شود. در این پژوهش نیز به‌منظور شناسایی تفاوت‌های احتمالی سازوکار تحمل یا حساسیت به شوری در آلوروپوس (<i>Aeluropus littoralis</i>) به‌عنوان یک گیاه متحمل) و برنج (<i>Oryza sativa</i> var. IR64) به‌عنوان یک گیاه حساس)، الگوی تغییر رونویسی ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و برخی شاخص‌های مرتبط با توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی آن در ریشه و اندام هوایی دو گیاه در شرایط تنش مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفتند. برای این هدف دوره تنشی شامل تنش‌های کوتاه‌مدت (۶ ساعت)، میان‌مدت (۲۴ و ۴۸ ساعت) و بلندمدت (۶ و ۱۱ روزه) در نظر گرفته شد. بررسی بیان ژن SOD سریع‌تر بودن شروع پاسخ و حفظ استمرار بیان آن در طول دوره تنش در آلوروپوس نسبت به برنج را نشان داد. با تعیین و بررسی توالی ژن‌های مورد مطالعه دو گیاه، علاوه بر تعیین شاخص‌های بیوشیمیایی همچون وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک سوپراکسید دیسموتازهای مورد بررسی، شاخص ناپایداری (instability index) و شاخص آروماتیکی (Aromatic index) آن‌ها نیز تعیین و مورد مقایسه قرار گرفتند که برتری آن‌ها در سوپراکسید دیسموتاز آلوروپوس نسبت به برنج IR64 مشخص شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۵	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۲	
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۳	
۶۰-۴۷ (۱): ۱۷	

مقدمه

تأمین امنیت غذایی انسان نقش دارد. در حال حاضر نیاز غذایی روزانه سه میلیارد انسان به‌طور مستقیم به برنج وابسته است که این تعداد در سال ۲۰۵۰ به حدود ۹ میلیارد نفر خواهد رسید که برای تأمین نیاز آن‌ها افزایش تولید یا کاهش تلفات کشت در بسترهای نامساعد نیز اجتناب‌ناپذیر خواهد بود (Espenshade and Stolnitz, 2020; Dukhnytskyi, 2019). باوجود شناسایی واریته‌های

برنج (*Oryza sativa* L.) گیاهی یک‌ساله از خانواده Poacea، دومین غله از نظر سطح زیر کشت (بعد از ذرت، *Zea mays*) است (FAO, 2021). در حال حاضر ۸٪ تولیدات زراعی جهان و بیش از یک‌پنجم انرژی مصرف‌شده در جهان را به خود اختصاص می‌دهد (FAO, 2021) اما با توجه به اینکه سهم زیادی از تولیدات ذرت برای اهدافی غیر از تغذیه انسان مصرف می‌شود، برنج بیش از سایر غلات در

متحمل به شوری) فراهم‌تر گردد. گونه *A. littoralis* با عدد کروموزومی $2n=2x=10$ ، از هالوفیت‌های اختیاری مناطق بیابانی و شورزار محسوب می‌شود که می‌تواند تا غلظت mM ۱۱۰۰ محلول نمک NaCl را تحمل کند (Barhoumi, 2019). با توجه به اینکه آنزیم آنتی‌اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) به‌عنوان سریع‌ترین واحدهای مقابله‌کننده در برابر حمله اکسیژن‌های فعال (اکسیدان‌ها) به شمار می‌آید (Qiao et al., 2020)، این امکان وجود دارد که سامانه حذف رادیکال آزاد در آلوروپوس از توانایی بالاتری نسبت به برنج برخوردار باشد. این برتری سامانه حذف رادیکال‌های آزاد می‌تواند در اثر دارا بودن آنزیم‌های پایدارتر از لحاظ کد ژنتیکی (=توالی آمینواسیدی و ساختاری) و یا الگوی بیان متناسب‌تر آن‌ها در شرایط شوری باشد. پژوهش حاضر به‌منظور ارزیابی و راستی‌آزمایی احتمال این دو توانایی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های گیاهی

بذرهای گیاه آلوروپوس (*A. littoralis*) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان خریداری شدند. بذور در مرحله نخست درون ماسه‌های شسته و اتوکلاو شده کشت و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روز و شب، دمای ۲۲ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد (روز و شب) در اتاقک رشد^۳ کشت شدند. نمونه‌ها هر سه روز یک‌بار از انتهای ظروف، آبیاری می‌شدند. پس از ۲۱ روز، گیاهچه‌های با رشد مشابه به تشتک‌های ۸ لیتری حاوی محلول غذایی یوشیدا^۴ (Bai et al., 2021) با pH حدود ۵/۵ که به‌وسیله پمپ هوا دائماً هوادهی می‌شدند، انتقال داده شدند. اسیدپتیه محیط هرروز بررسی و در صورت تغییر با استفاده از هیدروکسید پتاسیم باز تنظیم و کل محلول غذایی نیز هر هفت روز تعویض می‌شد.

بذرهای گیاه برنج (*O. sativa* var IR64) نیز که از واریته‌های نسبتاً حساس به شوری آزادشده توسط IRRI^۵ است، توسط مرکز تحقیقات برنج آمل تهیه و سخاوتمندانه در اختیار این طرح پژوهشی قرار گرفت. بذرهای برنج قبل از استفاده در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت حداقل ۳۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سپس سه بار به‌وسیله آب یون‌زدایی^۶ شده آبشویی و درون ماسه‌های شسته

متنوعی از برنج با میزان تحمل‌های متفاوت به شوری، کماکان برنج به‌عنوان حساس‌ترین غله به تنش شوری معرفی می‌شود (Chen et al., 2021). برنج هم در مرحله رشد رویشی و هم رشد زایشی به‌عنوان یک گیاه حساس به شوری طبقه‌بندی می‌شود (Zhang et al., 2019; Kibria et al., 2017). بر اساس بررسی‌های صورت گرفته، در EC‌های بالاتر از سه دسی زیمنس بر متر^۱، به ازای افزایش هر یک واحد EC، ۱۲ درصد از عملکرد برنج کاهش می‌یابد و در EC برابر با شش dSm^{-1} ، ۵۰ درصد کاهش عملکرد گزارش شده است (Chen et al., 2021).

