Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Crop Production

Print ISSN: 2008- 739x
Online ISSN: 2008- 7403

Iranian Society of Agronomy and Plant Breeding Sciences

Investigating the expression pattern of SAPK1 gene from protein kinase gene group (SNF1-Type) in rice (*Oryaza sativa*) plants under salt stress

Somayeh Kamrava[1*], Nadali Babaeian Jellodar[2], Nadali Bagheri[3], Farhad Nazarian-Firouzabadi[4]

[1] Corresponding Author, PhD student in Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran Email:kamrava.somaieh@yahoo.com
[2] Professor, Department of Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran Email: nbabaeian@yahoo.com
[3] Associate Professor, Department of Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran Email: n.bagheri@sanru.ac.ir
[4] Professor of Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran, E-mail: nazarian.f@lu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2023-6-6
Accepted: 2023-11-25

Keywords:
Rice
Protein kinase
Salinity stress
Sensitive
Gene

ABSTRACT

Background and Objectives: Salinity stress is a very serious threat to most agricultural products in the world. In the world, rice ranks second after wheat and is a relatively sensitive plant to salt stress. Protein kinases are an important group of kinase enzymes that phosphorylate target proteins by adding phosphate groups. These enzymes play an important role in cell communication by inducing the message of growth and reproduction. Gene expression is a process during which a useful gene product is synthesized by the information obtained from a gene. The purpose of this research was to investigate the expression level of SAPK1 gene from the protein kinase gene group in rice plants under sodium chloride salt stress by examining three different times after the stress was applied.

Materials and methods: In this study, the expression pattern of SAPK1 gene in two Cultivars tolerant (Shastak Mohammadi) and sensitive (IR29) of rice plant under salt stress was investigated by factorial experiment in the form of a completely randomized design with three replications. Cultivars were planted in the research greenhouse of the Faculty of Agriculture of Lorestan University and at the seedling stage (5 to 6 leaves), salinity stress was applied to the plant at three levels of 3, 6, and 9 dS/m and the control treatment (without salt stress). Then, at three different times (6, 12, and 24 hours after applying stress), plant leaves were sampled to investigate gene expression. The leaf samples were stored in a freezer at -80 ºC. Then, RNA extraction and cDNA synthesis were done by special kits for each stage, and finally, gene expression analysis was done by qPCR technique and by Livak formula.

Results: The results of the analysis of SAPK1 gene expression pattern showed that in both tolerant and sensitive cultivars, the highest level of gene expression was observed at the salinity level of 9 dS/m, 24 hours after applying the stress. At different times after applying the stress in the control treatment and the salinity level of 3 dS/m, the gene expression level in both tolerant and sensitive cultivars did not show

any difference and was very insignificant. However, at the salinity level of 6 dS/m, 6 hours after applying the stress, the gene expression level in the tolerant cultivar increased 3 fold compared to the sensitive cultivar and control treatment. At this level, examining gene expression 12 and 24 hours after applying the stress, the amount of gene expression in the tolerant cultivar was about 7 fold higher than the sensitive cultivar and the control treatment. At the salinity level of 9 dS/m, 6 hours after applying the stress, the gene expression level in the tolerant cultivar was doubled compared to the sensitive cultivar and 4 fold higher than the control treatment. While 12 hours after applying the stress, the gene expression level in the tolerant cultivar increased by 5.5 fold compared to the sensitive cultivar and by 10 fold compared to the control treatment. Also, 24 hours after applying the stress, gene expression in the tolerant cultivar was 3.5 fold higher than the sensitive cultivar and 11 fold higher than the control treatment.

Conclusion: These results showed that the expression of SAPK1 gene increases in rice plants with increasing salinity levels. Also, investigating the effect of time after applying stress on SAPK1 gene expression, it was found that in the early hours after applying stress, the amount of gene expression was low, but with increasing time up to 24 hours, gene expression in tolerant cultivar increased. These results can be used in molecular studies of rice cultivars to select the most tolerant rice cultivars to salinity stress for cultivation in areas prone to salinity.

Cite this article: Kamrava, S., Babaeian Jellodar, N.A., Bagheri, N.A., Nazarian-Firouzabadi, F. 2024. Investigating the expression pattern of SAPK1 gene from protein kinase gene group (SNF1-Type) in rice (*Oryaza sativa*) plants under salt stress. *Crop Production Journal*, 17 (1), 169-186.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/ejcp.2024.21425.2582
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

تولید گیاهان زراعی
شاپا چاپی: ۲۰۰۸-۷۳۹x
شاپا الکترونیکی: ۲۰۰۸-۷٤۰۳
انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

بررسی الگوی بیان ژن SAPK1 از گروه ژنی پروتئین کیناز (SNF1-Type) در گیاه برنج تحت تنش شوری

سمیه کامروا[۱*]، نادعلی بابائیان جلودار[۲]، نادعلی باقری[۳]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[٤]

[۱]نویسنده مسئول، دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، رایانامه: kamrava.somaieh@yahoo.com
[۲]استاد، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، رایانامه: nbabaeian@yahoo.com
[۳]دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، رایانامه: n.bagheri@sanru.ac.ir
[٤]استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، رایانامه: nazarian.f@lu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰۳/۱٦
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰۹/۰٤

واژه‌های کلیدی:
برنج
پروتئین کیناز
تنش شوری
حساس
ژن

چکیده

سابقه و هدف: تنش شوری تهدید بسیار جدی برای اکثر محصولات کشاورزی در سطح جهان است. برنج در جهان در رتبه دوم بعد از گندم قرار دارد و گیاهی نسبتا حساس به تنش شوری است. پروتئین کینازها یک گروه مهم از آنزیم‌های کینازی هستند که پروتئین‌های هدف را با افزودن گروه‌های فسفات فسفریله می‌کنند. این آنزیم‌ها با القای پیام رشد و تکثیر در ارتباطات سلولی نقش مهمی ایفا می‌کنند. با بررسی بیان ژن‌های دخیل در تحمل به شوری علاوه بر کشف مکانیسم‌ها می‌توان به اصلاح گیاه جهت بهبود تحمل به شوری اقدام نمود. هدف این تحقیق بررسی سطح بیان ژن SAPK1 از گروه ژنی پروتئین کیناز در گیاه برنج تحت تنش شوری سدیم کلراید در سه زمان مختلف بعد از اعمال تنش بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق الگوی بیان ژن SAPK1 در دو رقم متحمل (شصتک محمدی) و حساس (IR29) گیاه برنج تحت تنش شوری به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار بررسی شد. ارقام در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان کاشته شدند و در مرحله گیاهچه‌ای (۵ الی ٦ برگی) به گیاه تنش شوری در سه سطح ۳، ٦ و ۹ دسی‌زیمنس بر متر و تیمار شاهد (بدون تنش شوری) اعمال شد. سپس در سه زمان مختلف (٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش) نمونه برداری از برگ گیاه جهت بررسی بیان ژن صورت گرفت. نمونه‌های برگ در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس استخراج RNA و سنتز cDNA توسط کیت‌های مخصوص هر مرحله صورت گرفت و در نهایت بررسی بیان ژن با تکنیک qPCR و توسط فرمول لیواک انجام شد.