سازوکارهای تحمل به شوری و روش‌های بهبود آن بسیار گسترده و در سطوح مختلف ساختاری و عملکردی، از مولکولی تا مورفولوژیکی پراکنده شده است. درواقع گیاهانی که به شوری تحمل نشان می‌دهند، به طریقی در شرایط تنش، هموستازی خود را در سطح سلولی حفظ می‌کنند که به آن‌ها اجازه ماندگاری و رشد در شرایط تنش شوری را می‌دهد، درحالی‌که گیاهان حساس این قابلیت را ندارند (Winicov, 1998). سامانه حذف رادیکال‌های آزاد (آنتی‌اکسیدان‌ها) یکی از سازوکارهایی است که در تحمل به انواع تنش‌ها دخیل است و سرعت تولید، میزان تولید، پایداری و توان عملکرد آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی از جمله مهم‌ترین صفات مؤثر در حفظ هموستازی سلولی در موجودات مختلف، بخصوص گیاهان است (Riyazuddin et al., 2020). برای تعیین نقاط ضعف و قوت و همچنین یافتن مؤثرترین راهکار برای بهبود توانایی تحمل به شوری، به مطالعاتی جامع و چندبعدی نیاز است. یکی از بهترین روش‌های علمی مطالعه یک صفت، مقایسه دو فنوتیپ متضاد با ویژگی‌های پایه‌ای مشترک است. مطالعه موجودات هم‌گونه، هم‌جنس یا هم‌خانواده با ویژگی‌های متقابل از جمله این راهکارها است (Kawasaki et al., 2001). هدف این پژوهش نیز بررسی و مقایسه دو گیاه برنج (*O. sativa* L.) و آلوروپوس (*A. littoralis* L.) در سطح الگوی بیان و همچنین ساختار آمینواسیدی آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز^۲ در پاسخ به تنش اکسیداتیو حاصل از شوری بوده است تا بر پایه نتایج آن، زمینه برای گزینش ژن‌های با اهمیت بیشتر برای دستوری و یا انتقال به برنج (با هدف تولید لاین‌های برنج

⁴ Yoshida

⁵ International Rice Research Institute

⁶ Deionized

¹ dSm^{-1}

² Superoxide dismutase, SOD

³ Growth Chamber

جدول ۲. غلظت و زمان‌های انتخابی برای آزمایش‌های نهایی تنش

شوری گیاه آلوروپوس (*A. littoralis*)

Table 2. Concentration and sampling time points used for evaluation of salinity stress in *Aeluropus*

غلظت Concentration (mM)	100	200	300
زمان Sampling time (h)	6	6	2 6 24 48 144 264

استخراج RNA

استخراج RNA نمونه‌های تیمار و شاهد، با استفاده از کیت شرکت دنا زیست آسیا^۳ و بر اساس دستورالعمل همراه انجام گردید. به منظور پیشگیری از تجزیه RNA استخراج شده در کلیه مراحل از آب عاری از RNase، هاون‌های استریل شده در آون (با دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) و تجهیزات پلاستیکی که با دو بار اتوکلاو استریل گردیده بودند، استفاده شد. پس از تعیین کمیت، کیفیت و هم‌غلظت سازی RNAها، به منظور حذف آلودگی‌های ژنومی احتمالی از نمونه‌های استخراج شده، معادل ۵۰۰۰ نانوگرم از RNAهای هم‌غلظت شده به میکروتیوب‌های جدیدی منتقل و با آنزیم DNase I شرکت ترمو^۴ تیمار شدند. ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت شرکت ترمو^۵ و استفاده هم‌زمان از آغازگرهای تصادفی^۶ و الیگو دی تی^۷ صورت پذیرفت. به منظور طراحی آغازگرهای لازم، توالی‌های مرتبط با ژن‌های موردنظر از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج شدند، توالی ثبت شده با شماره NM_001402155.1 که به‌عنوان Ref. Seq. در پایگاه داده‌های NCBI ثبت شده است، به‌عنوان مرجع طراحی آغازگر ژن Cu/Zn SOD برنج انتخاب شد^۸. مرجع طراحی آغازگرهای آلوروپوس نیز توالی HM107007.2 بود^۹. جهت نرمال سازی داده‌ها نیز برای برنج ژن‌های UBQ5^{۱۰} و elf^{۱۱} و برای آلوروپوس هم ژن‌های مربوط به βact^{۱۲} و elf به‌عنوان کنترل داخلی انتخاب شدند

⁵ Thermo RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622, (USA)

⁶ Random hexamer

⁷ oligo-dT

⁸ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001402155.1

⁹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/HM107007.2>

¹⁰ Ubiquitin 5

¹¹ Elongation Factor

¹² Beta Actin

و اتوکلاو شده با رطوبت دائم کشت شدند. تا قبل از جوانه‌زنی کامل، در محیط تاریک نگهداری شدند اما بقیه مراحل همچون گیاه آلوروپوس پیگیری شد.

اعمال تنش و نمونه‌برداری

در بستر این پژوهش، با هدف اینکه بتوان بر مبنای پاسخ برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی بهترین زمان و غلظت‌های تنش را در دو گیاه مورد مطالعه تعیین و بر اساس آن‌ها غلظت‌های مناسب برای بررسی‌های نهایی تخمین زده شود، غلظت و بازه‌های زمانی مورد اشاره در منابع مختلف (Win and Oo, 2015; Taïbi et al., 2016; Estaji et al., 2018; Ali et al., 2014) مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های مقدماتی، غلظت و زمان‌های زیر برای گیاهان مورد مطالعه انتخاب و تمام نمونه‌برداری‌ها برای سنجش شاخص‌های مورد مطالعه در همین زمان/غلظت‌ها صورت پذیرفت (جدول ۱ و ۲). برای اعمال تنش بر اساس حجم محیط کشت هیدروپونیک، برای رسیدن غلظت نمکی محیط کشت هیدروپونیک به غلظت‌های انتخابی، مقدار مشخصی^۲ محلول NaCl با غلظت ۵ میلی مولار به محیط کشت اضافه شد. نمونه‌های شاهد نیز در تمامی زمان‌های اشاره شده هم‌زمان با نمونه‌های تنش برداشت شدند.

جدول ۱. غلظت و زمان‌های انتخابی برای آزمایش‌های نهایی تنش

شوری گیاه برنج IR64.

Table 1. Concentration and sampling time points used for evaluation of salinity stress in IR64 rice.

غلظت Concentration (mM)	30	60	100
زمان Sampling time (h)	6	6	2 6 24 48 144 264

^۱ در این پیش آزمایش ۴۸ نقطه زمان/غلظت برای آلوروپوس و ۲۰ نقطه زمان/غلظت برای برنج مورد ارزیابی قرار گرفت و با تعیین حدود شروع تنش شدید (بر اساس افت شدید غلظت و تغییر نسبت کلروفیل‌ها، سنجش پایداری غشا، غلظت داخلی و نسبت سدیم و پتاسیم، مقایسه وزن تر و خشک، محتوای آب نسبی و ...)، یک چهارم، یک دوم و سه چهارم غلظت‌های نمکی که باعث بروز تنش شدید در گیاهان شده بودند برای بررسی‌های نهایی انتخاب شدند.

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

³ DENA zist asia #S-1020, (Iran)

⁴ Thermo Scientific DNase I #EN0525, (USA)

آماده^۳ صورت پذیرفت. به‌منظور افزایش دقت آزمایش‌ها، علاوه بر سه تکرار زیستی، برای هر نمونه دو تکرار تکنیکی نیز در نظر گرفته شد. در این پژوهش از کمیت سنجی نسبی و روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به‌منظور تحلیل نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی استفاده گردید.