یافته‌ها: نتایج بررسی الگوی بیان ژن SAPK1 نشان داد که در هر دو رقم متحمل و حساس در سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش بیشترین میزان بیان ژن مشاهده گردید. در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش در تیمار شاهد و سطح شوری ۳ دسی‌زیمنس بر متر میزان بیان ژن در هر دو رقم متحمل و حساس هیچ تفاوتی با همدیگر نداشت و بسیار ناچیز

بود. اما در سطح شوری ٦ دسی‌زیمنس بر متر ٦ ساعت بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن در رقم متحمل نسبت به رقم حساس و تیمار شاهد ۳ برابر افزایش داشت. در این سطح بررسی بیان ژن ۱۲ و ٢٤ ساعت بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن در رقم متحمل نسبت به رقم حساس و تیمار شـاهد حدود ۷ برابر بیشـتر شد. در سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر ٦ ساعت بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن در رقم متحمل نسـبت به رقم حسـاس دو برابر و نسـبت به تیمار شاهد ٤ برابر بیشتر شد. در حالیکه ۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن در رقم متحمل نسبت به رقم حسـاس حدود ۵/۵ برابر و نسـبت به تیمار شـاهد حدود ۱۰ برابر بیشتر شد. همچنین ٢٤ سـاعت بعد از اعمال تنش نیز بیان ژن در رقم متحمل نسبت به رقم حساس ۳/۵ برابر بیشتر و نسبت به تیمار شاهد ۱۱ برابر بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشـان داد با افزایش سـطوح شـوری تا ۹ دسـی‌زیمنس برمتر بیان ژن SAPK1 در گیاه برنج افزایش می‌یابد. همچنین با بررسـی اثر زمان بعد از اعمال تنش بر میزان بیان ژن SAPK1 مشـخص شد که در ساعات اولیه بعد از اعمال تنش، میزان بیان ژن کم اما با افزایش زمـان تـا ٢٤ سـاعـت بیـان ژن در رقم متحمل افزایش یافت. از این نتایج می‌توان در بررسـی‌های مولکولی ارقام برنج جهت انتخاب متحمل‌ترین ارقام برنج به تنش شـوری برای کشت در مناطق مستعد شوری استفاده نمود.

استناد: کامروا، سمیه؛ بابائیان جلودار، نادعلی؛ باقری، نادعلی؛ نظریان فیروزآبادی، فرهاد. (١٤٠٣). بررسی الگوی بیان ژن SAPK1 از گروه ژنی پروتئین کیناز (SNF1-Type) در گیاه برنج تحت تنش شوری. *مجله تولید گیاهان زراعی*، ۱۷ (۱)، ١٨٦-١٦٩.

DOI: 10.22069/ejcp.2024.21425.2582

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

برنج با نام علمی *Oryza sativa* گیاهی از خانواده گرامینه (Poaceae) خودگشن، روزکوتاه، گرمادوست و حساس به تنش شوری است و تولید آن تحت تاثیر تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری کاهش می‌یابد. برنج دومین غله جهان بعد از گندم است که غذای اصلی حدود نیمی از مردم جهان به ویژه کشورهای در حال توسعه می‌باشد. برنج گیاه زراعی مناطق گرمسیری، معتدل و مرطوب است و کشت آن در ایران و مناطق مختلف جهان به علت کمبود آب در معرض خطر قرار گرفته است (۱).

تنش شوری تهدید بسیار جدی برای اکثر محصولات کشاورزی در سطح جهان است. از کل زمین‌های کشاورزی دنیا حدود ٦ درصد و از کل زمین‌های قابل کشت جهان حدود ۲۰ درصد با مشکل شوری مواجه هستند (۲). ایران مقام پنجم را از نظر دارا بودن اراضی شور در سطح جهان دارد و حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ هزار هکتار از اراضی برنج استان‌های مازندران، گلستان و گیلان با مشکل شوری مواجه هستند (۳). سازگاری گیاهان به سطح بالای تنش شوری می‌تواند به دو روش متفاوت جلوگیری از تجمع درون سلولی نمک و یا تجمع آن در درون واکوئل سلول به دست آید نتیجه این دو فرایند حفظ غلظت نمک سیتوپلاسمی در سطح نسبتاً پایین است (٤). قابلیت انتخاب یونی، گیاه را در کنترل جذب یون‌های سمی مانند سدیم و کلر و تجمع آنها در سیتوپلاسم سلول قادر می‌سازد (۵) اما به طور کلی می‌توان گفت پاسخ به شوری در گیاهان آوندی فرایندی پس از رونویسی است، و طی آن مسیر SOS (Salt Overlay Sensitive) شامل پروتئین کینازهای سرین– ترئونین و کلسیم باندینگ پروتئین‌ها فعال می‌شوند. فعالیت این مسیر در نهایت منجر به فعال شدن برخی ترانسپورترها خواهد شد (٦).

پروتئین کینازها گروه مهمی از آنزیم‌های کیناز هستند که با افزودن گروه فسفات به پروتئین هدف آن را فسفریله می‌کنند. این آنزیم‌ها به طور وسیع در ریشه، ساقه، برگ، گل، میوه و بذر گیاهان وجود دارند و در ارتباطات سلولی و القای پیام رشد و تکثیر نقش مهمی ایفا می‌کنند (۷). این آنزیم‌ها نقش مهمی در متابولیسم کربن، نیتروژن، نقل و انتقال آب و یون‌ها از غشا، تنظیم اسکلت سلولی، حرکت روزنه‌ای و تنظیم رشد و نمو گیاه دارند. همچنین گروه ژنی پروتئین کیناز در پاسخ‌های دفاعی نسبت به تنش‌های زنده و غیرزنده نقش دارند (۸). بیان ژن‌های پروتئین کیناز از طریق اعمال تنش‌های محیطی از قبیل سرما، خشکی، شوری وکمبود مواد غذایی افزایش می‌یابد (۹). بنابراین تحقیق در مورد ژن‌های پروتئین کیناز مفاهیم مهمی را پیرامون رشد و نمو گیاهان و افزایش مقاومت گیاهان در مقابله با تنش‌های محیطی نشان می‌دهد (۱۰). پروتئین کینازها به عنوان تنظیم کننده در فرآیندهای سلولی نقش دارند و در تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی موثر هستند (۱۱). تغییر در بیان ژن‌ها تحت تاثیر تنش منجر به پاسخ‌های بیوشیمایی و فیزیولوژیکی مختلفی در گیاه می‌شود (۱۲).