(جدول ۳). آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای Vector NTI v.10 و Primer Premier v.5 طراحی شدند و پس از بررسی وضعیت اتصال آن‌ها با استفاده از ابزار بررسی آغازگر^۱ پایگاه NCBI برای سنتز به شرکت ماکروجین^۲ کره جنوبی سفارش داده شدند. فرایند پی‌سی‌آر کمی با استفاده از مخلوط

جدول ۳. توالی آغازگرهای استفاده‌شده در پی‌سی‌آر کمی زمان واقعی برنج و آلورپوس

Table 3. Primer list for Real Time qPCR analysis of rice and Aeluropus

Plant	Gene	Forward primer	Reverse Primer	bp
گیاه	ژن	آغازگر ابتدایی	آغازگر انتهایی	
Rice برنج	SOD	5'-GTCACCGCTGGAGAAGATGG-3'	5'-GATGATCCCGCAAGCAACAC-3'	189
	UBQ5	5'- GCGGAAGTAAGGAAGGAGGAG-3'	5'- CAGAGGTGATGCTAAGGTGTTTC-3'	116
	Elf	5'- ACGGTGATGCTGGTATGG-3'	5'- GGTTGGTCCCTTCTCTCC-3'	155
Aeluropus آلورپوس	SOD	5'-GGTGTCAAGGGCTCCATCTTC-3'	5'-CGGATCTCATCTTCTGGTGCTC-3'	197
	Bact	5'- TTGCTGGCCGAGACCTTAC-3'	5'- GGCGAGCTTTTCCCTTGATG-3'	113
	Elf	5'- ACCTTCTCTGAATACCCTCCTCTG-3'	5'-CTTCTCCACACTCTTGATGACTCC-3'	90

صاف تبدیل شود. مرحله اتصال قطعات ژنی به ناقل نیز با استفاده از آنزیم^۸ T4 Ligase شرکت Thermo® بر اساس دستورالعمل همراه انجام شد. باوجودآنکه به‌طورمعمول در اتصال قطعات با انتهای صاف از نسبت ۳ برابری قطعه به ناقل استفاده می‌شود، در این پژوهش به‌منظور افزایش بازدهی فرایند اتصال، ناقل و قطعات به نسبت ۱ به ۷ باهم مخلوط شدند. با توجه به متفاوت بودن اندازه قطعات، برای تعیین دقیق مقدار لازم از قطعه ژنی (x) از نرم‌افزار بر خط^۹ Ligation Calculator^{۱۰} استفاده شد. پس از اضافه کردن همگی ترکیبات، مخلوط به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه و حدود ۱۸ ساعت در دمای ۸ درجه قرار گرفتند. نهایتاً ناقل نوترکیب به روش شوک حرارتی به باکتری مستعد^{۱۱} شده Escherichia coli سویه DH5 α منتقل شدند. پس از همسانه سازی، پلاسمیدها با استفاده از کیت^{۱۲} PDEK شرکت Vivantis و بر اساس دستورالعمل همراه، استخراج و به‌منظور تعیین توالی قطعات ژنی درونشان، به شرکت ماکرو جین^{۱۳} ارسال و با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 تعیین

تعیین توالی ژن و ارزیابی ویژگی‌های بیوشیمیایی SOD

به‌منظور مطالعه توالی و ساختار ژن SOD Cu/Zn مؤثر در تنش اکسیداتیو، به توالی یابی آن‌ها اقدام گردید. برای این هدف آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier v.5 طراحی و پس از بررسی وضعیت اتصال آن‌ها با استفاده از ابزار Primer BLAST برای سنتز به شرکت ماکرو جین کره جنوبی سفارش داده شدند. جهت تکثیر قطعات، از DNA ژنومی استخراج‌شده از هر دو گیاه استفاده و به‌منظور کاهش خطای فرایند همانندسازی از آنزیمی^۴ که قابلیت تصحیح حین همانندسازی^۵ را داشت استفاده شد. پس از تکثیر و الکتروفورز، قطعات مدنظر (با طول ۶۳۶ bp برای برنج و ۴۷۴bp برای آلورپوس) با استفاده از کیت اختصاصی^۶ از ژل آغاز ۱/۵ درصد استخراج شدند. قطعات خالص‌شده به‌منظور همسانه سازی به ناقل pTZ57R متصل شدند. برای این منظور ابتدا ناقل pTZ57R به‌وسیله آنزیم^۷ SmaI شرکت Thermo® برش داده شد تا به حالت خطی با دو انتهای

⁹ On Line

¹⁰ http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html

¹¹ Competent Cell

¹² Plasmid DNA Extraction Kit #GF-PL-1

¹³ Macro Gene

¹ Primer BLAST

² Macro Gene

³ AMPLIQON RealQ Plus #A314402, (Denmark)

⁴ Genet Bio Suprime HF DNA Polymerase #HF-2000 (South Korea)

⁵ Proofreading

⁶ Vivantis Nucleic Acid Extraction Kit #GF-1(Iran)

⁷ #FD0663 (USA)

⁸ #EL0011

ژن SOD به‌عنوان یکی از نشانگرهای زیستی تنش اکسیداتیو شناخته می‌شود (Jithesh et al., 2006) نحوه پاسخ ژن Cu/Zn SOD در سطح mRNA در غلظت/ زمان‌های مختلف مواجهه‌ی ریشه و اندام هوایی برنج و آلوروپوس با تنش شوری در شکل‌های ۱ و ۲ خلاصه شده است.

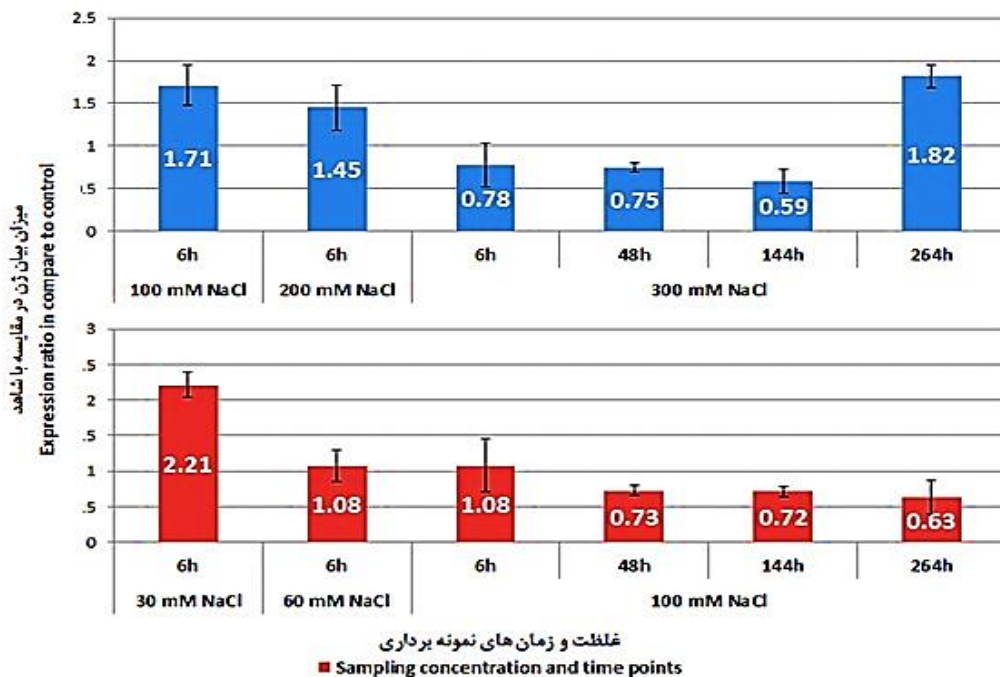
الگوی بیان ژن Cu/Zn SOD در ریشه گیاهان مورد مطالعه