بیان ژن فرآیندی است که طی آن به وسیله اطلاعات به‌دست آمده از یک ژن، محصول کاربردی ژن سنتز می‌شود. این محصولات اغلب پروتئینی هستند اما ژن‌های غیرپروتئینی از جمله rRNA یا tRNA را نیز کد می‌کنند. دانشمندان معمولاً به هنگام مطالعه یک ژن به وسیله qPCR به بررسی تغییرات از طریق کاهش یا افزایش در بیان ژن خاص با اندازه‌گیری فراوانی بیان یک ژن خاص می‌پردازند (۱۳) برای بررسی بیان ژن‌ها در گیاهان تحت تنش‌های محیطی روش‌های مختلفی وجود دارد اما ابداع روش qPCR به بررسی بیان ژن‌ها در موجودات زنده کمک فراوانی کرد؛ چون در این روش جمع

آوری اطلاعات همزمان با سیکل‌های چرخه PCR انجام می‌شود و مراحل تشخیص ژن و تکثیر آن در یک مرحله خلاصه می‌شود (١٤). دنجی لئو و همکاران (٢٠١٨) بیان برخی ژن‌های گروه ژنی پروتئین کیناز را در برنج بررسی کردند نتایج آنها نشان داد بیان دو ژن SAPK1 و SAPK2 از طریق اثر بر متابولیت های فعال و اسمزی سبب افزایش رشد و توسعه گیاه و کاهش حساسیت به تنش شوری خواهند شد (١٥). شناسایی و ارزیابی عملکرد ژن‌های گروه ژنی پروتئین کیناز در گیاه برنج به درک مکانیسم مولکولی مقاومت به تنش کمک خواهد کرد. ژن SAPK1 در پایگاه داده NCBI دارای شماره دسترسی LOC4333017 و بر روی کروموزوم شماره ٣ برنج قرار دارد و دارای ٩ اگزون می‌باشد. هدف این پژوهش بررسی سطح بیان ژن SAPK1 از گروه ژنی پروتئین کیناز در گیاه برنج تحت تنش شوری سدیم کلراید با بررسی زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش شوری بود.

مواد و روش‌ها

دو رقم برنج شامل شصتک محمدی (به‌عنوان رقم متحمل) و رقم IR29 (به‌عنوان رقم حساس) در سال ١٤٠٠ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار کاشته شدند (١٦و ١٧). خصوصیات این ارقام در جدول شماره ١ آورده شده است. فاکتورهای این آزمایش شامل تنش شوری در ٤ سطح (شاهد بدون تنش، ٣، ٦ و ٩ دسی‌زیمنس برمتر) و زمان در ٣ سطح (٦، ١٢ و ٢٤ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) بود. در مرحله گیاهچه‌ای (٥ الی ٦ برگی حدود ٣٠ روزه) به گیاه تنش شوری با استفاده از آبیاری با محلول شور تهیه شده با نمک NaCl در سه سطح ٣ ،٦ و٩ دسی‌زیمنس بر متر و تیمار شاهد (بدون تنش شوری) اعمال شد. محلول‌های شور با استفاده از دستگاه EC سنج تهیه شدند.

جدول ١- خصوصیات ارقام برنج شصتک محمدی و IR29

Table 1- Characteristics of Shastak Mohammadi and IR29 rice cultivars

رقم	صفت	مقدار
رقم شصتک محمدی	میانگین ارتفاع بوته	١١٠ سانتی متر
	متوسط طول خوشه	٣٧ سانتی متر
	میانگین عملکرد در هکتار	٧٦٠٠کیلوگرم
	متوسط تعداد پنجه در بوته (در زمان رسیدن)	١٨ عدد
	وزن هزار دانه	٢٩ گرم
	تحمل به تنش شوری	بالا (تا حدود ٩ دسی زیمنس بر متر)
رقم IR29	میانگین ارتفاع بوته	٩٢ سانتی متر
	متوسط طول خوشه	٣٥ سانتی متر
	میانگین عملکرد در هکتار	٦٥٠٠ کیلوگرم
	متوسط تعداد پنجه در بوته (در زمان رسیدن)	١٥ عدد
	وزن هزار دانه	٢٧ گرم
	تحمل به تنش شوری	بسیار پایین (حداکثر آستانه تحمل ٣ دسی‌زیمنس بر متر)

در سه زمان مختلف بعد از اعمال تنش (٦، ١٢ و ٢٤ ساعت بعد از اعمال تنش) نمونه برداری از برگ گیاهچه‌ها جهت بررسی الگوی بیان ژن صورت گرفت. ژن SAPK1 از گروه ژنی پروتئین کیناز، که کد

کننده پروتئین کیناز سرین ترئونین است جهت بررسی الگوی بیان آن تحت تنش شوری انتخاب شد. ژن کنترل داخلی مورد استفاده در این تحقیق نیز ژن ۱۸ s rRNA بود. آغازگرهای ژن مورد نظر با استفاده از ابزار آنلاین Primer 3 (https://primer3.ut.ee/) طراحی شدند. سپس اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده با استفاده از ابزار Primer-blast پایگاه داده NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) بررسی شد. سنتز آغازگرهای طراحی شده برای هر ژن توسط شرکت تکاپوزیست تهران صورت گرفت (جدول ۲).

جدول ۲- آغازگر طراحی شده برای بررسی بیان ژن SAPK1 و ژن کنترل داخلی ۱۸ s rRNA

Table 2- Designed primer to check the expression of SAPK1 gene and internal control gene 18srRNA

نام ژن Gene name	آغازگر Primer	توالی(´۳-´۵) (5´-3´) sequence	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد) Temperature Melt (^{o}c)	اندازه قطعه (باز) Piece size (bp)
SAPK1	Forward	GACCCTGACCCAAGGAA	58	194
	Reverse	ATGGGCAGGTTCTTCAGGAA	57.9	
18S rRNA	Forward	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA	60	86
	Reverse	ACACTTCACCGGACCATTCAA	59.9	

استخراج RNA: برگ‌های انتهایی گیاهان شاهد (بدون تنش شوری) و تحت تنش شوری، بعد از نمونه‌برداری توسط ازت مایع پودر شد و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA ستونی (Column RNA Isolation Kit) شرکت دنا زیست بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تیمار نمونه‌های RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI به‌منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از RNAهای استخراجی انجام شد. بعد از استخراج RNA کل جهت تایید کیفیت استخراج نمونه‌ها، الکتروفورز ژل آگارز صورت گرفت. جهت بررسی کمیت RNA استخراج شده نیز غلظت نمونه‌های RNA در دستگاه نانودراپ (مدل اپیندورف ساخت کشور آلمان) بررسی شد. همچنین نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و همچنین طول موج ۲۶۰ به ۲۳۰ توسط دستگاه محاسبه شد. بعد از اندازه‌گیری غلظت RNA از تمام نمونه‌ها غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر تهیه شد و از این نمونه‌های هم غلظت شده برای سنتز cDNA استفاده شد.

سنتز cDNA: سنتز cDNA توسط کیت سنتز cDNA دو رشته‌ای شرکت سیناکلون بر اساس دستوالعمل شرکت سازنده انجام شد. جهت بررسی کیفیت cDNAهای سنتز شده از نمونه‌های cDNA سنتز شده، PCR با استفاده از آغازگر ژن کنترل داخلی 18 sRNA صورت گرفت (جدول ۳) برنامه دمایی مورد استفاده در دستگاه PCR بر اساس جدول ٤ بود و نتیجه محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. بعد از تایید کیفیت cDNA های سنتز شده غلظت آنها توسط دستگاه نانودراپ (مدل اپیندورف ساخت کشور آلمان) مشخص شد سپس جهت انجام واکنش qPCR تمام نمونه‌ها هم غلظت شدند. برای تهیه استانداردهای واکنش qPCR از یکی از تیمارها برای ژن SAPK1 واکنش PCR با استفاده از مسترمیکس PCR و آغازگرهای مربوط به ژن انجام شد (جدول ۳). برنامه دمایی دستگاه PCR بر اساس جدول ٤ بود. بعد از اینکه محصول PCR توسط

الکتروفورز ژل آگارز بررسی و نوار مربوط به ژن تایید شـد محصـول این PCR جهت تهیه اسـتاندارد برای واکنش qPCR در رقـت‌هـای (۱۰۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ نانوگرم بر میکرولیتر) استفاده شد.

جدول ۳- میزان بهینه اجزاء واکنش PCR

Table 3- The optimal amount of PCR reaction components

اجزاء Components	میزان (میکرولیتر) amount (µl)
2x Taq Master Mix PCR (مسترمیکس واکنش زنجیره‌ای پلی مراز)	12
Forward Primer آغازگر پیشرو	1
Revers Primer آغازگر معکوس	1
cDNA Template نمونه cDNA	1
Nuclease free water آب مقطر	10
مجموع Total	25

جدول ٤. برنامه دمایی مورد استفاده در دستگاه PCR

Table 4- Temperature program used in the PCR device

	دما (درجه سانتی گراد) Temperature (°C)	زمان Time	تعداد سیکل Number of cycles
Initial denaturing (واسرشته شدن اولیه)	94	5 min	1
Denaturing (واسرشتگی)	94	30 sec	35
Annealing (اتصال)	58	30 sec	35
Extension (تکثیر)	72	30 sec	35
Final extension (تکثیر نهایی)	72	10 min	1

انجام واکنش qPCR: جهت انجام واکنش qPCR نیز از مسترمیکس سایبرگرین (Real Q Plus 2x Master Mix Green) و آغـازگر مربوط به ژن و آغازگر ژن کنترل داخلی اسـتفاده شـد (جدول۵) برنامه دمایی دسـتگاه qPCR نیز بر اسـاس (جدول ٦) تنظیم شـد. تجزیه نتایج واکنش qPCR با اسـتفاده از روش لیواک توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ انجام شد (۱۸).

ΔCT (تنش)=CT (ژن اصلی) – CT (ژن کنترل داخلی)

ΔCT (بدون تنش)=CT (ژن اصلی) – CT (ژن کنترل داخلی)

ΔΔCT =ΔCT (تنش) – ΔCT (بدون تنش)

Ct : شـماره سـیکلی که تشـعشعات فلوئرسانس خط آستانه را قطع می‌کنند ژن اصلی: ژن SAPK1 ژن کنترل داخلی: ژن 18S rRNA تنش: تنش شوری بدون تنش: شرایط کنترل شده با آب مقطر

جدول ۵- میزان بهینه اجزاء واکنش qPCR

Table 5- The optimal amount of qPCR reaction components

اجزاء Components	میزان (میکرولیتر) amount (µl)
Real Q Plus 2x Master Mix Green مسترمیکس سایبرگرین	12.5
Forward Primer آغازگر پیشرو	1
Revers Primer آغازگر معکوس	1
CDNA Template نمونه CDNA	5
Nuclease free water آب مقطر	5.5
مجموع Total	25

جدول ٦ – برنامه دمایی مورد استفاده در آزمایش qPCR

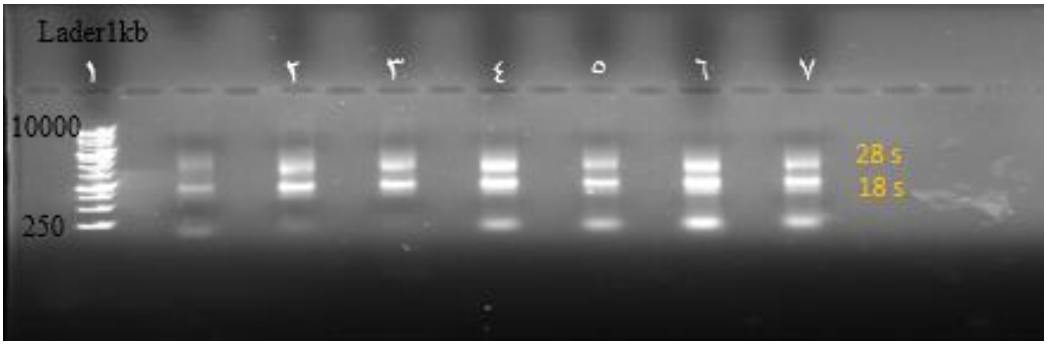
Table 6 - Temperature program used in the qPCR experiment

	دما (درجه سانتی گراد) Temperature (°C)	زمان Time	تعداد سیکل Number of cycles
Initial denaturing (واسرشته شدن اولیه)	95	15 min	1
Denaturing (واسرشتگی)	95	30 sec	40
Annealing (اتصال)	58	30 sec	40
Extension (تکثیر)	72	30 sec	40
Melting curve (منحنی ذوب)	55-95	هر ۵ ثانیه ۰/۵ درجه	1

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش توسط نرم افزارهای آماری SPSS ورژن ۲۳ و SAS ورژن ۹ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

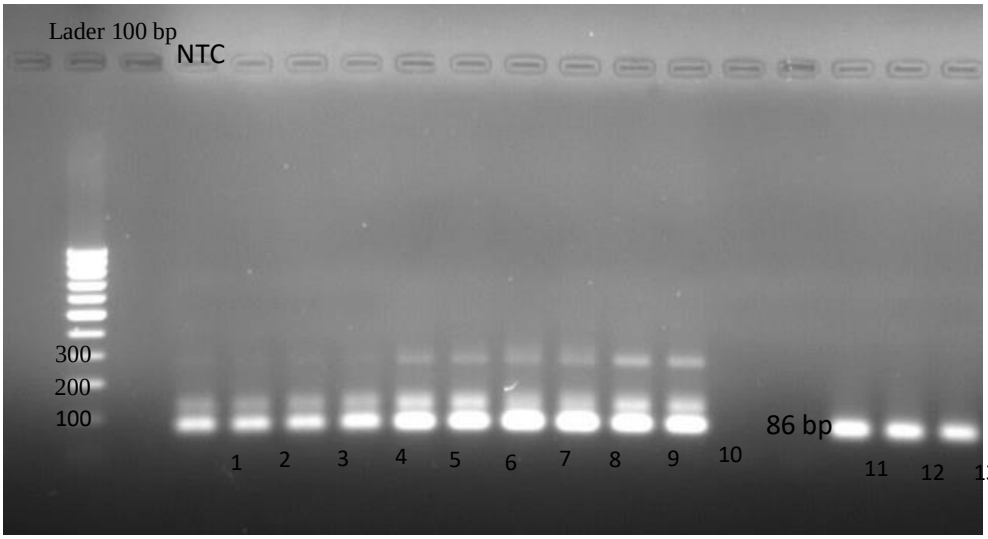
نتایج

نتایج الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد وجود نوارهای ۱۸S و ۲۸S را نشان داد که بیانگر کیفیت مناسب RNA استخراج شده می‌باشد (شکل ۱). طول آغازگر طراحی شده برای ژن کنترل داخلی 18 SrRNA ۸٦ bp بود که بررسی کیفیت cDNA سنتز شده با آغازگر ژن 18SrRNA توسط الکتروفورز ژل آگارز برای این محصول PCR وجود نوار ۸٦ bp را نشان داد این نتایج کیفیت مناسب cDNA سنتز شده را نشان داد (شکل ۲). در شکل (۲) NTC نمونه کنترل است یعنی همه ترکیبات PCR را بجز نمونه cDNA دارد و چون نمونه NTC فاقد نوار است یعنی طراحی آغازگر به درستی صورت گرفته است و نوارهایی که بالای نوار اصلی قرار دارند آلودگی ناشی از وسایل آزمایشی است.