ریشه اولین بافتی است که پیام مواجهه‌شدن با تنش شوری را دریافت می‌کند و انتقال می‌دهد. به همین دلیل نحوه پاسخ آن به این تنش بسیار حائز اهمیت است. آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نیز اولین آنزیم پاسخ‌دهنده به تولید رادیکال آزاد سوپر اکسید^۱ است. نتایج بررسی بیان ژن SOD نشان داد که در ریشه آلوروپوس (شکل ۱) با شروع تنش شوری، میزان بیان Cu/Zn SOD افزایش پیدا می‌کند، افزایش غلظت نمک محیط به ۲۰۰ میلی مولار نیز باعث تداوم این پاسخ شد.

توالی شدند. به‌منظور افزایش دقت، خوانش‌ها در دو جهت انجام شد. نتایج حاصل با استفاده از امکانات پایگاه NCBI و نرم‌افزارهای Geneious 2019 و CLC Genomics Workbench v.12 مورد تحلیل قرار گرفتند. توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی حاصل از ژن‌های مورد مطالعه از نظر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی مؤثر در دوام پروتئین‌های حاصل مانند شاخص ناپایداری^۱ و شاخص آروماتیکی^۲ مورد تحلیل‌های بیوانفورماتیکی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

همان‌طور که اشاره شد، پژوهش در دو بخش صورت گرفت. هدف از بخش اول پژوهش حاضر، بررسی ارتباط احتمالی بین حساسیت یا تحمل شوری با نحوه پاسخ ژن سوپر اکسید دیسموتاز مربوط به تنش اکسیداتیو گیاهان مورد مطالعه بوده است. سوپر اکسید دیسموتازها اولین خط دفاع آنزیمی در برابر تنش‌های اکسیداتیو محسوب می‌شوند (Gill and Tuteja, 2010; Szollosi, 2014). به‌طوری‌که میزان بیان



شکل ۱. الگوی بیان ژن Cu/Zn SOD در ریشه در بازه زمانی تحت تنش شوری (آبی = آلوروپوس، قرمز = برنج)

Fig. 1. Expression profile of Cu/Zn SOD gene in the roots during salt stress span (Blue = Aeluropus, Red = Rice)

ایجاد نکرد، اما پس از ۲۶۴ ساعت (۱۱ روز) حضور ریشه در این غلظت، مجدداً جهشی در بیان این ژن مشاهده گردید.

افزایش غلظت به ۳۰۰ میلی مولار و استمرار حضور ریشه در آن تا ۱۴۴ ساعت (شش روز) افزایشی در بیان این ژن

³O₂⁻

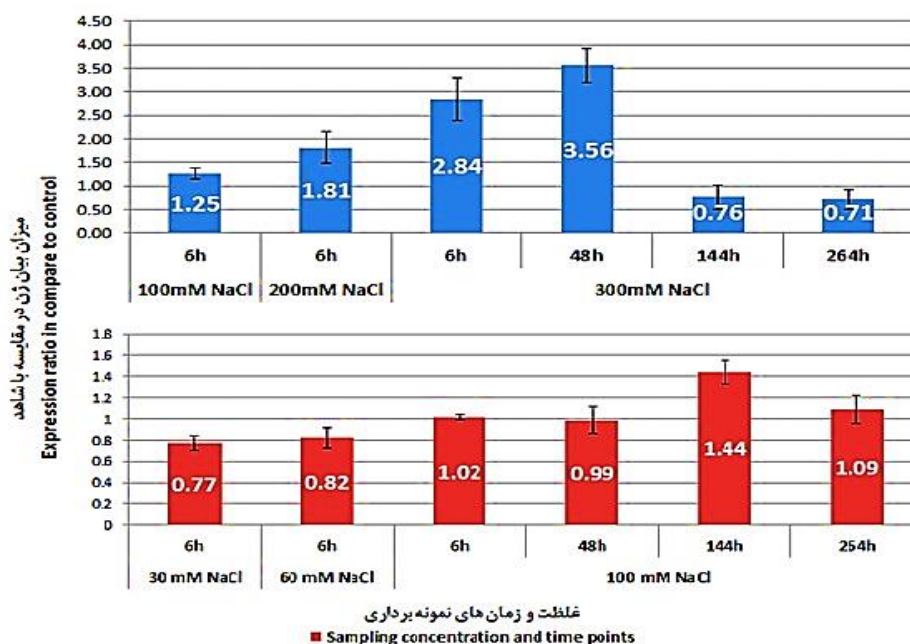
¹ Instability index

² Aromatic index

تنش شوری با گذشتن غلظت یون‌ها از آستانه تحمل گیاه در بافت آغاز می‌گردد. این حالت در بافت‌های هوایی دیرتر از ریشه رخ می‌دهد که فاصله زمانی آن بسته به سرعت انتقال یون‌ها از ریشه به ساقه دارد. اهمیت بافت‌های هوایی نیز بیشتر به دلیل قابلیت فتوسنتز کننده بودن آن‌هاست. نتایج بررسی بیان ژن Cu/Zn SOD در اندام هوایی آلوروپوس نشان داد که با شروع و استمرار شرایط تنش، میزان بیان Cu/Zn SOD نیز به تدریج افزایش پیدا کرده است (شکل ۲) به طوری که پس از ۴۸ ساعت حضور گیاه در غلظت ۳۰۰ میلی مولار به حداکثر میزان خود که حدود ۳/۶ برابر نمونه‌های شاهد متناظر بود رسید. پس از حضور بیشتر در محیط تنش‌زا، بیان ژن Cu/Zn SOD کاهش یافت به طوری که از نظر آماری (آزمون t) تفاوت معناداری با نمونه‌های شاهد نداشتند (شکل ۲).