شکل ١- نتایج الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد (چاهک شماره ١ Lader و چاهک‌های ٢ تا ٧ نمونه RNA استخراج شده تیمارهای مختلف شوری به ترتیب چاهک ٢ تیمار شاهد، چاهک ٣ تیمار شوری ٣ دسی‌زیمنس بر متر، چاهک ٤ و ٥ تیمار شوری ٦ دسی‌زیمنس بر متر و چاهک ٦ و ٧ تیمار شوری ٩ دسی‌زیمنس بر متر می‌باشند)

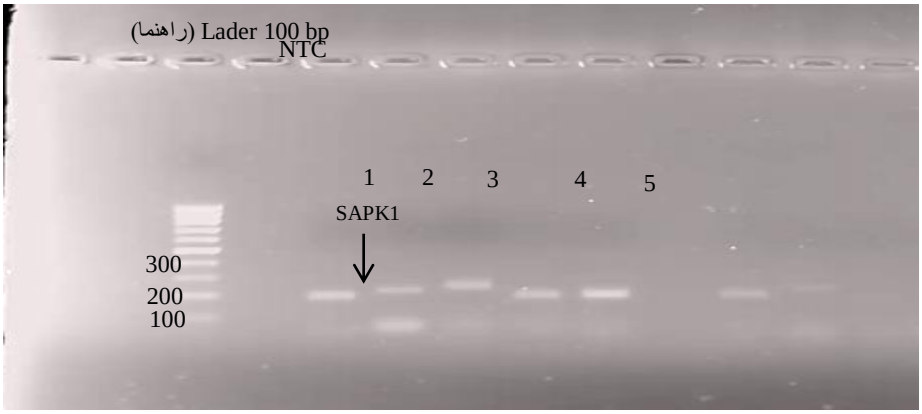
Figure 1- Results of RNA electrophoresis extracted on 1% agarose gel (Number column 1 Lader and columns 2 to 7 extracted RNA samples of different salinity treatments, respectively, column 2 is the control treatment, column 3 is the salinity treatment of 3 ds/m, columns 4 and 5 are the salinity treatment of 6 ds/m, and columns 6 and 7 Salt treatment is ds/m)



شکل ٢- نتایج الکتروفورز محصول PCR از cDNA سنتز شده با استفاده از آغازگر ژن کنترل داخلی 18srRNA (چاهک ١تا٣ نمونه تیمار شاهد، چاهک ٤تا ٦ نمونه تیمار ٣ دسی‌زیمنس بر متر، چاهک ٧تا ١٠ تیمار ٦ دسزیمنس بر متر، چاهک ١١ تا ١٣ تیمار ٩ دسی‌زیمنس بر متر)

Figure 2- Electrophoresis results of PCR product from cDNA synthesized using internal control gene primer 18srRNA (columns 1 to 3 samples of the control treatment, columns 4 to 6 samples of the treatment 3 ds/m, columns 7 to 10 samples of the treatment 6 ds/m, wells 11 to 13 samples of the treatment 9 ds/m)

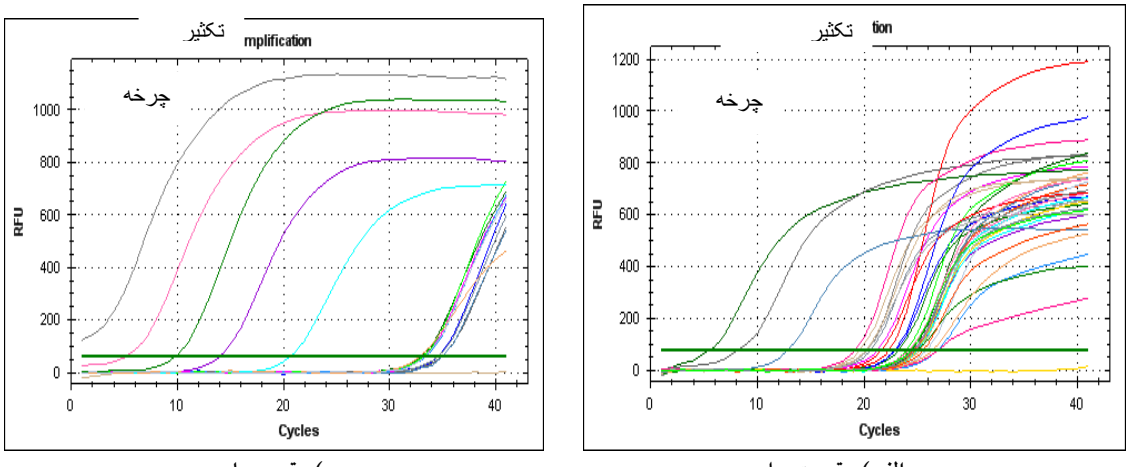
وجود نوار مناسب برای ژن SAPK1 نشان دهنده سنتز درست آغازگر طراحی شده بود (شکل ٣) از این محصول PCR برای درست کردن استانداردهای qPCR در ٤ رقت مختلف استفاده شد. NTC نمونه کنترل است یعنی همه ترکیبات PCR را بجز نمونه cDNA دارد و چون نمونه NTC فاقد نوار است یعنی طراحی آغازگر به درستی صورت گرفته است (شکل٣).



شکل ۳- نتایج الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر ژن SAPK1 (چاهک شماره یک نمونه cDNA مربوط به ژن SAPK1 و چاهک‌های ۲ تا ۵ نمونه های cDNA مربوط به سایر ژن‌های گروه ژنی پروتئین کیناز می‌باشند)

Figure 3- Results of PCR product electrophoresis using the SAPK1 gene primer (number column one is the cDNA sample related to the SAPK1 gene and columns 2 to 5 are the cDNA samples related to other genes of the protein kinase gene group)

نتایج واکنش qPCR: بررسی منحنی تکثیر ژن مورد مطالعه و ژن کنترل داخلی نشان داد که تکثیر به شیوه درست و با عملکرد مناسب صورت گرفته است. با افزایش چرخه‌های تکثیر روند تکثیر افزایش یافت که نشان دهنده وجود تکثیر غیر اختصاصی بود (شکل ٤). بررسی منحنی ذوب برای ژن کنترل داخلی و ژن مورد مطالعه وجود یک نقطه اوج را بالاتر از خط آستانه نشان داد که نشان دهنده تکثیر اختصاصی آنها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است (شکل ۵). دمای ذوب نزدیک به ۸۱ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین وجود یک پیک ذوب در این منحنی بیانگر طراحی درست آغازگر برای ژن و عدم آلودگی می‌باشد. بررسی منحنی استاندارد در تمام تیمارها و در هر دو رقم متحمل و حساس نشان داد تیمارها بر روی خط رگرسیون واقع شده که غلظت مناسب نمونه‌ها و تکثیر اختصاصی آنها را تایید می‌کند.

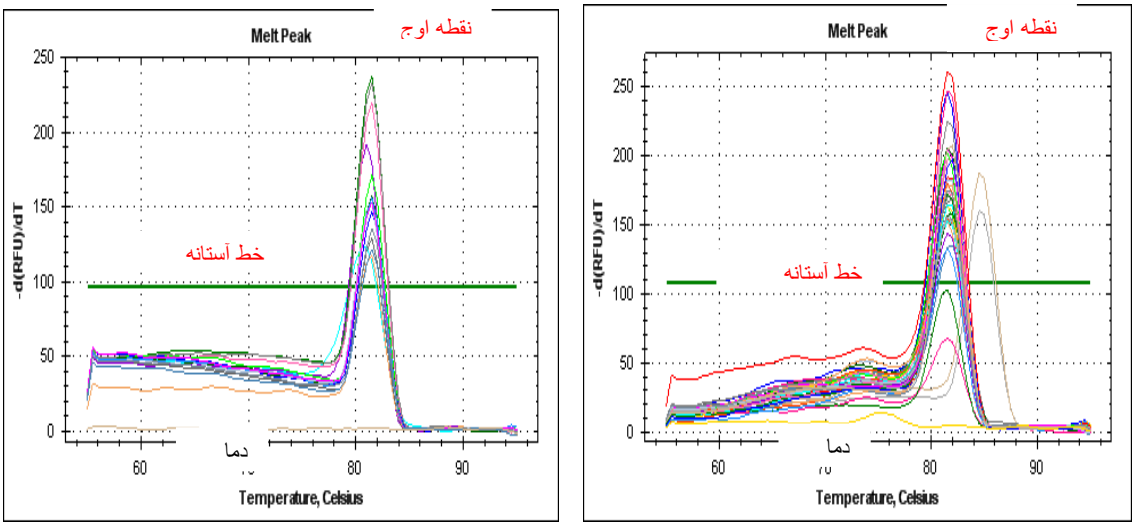


ب) رقم حساس

الف) رقم متحمل

شکل ٤- منحنی تکثیر ژن SAPK1 الف) در رقم متحمل ب) در رقم حساس

Figure 4- The amplification curve of SAPK1 gene in two tolerant (a) and sensitive (b) cultivars

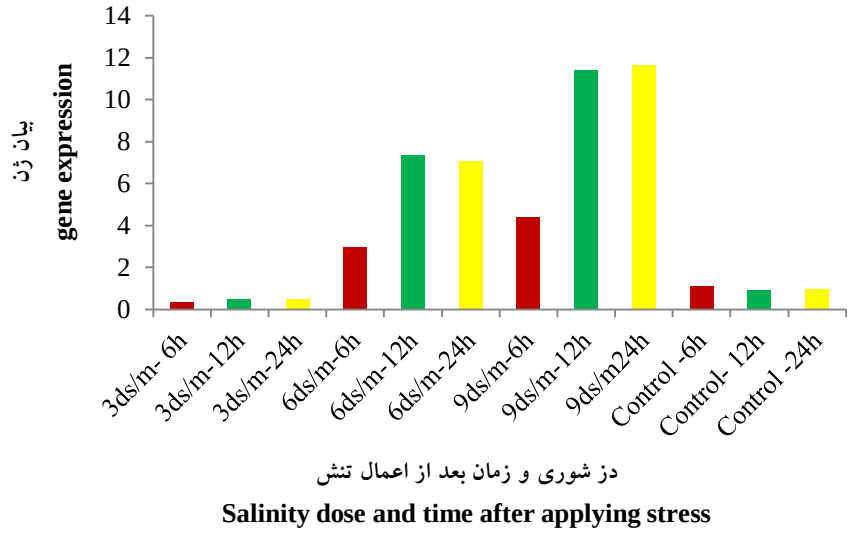


ب)رقم حساس　　الف) رقم متحمل

شکل ۵- منحنی ذوب ژن SAPK1 الف) در رقم متحمل ب) در رقم حساس

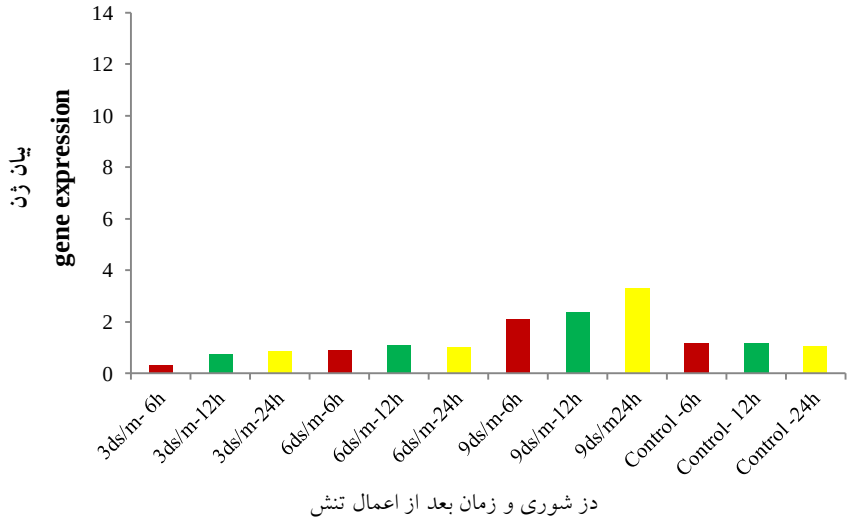
Figure 5- Melting curve of SAPK1 gene in two tolerant (a) and sensitive (b) cultivars

تجزیه نتایج واکنش qPCR با استفاده از روش لیواک توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ جهت بررسی الگوی بیان ژن SAPK1 نشان داد که در رقم متحمل شصتک محمدی در سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش بیشترین میزان بیان ژن مشاهده گردید (شکل٦) و در رقم حساس IR29 نیز در سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش بیشترین میزان بیان ژن مشاهد شد (شکل ۷) با بررسی سطوح مختلف تنش شوری در سه زمان مختلف نمونه برداری مشخص شد در تیمار شاهد (بدون تنش شوری) میزان بیان ژن در هر دو رقم متحمل شصتک محمدی و حساس IR29 هیچ تفاوتی با همدیگر نشان نداد (شکل ٦ و ۷). همچنین در سطح شوری ۳ دسی‌زیمنس بر متر نیز بین دو رقم متحمل و حساس تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ٦ و ۷). اما در سطح شوری ٦ دسی‌زیمنس بر متر ٦ ساعت بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن در رقم متحمل نسبت به رقم حساس و تیمار شاهد (بدون تنش) ۳ برابر افزایش داشت. بررسی بیان ژن ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن را در رقم متحمل نسبت به رقم حساس و تیمار شاهد حدود ۷ برابر بیشتر نشان داد (شکل ٦ و ۷). در سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر ٦ ساعت بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن در رقم متحمل نسبت به رقم حساس دو برابر بیشتر و نسبت به تیمار شاهد ٤ برابر بیشتر شد ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش نیز میزان بیان ژن در رقم متحمل نسبت به رقم حساس حدود ۵ برابر و نسبت به تیمار شاهد حدود ۱۰ برابر بیشتر شد (شکل ٦ و ۷). این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش سطح شوری میزان بیان ژن SAPK1 در گیاه برنج افزایش می‌یابد همچنین بررسی اثر زمان بعد از اعمال تنش بر میزان بیان ژن SAPK1 نشان داد در ساعات اولیه بعد از اعمال تنش میزان بیان ژن ناچیز بود اما با افزایش زمان تا ۲٤ ساعت بیان ژن افزایش یافت. بررسی منحنی ذوب ژن SAPK1 در هر دو رقم متحمل و حساس نشان داد دمای ذوب که در آن ۵۰ درصد دو رشته‌ای‌ها تک رشته‌ای می‌شوند حدود ۸۱ درجه سانتی‌گراد است و همچنین وجود یک نقطه اوج در این منحنی نشان دهنده طراحی درست آغازگر برای ژن و عدم آلودگی می‌باشد (شکل۵).