این زمان بیشترین میزان افزایش بیان که برابر با ۱/۸ برابر نمونه‌های شاهد بود مشاهده شد. در رابطه با برنج (شکل ۱) با وجود آنکه در شروع تنش بیشترین افزایش بیان مشاهده گردید (۲/۲ برابر)، اما تغییرات غلظت و مدت‌زمان حضور ریشه در محیط نمکی، تغییر معناداری در بیان ژن این آنزیم نسبت به نمونه‌های شاهد ایجاد نکرد (آزمون t). افزایش مدت‌زمان مواجهه ریشه برنج با غلظت ۱۰۰ mM به بیش از ۴۸ ساعت، برخلاف ریشه آلوروپوس، نه تنها بازیابی در بیان این ژن ایجاد نکرد بلکه باعث کاهش بیان این ژن نسبت به نمونه‌های شاهد شد و این روند بیان تا پایان زمان نمونه‌برداری‌ها باقی ماند (شکل ۱).

الگوی بیان ژن Cu/Zn SOD در اندام هوایی گیاهان مورد مطالعه



شکل ۲. الگوی بیان ژن Cu/Zn SOD در اندام هوایی در بازه زمانی تحت تنش شوری (آبی = آلوروپوس، قرمز = برنج)
 Fig. 2. Expression profile of Cu/Zn SOD gene in the shoots during salt stress span (Blue = Aeluropus, Red = Rice)

۱/۴ برابر نمونه‌های شاهد رخ داده و پس از آن نیز مجدداً کاهش یافت (شکل ۲).

ارتباط بین میزان بیان ژن این آنزیم و قابلیت تحمل تنش‌های مختلف توسط پژوهشگران بسیاری بررسی و گزارش شده است. افزایش سریع بیان Cu/Zn SOD و برخی دیگر از اعضای خانواده این آنزیم در ارقام متحمل گوجه

بررسی بیان این ژن در اندام هوایی برنج نیز نشان داد که در ابتدای مواجهه گیاه با شرایط تنش، میزان بیان این ژن تفاوت معناداری با نمونه‌های شاهد ندارد (شکل ۲) و آغاز افزایش بیان ژن Cu/Zn SOD در اندام هوایی برنج پس از ۱۴۴ ساعت حضور آن در غلظت ۱۰۰ mM به میزان حدود

یکی از قابلیت‌های این گیاه در تحمل شوری و کاهش اثرات تنش اکسیداتیو در آن محسوب گردد. برخی از پژوهش‌ها تولید ایزوفرم‌های جدیدی از SOD در گیاهان هالوفیت در پاسخ به تنش شوری را گزارش کرده‌اند که نشانه‌ای از اهمیت این آنزیم در تحمل تنش شوری است (Bose et al., 2014). باین وجود تنظیم متعادل بیان ژن‌های مسیرهای کنترل تنش اکسیداتیو است که موجب دستیابی به نتیجه‌ای پایدار و مستمر در تحمل تنش اکسیداتیو می‌گردد. برای مثال انتقال ژن Cu/Zn SOD به برنج IR20 و بیش بیان آن باعث دو برابر شدن تحمل آن به شوک‌های حرارتی و تنش شوری 150 mM در آن، افزایش وزن تر، خشک و همچنین بهبود ۲۵ درصدی عملکرد آن شده است. باین وجود بروز علائم پژمردگی پس از ۸ روز حضور آن‌ها در محیط هیدروپونیک نیز گزارش شده است (Prashanth et al., 2008) که می‌تواند به دلیل نامتعادل بودن مسیر خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد یا تجمع H_2O_2 و بر هم خوردن تعادل پیام‌رسانی سلولی آن‌ها باشد به‌علاوه گزارش‌های متعددی از غیرفعال شدن Cu/Zn SOD و Fe SOD در غلظت‌های بالای H_2O_2 وجود دارد. این بیش بیان اثرات فنوتیپی مشابهی در تنش خشکی نیز نشان داده است (Prashanth et al., 2008).

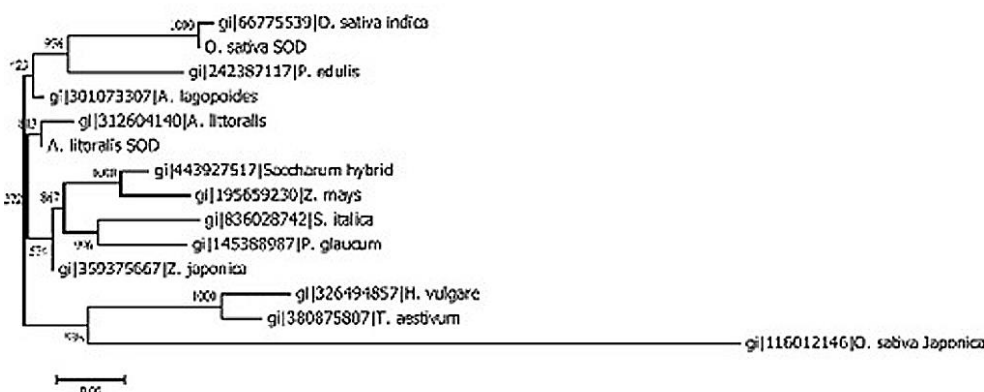
در رابطه با توالی نوکلئوتیدی برنج IR64، نزدیک‌ترین داده مشابه به نتایج این پژوهش، توالی مربوط به وارپته هندی برنج با ضریب تشابه ۹۸٪ بود که با شماره GI:66775539 در پایگاه NCBI ثبت شده است (شکل ۳). نزدیک‌ترین توالی پس‌از آن، توالی مربوط به گیاه *Zoysia japonica* با تشابه ۸۶٪ بود که mRNA آن (GI:359375667) نیز در پاسخ به تنش شوری استخراج و توالی‌یابی شده بود. در رابطه با توالی‌های مشابه با ژن Cu/Zn SOD گیاه آلوروپوس نیز نزدیک‌ترین توالی با ضریب تشابه ۹۸٪ مربوط به ژنوتیپی از *A. littoralis* با شماره GI:312604140 بود و پس‌از آن توالی نوکلئوتیدی *A. lagopoides* با شماره GI:301073307 قرار داشت که گیاهی هم‌جنس و متحمل به شوری است و با توالی حاصل از پژوهش حاضر ۹۶٪ تشابه داشت. پس‌از آن توالی مربوط به گیاه *Z. japonica* با تشابه ۹۵٪ بود. در بررسی انجام شده توالی‌های نوکلئوتیدی برنج IR64 و آلوروپوس ضریب تشابه ۸۴٪ داشتند. بررسی و مقایسه توالی‌های آمینواسیدی Cu/Zn SOD حاصل از بزرگ‌ترین ORF توالی‌های استخراج شده در شکل ۳ خلاصه

(*Lycopersicon sp.*) و ذرت (*Zea mays*) گزارش شده است (Aydin et al., 2014) گزارش‌هایی مبنی بر کاهش بیان ژن‌های SOD در برخی ارقام برنج حساس به شوری نیز وجود دارد (Gill et al., 2015). هرچند که ارقام حساس گندم نان (*Triticum aestivum*) کاهش بیان را نشان نداده‌اند اما همچنان افزایش بیان SOD در آن‌ها کمتر از ارقام متحمل بوده است (Gill et al., 2015). بیش بیان Cu/Zn SOD در کلروپلاست *Withania somnifera* با افزایش تحمل آن در برابر تیمارهای خارجی شوینده‌ها و اتانول رابطه معناداری داشته است (Gill et al., 2015). در مرکبات و گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) هم تحمل به شوری به فعالیت SOD نسبت داده شده است (Gill et al., 2015) انتقال و بیش بیان Cu/Zn SOD خود در تنباکو تحمل آن به O₃ را افزایش داده است (Prashanth et al., 2008).