شکل ٦- میزان بیان ژن SAPK1 در رقم متحمل شصتک محمدی

Figure 6- SAPK1 gene expression level in the tolerant cultivar Shastak Mohammadi



شکل ۷- میزان بیان ژن SAPK1 در رقم حساس IR29

Figure 7- SAPK1 gene expression level in the sensitive cultivar IR29

نتایج تجزیه واریانس: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان بیان ژن SAPK1 در هر دو رقم متحمل شصتک محمدی و حساس IR29 برنج تحت تنش شوری نشان داد که اثر زمان، شوری و برهمکنش زمان در شوری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شدند (جدول۷). این نشان دهنده این است میزان بیان ژن SAPK1 تحت تاثیر سطوح مختلف شوری و در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش تغییر معنی‌دار پیدا می‌کند. مقایسه میانگین برهمکنش زمان در شوری نشان داد در رقم متحمل بیشترین میانگین مربوط به سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش و کمترین میانگین نیز مربوط به تیمار شاهد ۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش بود. در رقم حساس نیز بیشترین

میانگین مربوط به سطح شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر تیمار شاهد در هر سه زمان بعد از اعمال تنش بود ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش و کمترین نیز مربوط به (جدول ۸).

جدول ۷- تجزیه واریانس میزان بیان ژن SAPK1 در دو رقم متحمل و حساس برنج تحت تنش شوری

Table 7- Variance analysis of SAPK1 gene expression in two tolerant and sensitive rice cultivars under salt stress

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات رقم متحمل The mean square of the tolerance cultivar	میانگین مربعات رقم حساس The mean square of the sensitive cultivar
زمان time	2	24.857*	1.19*
شوری Salt	3	156.80*	7.58*
زمان * شوری Time * salt	6	9.769*	0.398*
خطا error	24	0.001	0.002
ضریب تغییرات (CV) Coefficient of variation	-	3.72	4.12

* معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

Significance at the 5% probability level

جدول ۸- مقایسه میانگین برهمکنش زمان و شوری در دو رقم متحمل و حساس برنج تحت تنش شوری

Table 8- Mean comparison of salt*time interaction in two tolerant and sensitive rice cultinars under salinity stress

تیمار Treatment	رقم متحمل شصتک محمدی Shastak Mohammadi's tolerant cultivar	رقم حساس IR29 IR29 sensitive cultivar
a_1b_1	1.07g	0.981h
a_1b_2	0.363f	0.343fg
a_1b_3	2.94 d	0.882 de
a_1b_4	5.13 c	2.11b
a_2b_1	0.939gh	0.972 hi
a_2b_2	0.482e	0.339 f
a_2b_3	5.81c	1.117c
a_2b_4	11.39a	2.37b
a_3b_1	0.972gh	0.969hi
a_3b_2	0.489e	0.473 ef
a_3b_3	7.06b	2.05b
a_3b_4	11.63a	3.31a

a_1 تا a_3: زمان (٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) ، b_1 تا b_4: تیمارهای مختلف شوری (کنترل، ۳، ٦ و ۹ دسی‌زیمنس بر متر)

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

a1 to a3 :time (6, 12 and 24 hours after application of salinity stress), b1 to b4 :different salinity treatments (control, 3, 6 and 9 dS/m)

Means in each column, followed by the same letter are not significantly different at the 5% probability level-using LSD, Test.

بحث

تنش شوری با تجمع سدیم در سیتوزول سلول باعث ایجاد سمیت سدیم در گیاه می‌شود. بیان ژن‌هایی با کارکردهای متفاوت مثل ژن‌های تنظیم کننده و ژن‌های مسئول انتقال سیگنال ترارسان باعث ایجاد تحمل به تنش شوری در گیاه می‌شوند (۱۹). طی تنش شوری در گیاهان آوندی مسیر SOS (salt overlay Sensetive) شامل پروتئین کینازهای سرین-ترئونین و باند کلسیم پروتئین‌ها فعال می‌شوند. فعالیت این مسیر در نهایت سبب فعال شدن برخی ترانسپورترها در گیاه خواهد شد (۲۰). پروتئین کینازها به‌عنوان گروهی از آنزیم‌های کیناز پروتئین‌های هدف را با افزودن گروه فسفات فسفریله می‌کنند. این پروتئین‌ها با پروتئین‌های دیگر که غالبا فعال کننده آبشار فسفریلاسیون هستند وارد واکنش می‌شوند. ژن‌های اصلی پاسخ دهنده به تنش یا عوامل رونویسی کنترل کننده‌ی این ژن‌ها در نهایت سبب سازگاری گیاه تحت تنش می‌شوند. این ژن‌ها به زنده‌مانی گیاه و پشت سر گذاشتن شرایط نامطلوب کمک می‌کنند (۲۱). پروتئین کینازها با القای پیام رشد و تکثیر در ارتباطات سلولی نقش مهمی دارند و به‌عنوان تنظیم کننده‌های کلیدی در فرآیندهای سلولی کاربرد دارند (۲۲). ویجایتا و همکاران (۲۰۱۸) بیان ژن‌های مختلف پاسخ دهنده به تنش شوری را با استفاده از روش qPCR در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش شوری در گیاه برنج بررسی کردند نتایج آنها نشان داد ژن‌های HKT2 و1 SOS در تنظیم هموئستازی یون‌های سدیم و پتاسیم و تحمل به تنش شوری نقش دارند (۲۳). نتایج تحقیق حاضر با نتایج کالیست دیهایو و همکاران (۲۰۱٤) که الگوی بیان ژن SAPK4 از گروه ژنی پروتئین کیناز سرین ترئونین را در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری بررسی کردند مطابقت داشت. این محققان بیان ژن SAPK4 را توسط تکنیک qPCR بررسی کردند نتایج انها نشان داد بیان این ژن منجر به تنظیم همئوستازی یونی، رشد و توسعه گیاه تحت تنش شوری می‌شود (۲٤). دنجی لئو و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند که بیان دو ژن SAPK1 و SAPK2 در برنج تحت تنش شوری افزایش می‌یابد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. بیان دو ژن SAPK1 و SAPK2 از طریق اثر بر متابولیت های فعال و اسمزی سبب افزایش رشد و توسعه گیاه و کاهش حساسیت به تنش شوری خواهند شد (۲۵). همچنین نتایج این تحقیق با نتایج لیوو و همکاران (۲۰۱۹) که نقش کلیدی ژن SAPK10 را در گلدهی برنج از طریق آنالیز پروتئین‌های SAPKs القا شده با تنش‌های مختلف از جمله شوری بررسی کردند مطابقت داشت. نتایج آنها نشان داد که بیان بیش از حد ژن SAPK10 در گیاه برنج تحت تنش سبب گلدهی گیاه زودتر از موئد خواهد شد که این در واقع یک نوع مکانیسم دفاعی در گیاه در مقابله با تنش می‌باشد (۲٦). نتایج اوبیدول اسلام و همکاران (۲۰۱۹) نیز که عملکرد ژن تراهلوز (osTRE1) برنج را در واکنش به تنش شوری بررسی کردند با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. این محققان با شناسایی و با تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن تراهلوز (osTRE1) برنج در واکنش به تنش شوری با استفاده از تکنیک qPCR در گیاهچه‌های جوان به این نتیجه رسیدند که بیان این ژن تحت تاثیر تنش شوری افزایش می‌یابد. همچنین تیمارآبسزیک اسید (ABA) بیان این ژن را به طور موقت تنظیم می‌کند (۲۷).