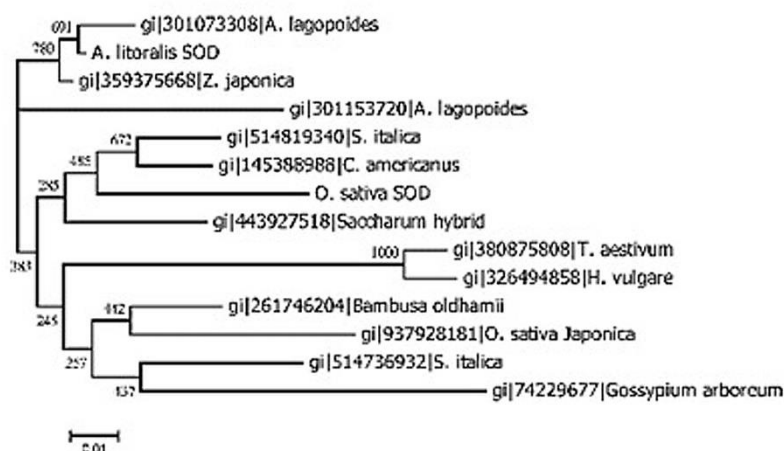
با توجه به اینکه سوپر اکسید دیسموتازها اولین خط دفاعی آنزیمی در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌باشند (Ighodaro and Akinloye, 2018; Qiao et al., 2020) و Cu/Zn SOD عضوی از خانواده سوپر اکسید دیسموتازهاست که گسترده‌ترین حوزه فعالیت را در سلول دارد به طوری که در محیط سیتوسول، پروکسی زوم، کلروپلاست و فضای آپوپلاستی سلول‌های گیاهی حضور و فعالیت دارد (Alscher, 2002) و همچنین وظیفه تبدیل O_2 به H_2O_2 و O_2 را بر عهده دارد، عدم استمرار بیان Cu/Zn SOD در ریشه برنج IR64 و همچنین آغاز دیر هنگام بیان آن در اندام هوایی آن می‌تواند در ضعف این رقم در برابر شوری سهیم باشند؛ زیرا از یک سو $O_2^{\cdot-}$ رادیکال آزاد است که می‌تواند باعث آسیب‌های سلولی شود به‌علاوه تجمع آن باعث تولید رادیکال آزاد هیدروکسیل $OH^{\cdot-}$ نیز گردد که اثر تخریبی بسیاری بر مولکول‌های زیستی دارد (Prashanth et al., 2008) عدم فعالیت SOD و در نتیجه کمبود H_2O_2 نیز که نقش یک پیام‌رسان درون سلولی را بر عهده دارد، می‌تواند در انتقال پیام بروز تنش و فعال کردن بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی کنترل تنش اختلال ایجاد نماید. این نحوه پاسخ‌دهی گیاه برنج می‌تواند به دلیل عدم حضور توالی‌های تنظیمی استمرار بیان در بخش‌های کنترل‌کننده ژن Cu/Zn SOD ریشه برنج IR64 باشد. درحالی‌که افزایش سریع بیان این ژن در ریشه و استمرار بیان آن در اندام هوایی آلوروپوس می‌تواند به‌عنوان

۲۷۰ mM ساقه سوزی را نشان داده است درحالی‌که نمونه‌های آزمایشی همراه آن تا ۴۰۰ mM را نیز تحمل کرده بودند. در پژوهش حاضر نیز توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی Cu/Zn SOD برنج IR64 به‌عنوان یک رقم حساس و آلورپوس به‌عنوان گونه‌ای متحمل تشابه نسبی با *Z. japonica* داشت. مقایسات صورت گرفته بین توالی‌های آمینواسیدی Cu/Zn SOD برنج IR64 و آلورپوس، تفاوت‌های آن‌ها در وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری و شاخص آروماتیکی را نیز نشان داد. نتایج حاصل در جدول ۴ خلاصه شده‌اند. در این دو شاخص، برتری نسبی توالی‌های آمینواسیدی آلورپوس به برنج IR64 را نشان می‌دهد.

شده است. بررسی ماتریس فاصله مربوط به دندروگرام مذکور نشان داد که توالی آمینواسیدی این ژن در برنج IR64 با توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های متناظر در گیاهان *Cenchrus americanus* و *Z. japonica italica* ۹۸٪ تشابه دارند. مقایسه توالی‌های آمینواسیدی آلورپوس نیز قرابت ۹۹٪ با *Z. japonica*، ۹۷٪ با *A. lagopoides* و ۸۹٪ با *S. italica* را نشان داد (شکل ۴). تشابه توالی‌های آمینواسیدی برنج IR64 و آلورپوس مورد بررسی در مطالعه حاضر نیز ۸۶٪ بود. اعضاء جنس *Zoysia* به‌عنوان گیاهان متحمل به شوری محسوب می‌شوند هرچند که در مطالعه مارکوم (Marcum and Murdoch, 1994) گونه *Z. japonica* بین آن‌ها به‌عنوان حساس به شوری معرفی شده است. در مطالعه اشاره شده، گونه *Z. japonica* در غلظت



شکل ۳. درخت تبارشناختی حاصل از گروه‌بندی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن Cu/Zn SOD برنج IR64 با استفاده از روش n-Joining
Fig 3. Phylogenetic tree obtained from clustering of Cu/Zn SOD of IR64 rice based on n-Joining analysis



شکل ۴. درخت تبارشناختی حاصل از گروه‌بندی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن Cu/Zn SOD آلورپوس با استفاده از روش n-Joining
Fig. 4. Phylogenetic tree obtained from clustering of Cu/Zn SOD of Aeluropus based on n-Joining analysis

کوچک‌تر از ۴۰ نشان‌دهنده پایداری بیشتر و شاخص‌های بزرگ‌تر از آن، شدت ناپایداری را نشان می‌دهد.