نتیجه‌گیری

این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش سطح شوری میزان بیان ژن SAPK1 در گیاه برنج افزایش می‌یابد همچنین بررسی اثر زمان بعد از اعمال تنش بر میزان بیان ژن SAPK1 نشان داد در ساعات اولیه بعد از

اعمال تنش میزان بیان ژن ناچیز بود اما با افزایش زمان تا ٢٤ ساعت بیان ژن افزایش یافت. بررسی منحنی ذوب ژن SAPK1 در هر دو رقم متحمل و حساس نشان داد دمای ذوب حدود ٨١ درجه سانتی گراد است و همچنین وجود یک پیک ذوب در این منحنی نشان دهنده طراحی درست آغازگر برای ژن و عدم آلودگی می‌باشد.

سپاسگزاری

از اساتید بزرگوار دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان و مسئول محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی که در انجام و ارتقا کیفی این تحقیق ما را یاری نمودند نهایت تشکر و قدردانی داریم.

References

1. Duning, X., Lix, Y., Song, D. & Yang, G. (2007). Temporal and Spatial dynamical simulation of groundwater characteristics in mining oasis. *Science China Earth Sciences, 2,* 261-273.
2. Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology, 59*, 651-681.
3. Mirdar Mansoori, Sh., Babaian Jolodar, N. A. & Bagheri, N. A. (2014). Investigating the effectiveness of yield and yield components of a number of Iranian rice cultivars and lines under salt stress. *Crop Breeding Research Journal, 14*, 67-83. [In Persian]
4. Oleary, J. W. (2016). Adaptive Components of Salt Tolerance, Handbook of Plant and Crop physiology, Marcel Inc. 26, 78-96.
5. Shannon, M. C. & Grieve, C. M. (2018). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae, 78*, 5-38.
6. Lunde, C., Drew, P. D., Jacobs, A.K. & Tester, M. (2009). Exclusion of Na Via Sodium Atpase (Ppena) Ensures normal growth of physcomitrella patens under moderate salt stress. *Plant Physiology, 144*, 1786–1796.
7. Marin, G., Zhang, L., Kato, M., Yamawaki, K., Asai, T., Nishikawa, F., Ikoma, Y.I. & Matsumoto, H. (2010). Effects of 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and Ethylene on Postharvest Lignification of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Postharvest Biology and Technology*, 58(2), 121-128.
8. Kovach, M. J., Sweeney, M.T. & Mccouch, S. R. (2017). New insights into the history of rice domestication. *Tends in Genetics, 23,* 578-587.
9. Tai, S., Liu, G. S., Sun, Y. & Chen, J. (2015). Cloning and expression of calcium – dependent protein kinase (CDPK) gene family in common tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Agricultural Sciences in China, 12*, 1448-1457.
10. Shuai, CH., Liu, G. S., Sun, Y. & Chen, J. (2015). Cloning of a Calcium-Dependent Protein Kinase Gene NtCDPK12, and Its Induced Expression by High-Salt and Drought in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Integrative Agriculture, 12,* 1448-1457.
11. Azad, A., Kazemi Tabar, S. K., Alamzadeh, A. & Kazemini, A. (2013). Identification and statistical analysis of cis-acting elements of female serine/threonine protein kinase initiators in maize. The first international congress and the 13th Iran genetics congress. 14, 87-103. (In Persian)
12. Yousfi, S., Márquez, A. J., Betti, M., Araus, J. L. & Serret, M. D. (2016). Gene Expression and Physiological Responses To Salinity And Water Stress of Contrasting Durum Wheat Genotypes. *Journal of Integrative Plant Biology, 54*, 114-129.
13. Telci, I., Bayram, E., Yilmaz, G. & Avc, B. (2014). Variability in essential oil composition of Turkish basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemical Systematics and Ecology, 34*, 489-497.
14. Wang, W.X., Vinocur, B. & Altman, A. (2013). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta, 218,* 1-19.
15. Dengji, L., Houping, V. & Diqiu, Y. (2018). The sucrose non-fermenting-1-

related protein kinases SAPK1 and SAPK2 function collaboratively as positive regulators of salt stress tolerance in rice. *BMC Plant Biology, 18,* 203-221.

16. Mirdar Mansoori, Sh., Babaian Jolodar, N. A. & Bagheri, N. A. (2014). Investigating the effectiveness of yield and yield components of a number of Iranian rice cultivars and lines under salt stress. *Crop Breeding Research Journal, 14,* 67-83. [In Persian]
17. Saidipour, S. (2017). The effect of salinity stress on yield, concentration and distribution of some elements in different organs of two rice cultivars. *Crop Physiology Journal, 9,* 27-40.
18. Livak, K. & Thomas, D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta ct}$ Method. *Applied Bio systems, 25*, 402-409.
19. Roy, S. J., Negrao, S. & Tester, M. 2014. Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Chemical Biology, 26*, 115-24.
20. Lunde, C., Drew, P. D., Jacobs, A. K. & Tester, M. (2009). "Exclusion Of Na Via Sodium Atpase (Ppena) Ensures Normal Growth Of *Physcomitrella* Patens Under Moderate Salt Stress. *Plant Physiology Journal, 144*, 1786–1796.
21. Ohsugi, R., Hirochika, H., Ichikawa, H., Komatsu, S., Aoki, N., Nakamura, H., Hakata, M. & Asano, T. (2011). Functional characterization of os CPK21 a calcium dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology, 75*,179-191.
22. Azad, A., Kazemi Tabar, S. K., Alamzadeh, A. & Kazemini, A. (2013). Identification and statistical analysis of cis-acting elements of female serine/threonine protein kinase initiators in maize. The first international congress and the 13th Iran genetics congress. 14, 87-103. [In Persian]
23. Vijayata, S., Ajit Pal, S., Jyoti, B., Jitender, G., Jogendra, S., Vineeth, T. V. & Sharma, P. C. (2018). Differential expression of salt-responsive genes to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive rice (*Oryza Sativa* L.) at seedling stage. *Protoplasma, 255*, 1667–1681.
24. Calliste, D., Olga, V., Karl-Josef, D. & Dortje, G. (2014). The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. *BMC Plant Biology, 89*, 998-118.
25. Dengji, L., Houping, V. & Diqiu, Y. (2018). The sucrose non-fermenting-1-related protein kinases SAPK1 and SAPK2 function collaboratively as positive regulators of salt stress tolerance in rice. *PMC Plant Biology, 18,* 203-221.
26. Liu, X., Li, Z., Hou, Y., Wang, Y., Wang, H., Tong, X. & Zhang, J. (2019). Protein interatomic analysis of SAPKs and ABA-Inducible bZIPs revealed key roles of SAPK10 in rice flowering. *Internatinoal Molecular Science Journal*, *58*, 875-892.
27. Obaidul Islam, M., Hideki, K., Shuhei, S. H., Daisuke, T., Hirokazu, M. & Ryozo, I. (2019). Functional identification of a rice trehalase gene involved in salt stress tolerance. *Genetics*, *685*, 42–49.