در پژوهش حاضر نیز با توجه به اثر اثبات‌شده تنش شوری بر تغییر شرایط سلولی، این شاخص برای آنزیم SOD اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در جدول‌های ۲-۴ تا ۵-۴ ملاحظه می‌شود، شاخص ناپایداری SOD مربوط به آلوروپوس از نمونه‌های متناظر آن در برنج IR64 کوچک‌تر می‌باشند. این تفاوت می‌تواند به‌عنوان نشانه‌ای از پایداری بیشتر ساختار آن‌ها در تغییر شرایط محیطی از جمله تغییر غلظت یون‌های سلول تحت تنش شوری باشد. برای نمونه در بررسی‌های صورت گرفته بر روی *E. coli* نشان داده است که پروتئین د آمینو اسید اکسیداز^۱ با شاخص ناپایداری ۳۴/۴ نیمه‌عمری برابر با ۱۱۸ ساعت داشته است درحالی‌که نیمه‌عمر پروتئین HSP70 با شاخص ۴۴/۱ تنها ۱ تا ۲ ساعت بوده است (Guruprasad et al., 1990).

شاخص آروماتیک^۲ نیز معیار نشان‌دهنده فراوانی آمینو اسیدهای دارای حلقه آروماتیک^۳ در یک رشته پلی‌پپتید است. حلقه آروماتیکی آمینو اسیدها در صحت و سرعت تشکیل ساختار ثانویه نقش مؤثری دارند (Burley and Petsko, 1985; Georis et al., 2000; Kokkonen et al., 2019). اهمیت این شاخص در پژوهش‌های نوین مهندسی پروتئین نیز در نظر گرفته می‌شود (Moodley et al., 2022; Newberry and Raines, 2019). برای نمونه مشاهده شده است که حضور گروه‌های گوگرددار متصل به حلقه‌های آروماتیک، نرخ تا خوردن RNase A را در شرایط آزمایشگاهی تا ۲۳ برابر افزایش داده است (Ighodaro and Akinloye, 2018; Kannan and Vishveshwara, 2000; Lanzarotti et al., 2011). نشان داد که این شاخص در رشته پلی‌پپتیدی آنزیم Cu/Zn SOD مطالعه شده آلوروپوس بزرگ‌تر از شاخص پروتئین متناظر آن در برنج IR64 است. شاید بتوان به این تفاوت به‌عنوان نشانه‌ای از برتری نسبی ترکیب توالی‌های آمینو اسیدی آنزیم‌های درگیر در تنش اکسیداتیو در آلوروپوس نسبت به برنج IR64 استناد کرد. درنهایت از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که در صورتی که قصد بهبود تحمل شوری در برنج را داشته باشیم، می‌توانیم با توجه به بهتر بودن الگوی بیان ژن Cu/Zn SOD در آلوروپوس از

جدول ۴. شاخص‌های بیوشیمیایی ارزیابی شدن در پروتئین

Cu/Zn SOD برنج IR64 و آلوروپوس

Table 4. Evaluated biochemical indexes in Cu/Zn SOD protein of rice and Aeluropus

شاخص ارزیابی شده	آلوروپوس	برنج IR64
Evaluated Indexes	Aeluropus	IR64 Rice
وزن مولکولی (کیلو دالتون)	15.14	15.25
Calculated Weight (kDa)		
نقطه ایزو الکتریک	5.65	5.71
Isoelectric point		
شاخص آروماتیک	0.026	0.019
Aromatic index		
شاخص ناپایداری	17.41	29.02
Instability index		

هر تغییر در توالی آمینو اسیدی یک رشته پلی‌پپتید می‌تواند در ساختار فیزیکی شیمیایی رشته پلی‌پپتید تأثیر بگذارد و بر روی عملکرد، پایداری یا ساختار آن اثر بگذارد (Xia and Li, 1998). در پژوهش حاضر علاوه بر میزان تشابه توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی، ۴ شاخص بیوشیمیایی سوپر اکسید دیسموتاز مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. مشاهده کمترین فواصل بین توالی ژن SOD برنج مورد مطالعه و ارقام هندی ثبت‌شده و همچنین نمونه‌های مربوط به آلوروپوس مورد مطالعه و نمونه‌های از قبل ثبت‌شده *A. littoralis* یا *A. lagopoides* تأییدی بر صحت انجام آزمایش‌های انجام‌شده است. علاوه بر این مشخص شدن تشابه توالی‌های مختلف با برخی از گونه‌ها همانند *S. italica* که دارای توالی‌های ثبت‌شده متعددی در پایگاه‌های NCBI می‌باشند می‌تواند در تسهیل مطالعات آینده بر روی *A. littoralis* که تاکنون اطلاعات بسیار محدودی از توالی ژن‌های آن ثبت‌شده است سهم بسزایی داشته باشد (به‌عنوان نمونه جهت طراحی آغازگرهای دقیق‌تر و استخراج ژن‌های آلوروپوس). شاخص ناپایداری در واقع نشان‌دهنده پایداری یا نیمه‌عمر رشته پلی‌پپتید در خارج از محیط سلولی است. به‌عبارتی دیگر تعیین‌کننده حساسیت آن به تغییر شرایط محیطی نیز هست. بر مبنای نظر گزارش‌کنندگان این شاخص (Guruprasad et al., 1990) ترکیبات دی‌پپتیدی مشخصی در پروتئین‌ها حضور دارد که فراوانی آن‌ها در نمونه‌های پایدار و ناپایدار متفاوت است. مبنای پایداری و ناپایداری در این شاخص ۴۰ تعیین‌شده است. شاخص‌های

³ Aromatic Ring

¹ D-Amino Acid oxidize (= AAD)

² Aromatic Value

(بهینه شدن الگوی بیان) و هم در فعال شدن سریع‌تر آنزیم (بهینه شدن شاخص آروماتیک) و هم دوام آنزیم (بهینه شدن شاخص ناپایداری) آن در شرایط سلولی تحت تنش بهبودی حاصل خواهد شد که نهایتاً می‌توانند در بهبود تحمل به شوری در برنج نقش داشته باشند (Kokkonen et al., 2019; Newberry and Raines, 2019).

توالی پروموتور آن و انتقال آن به برنج به‌عنوان یک گام روبه‌جلو استفاده کرد. به‌علاوه با توجه به برتری شاخص‌های بیوشیمیایی بررسی‌شده، می‌توان از توالی نوکلئوتیدی ژن Cu/Zn SOD در آلورپوس نیز به‌عنوان منبعی برای انتقال بهره برد که با این روند (انتقال پروموتور و توالی نوکلئوتیدی ژن Cu/Zn SOD) هم در شروع پاسخ برنج به تنش شوری

منابع

- Ali, Md.N., Ghosh, B., Gantait, S., Chakraborty, S., 2014. Selection of rice genotypes for salinity tolerance through morpho-biochemical assessment. *Rice Science*. 21 (5), 288–298. [https://doi.org/10.1016/s1672-6308\(13\)60189-4](https://doi.org/10.1016/s1672-6308(13)60189-4)
- Alscher, R.G., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53 (372), 1331–1341. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331>
- Aydin, S., Büyük, İ., Aras, E.S., 2014. Expression of SOD gene and evaluating its role in stress tolerance in NaCl and PEG stressed *Lycopersicon esculentum*. *Turkish Journal of Botany*. 38, 89–98. <https://doi.org/10.3906/bot-1305-1>
- Bai, L.-W.-D., Liu, J., Dai, L.-F., Deng, Q.-W., Chen, Y.-L., Xie, J.-K., Luo, X.-D., 2021. Identification and characterisation of cold stress-related proteins in *Oryza rufipogon* at the seedling stage using label-free quantitative proteomic analysis. *Functional Plant Biology*. 48(5) p.542. <https://doi.org/10.1071/fp20046>
- Barhoumi, Z., 2018. Physiological response of the facultative halophyte, *Aeluropus litoralis*, to different salt types and levels. *Plant Biosystems*. 153(2), 298–305. <https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1478901>
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Shabala, S., 2013. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 65 (5), 1241–1257. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert430>
- Burley, S.K., Petsko, G.A., 1985. Aromatic-aromatic interaction: A mechanism of protein structure stabilization. *Science*. 229(4708), 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.3892686>
- Chen, T., Shabala, S., Niu, Y., Chen, Z.-H., Shabala, L., Meinke, H., Venkataraman, G., Pareek, A., Xu, J., Zhou, M., 2021. Molecular mechanisms of salinity tolerance in rice. *The Crop Journal*. 9(3), 506–520. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.03.005>
- Dukhnytskyi, B., 2019. World agricultural production. *Ekonomika APK*. (7), 59–65. <https://doi.org/10.32317/2221-1055.201907059>
- Espenshade, T.J., Stolnitz, G.J., 1988. *Technological Prospects and Population Trends* (1st ed.). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780429308376>
- Estaji, A., Roosta, H.R., Rezaei, S.A., Hosseini, S.S., Niknam, F., 2018. Morphological, physiological and phytochemical response of different *Satureja hortensis* L. accessions to salinity in a greenhouse experiment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 10, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.04.005>
- Fao., 2021. *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook*. Retrieved Sep 15, 2022, from <https://www.fao.org/3/cb4477en/cb4477en.pdf>
- Georis, J., Esteves, F.D.L., Lamotte-Brasseur, J., Bougnet, V., Giannotta, F., Frère, J.-M., Devreese, B., Granier, B., 2008. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: Structural basis and molecular study. *Protein Science*. 9 (3), 466–475. <https://doi.org/10.1110/ps.9.3.466Gill>
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishra, P., Sabat, S.C., Tuteja, N., 2015. Superoxide

- dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(14), 10375–10394. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4532-5>
- Guruprasad, K., Reddy, B.V.B., Pandit, M.W., 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. "Protein Engineering, Design and Selection." 4(2), 155–161. <https://doi.org/10.1093/protein/4.2.155>
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Jithesh, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R., Parida, A.K., 2006. Antioxidative response mechanisms in halophytes: Their role in stress defence. *Journal of Genetics*. 85(3), 237–254. <https://doi.org/10.1007/bf02935340>
- Kannan, N., Vishveshwara, S., 2000. Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*. 13(11), 753–761. <https://doi.org/10.1093/protein/13.11.753>
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D., Bohnert, H.J., 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell*. 13(4), 889–905. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.889>
- Kibria, M.G., Hossain, M., Murata, Y., Hoque, Md.A., 2017. Antioxidant Defense Mechanisms of Salinity Tolerance in Rice Genotypes. *Rice Science*. 24(3), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2017.05.001>
- Kokkonen, P., Bednar, D., Pinto, G., Prokop, Z., Damborsky, J., 2019. Engineering enzyme access tunnels. *Biotechnology Advances*. 37(6) p.107386. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.008>
- Lanzarotti, E., Biekofsky, R.R., Estrin, D.A., Marti, M.A., Turjanski, A.G., 2011. Aromatic–aromatic interactions in proteins: Beyond the dimer. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 51(7), 1623–1633. <https://doi.org/10.1021/ci200062e>
- Marcum, K.B., Murdoch, C.L., 1994. Salinity Tolerance mechanisms of six C4 turfgrasses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 119(4), 779–784. <https://doi.org/10.21273/jashs.119.4.779>
- Moodley, A., Fatoba, A., Okpeku, M., Emmanuel Chiliza, T., Blessing Cedric Simelane, M., Pooe, O.J., 2022. Reverse vaccinology approach to design a multi-epitope vaccine construct based on the Mycobacterium tuberculosis biomarker PE_PGRS17. *Immunologic Research*. 70(4), 501–517. <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09284-x>
- Newberry, R.W., Raines, R.T., 2019. Secondary forces in protein folding. *ACS Chemical Biology*. 14(8), 1677–1686. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00339>
- Prashanth, S.R., Sadhasivam, V., Parida, A., 2007. Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica Rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance. *Transgenic Research*. 17(2), 281–291. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9099-6>
- Qiao, K., Fang, C., Chen, B., Liu, Z., Pan, N., Peng, H., Hao, H., Xu, M., Wu, J., Liu, S., 2020. Molecular characterization, purification, and antioxidant activity of recombinant superoxide dismutase from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36(8). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02892-5>
- Riyazuddin, R., Verma, R., Singh, K., Nisha, N., Keisham, M., Bhati, K.K., Kim, S.T., Gupta, R., 2020. Ethylene: A master regulator of salinity stress tolerance in plants. *Biomolecules*. 10(6) p.959. <https://doi.org/10.3390/biom10060959>
- Szöllősi, R., 2014. Superoxide Dismutase (SOD) and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Oxidative Damage to Plants*, 89–129. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-799963-0.00003-4>
- Taïbi, K., Taïbi, F., Ait Abderrahim, L., Ennajah, A., Belkhdja, M., Mulet, J.M., 2016. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*. 105, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.011>
- Win, K.T., Oo, A.Z., 2015. Genotypic difference in salinity tolerance during early vegetative growth of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) from Myanmar. *Biocatalysis and*

- Agricultural Biotechnology. 4(4), 449–455.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.009>
- Winicov, I., 1998. New Molecular Approaches to Improving Salt Tolerance in Crop Plants. *Annals of Botany*. 82 (6), 703–710.
<https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0731>
- Xia, X., Li, W.-H., 1998. What amino acid properties affect protein evolution? *Journal of Molecular Evolution*. 47 (5), 557–564.
<https://doi.org/10.1007/pl00006412>
- Zhang, A. et al., 2019. Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the OsRR22 gene. *Molecular Breeding*. 39, 47.
<https://doi.org/10.1007/s11032-019-0954-y>