

بررسی اثر پیش تیمار اپی‌براسینولید و اسپرمین بر برخی پارامترهای رشدی، فیزیولوژیکی و بیان ژن SOS1 و NHX1 در گیاه کدو (*Cucurbita pepo* L.) تحت تنش شوری

فاطمه نژادعلیمرادى^{۱*}، فاطمه نصیبی^۲، محبوبه شیخ بهایی^۳

چکیده

مقدمه: پتانسیل مثبت براسینواستروئیدها و پلی آمین ها به‌عنوان عوامل محافظ برای تنش‌های محیطی ثابت شده است. **روش‌ها:** در این پژوهش، گیاه *Cucurbita pepo* با ۲۴-اپی‌براسینولید (EBL) (۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میکرومولار) و اسپرمین (Spm) (۰ و ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار) پیش تیمار و سپس تیمار شوری (۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار سدیم کلرید)، اعمال شد. **نتایج و بحث:** تنش شوری، وزن خشک، مقدار پتاسیم و کلسیم را کاهش و محتوای سدیم را افزایش داد. EBL و Spm منجر به افزایش پتاسیم، کلسیم و کاهش سدیم اندام هوایی شد. تنش شوری بیان ژن SOS1 ریشه را افزایش داد و اثری بر بیان ژن NHX1 نداشت. EBL و Spm بیان ژن SOS1 را کاهش Spm بیان ژن NHX1 را افزایش داد؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد Spm از طریق بیش بیان ژن NHX1 و کده‌بندی یون Na^+ اضافی به درون واکوئل و حفظ محیط مطلوب‌تر منجر به افزایش مقاومت به تنش شوری و بهبود رشد گیاه می‌شود.

واژه های کلیدی: پلی آمین، تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی، تنش اسمزی، ژن ناقل سدیم

^۱ . استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران * نویسنده مسئول: alimoradi@pnu.ac.ir

^۲ . دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

^۳ . دانشجوی دکتری ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مقدمه

تنش شوری منجر به تغییراتی در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی، متابولیکی (Munns, 2005) و در نهایت مهار تولید محصول می‌شود (Rasool *et al.*, 2022). سمیت نمک می‌تواند منجر به کاهش سطح برگ فتوسنتزکننده و مرگ برگ‌ها و در نهایت کاهش موجودی و ذخیره‌ی مواد فتوسنتزی گیاه شود که در نتیجه، توازن کربن کل را که برای حفظ رشد و نمو گیاه ضروری است، تحت تأثیر قرار می‌دهد (Munns, 2002). علت صدمه و مرگ برگ‌ها احتمالاً به دلیل بارگیری بالای نمک در برگ است که فراتر از ظرفیت کده‌بندی نمک در واکوئل‌هاست و منجر به تجمع نمک در سیتوپلاسم تا حد سطوح سمی و در نهایت مرگ برگ می‌شود (Munns *et al.*, 2006). شواهدی مبنی بر نقش‌های مسیر سیگنالینگ، تنش بیش از حد حساس به نمک (SOS) در هومئوستازی یون و تحمل نمک گزارش شده است (Hasegawa *et al.*, 2000). ژن *SOS1* که یک پادبر Na^+/H^+ غشای پلاسمایی را کد می‌کند، در تنظیم برون‌شارش Na^+ در سطح سلولی ضروری است و همچنین انتقال طولانی فاصله Na^+ از ریشه به اندام هوایی را تسهیل می‌کند. بیش‌بیان این پروتئین تحمل به شوری را در گیاهان افزایش می‌دهد (Shi *et al.*, 2002). یون K^+ نقش مهمی در حفظ تورژسانس در داخل سلول ایفا می‌کند. این یون با شیب غلظت از طریق کانال‌های غشایی و ناقل K^+ به درون سلول گیاهی منتقل می‌شود. گزارش شده است که پروتئین‌های NHX داخل سلولی پادبرهای Na^+/H^+ یا K^+/H^+ هستند که در هومئوستازی K^+ ، تنظیم pH اندوزومی، و تحمل شوری حائز اهمیت هستند (Gupta & Huang, 2014). پروتئین‌های NHX واقع در تونوپلاست (NHX1 و NHX2: دو ایزوفرم اصلی NHX واقع در تونوپلاست) در جذب فعال K^+ در تونوپلاست، برای تنظیم تورژسانس و عملکرد روزنه ضروری می‌باشند (Barragán *et al.*, 2012). هومئوستازی یون با واسطه‌ی دسته دوم NHX در اجزاء اندوزومی، تردد پروتئین از گلژی/شبکه ترانس گلژی به واکوئل را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این کنش به مواجهه‌ی گیاهان با تنش شوری به دلیل کمبود در ذخیره یا موجودی اجزاء ضروری مانند AtNHX1 به درون واکوئل می‌تواند منجر به افزایش حساسیت به شوری شود (Bassil *et al.*, 2011).

براسینواستروئیدها تنظیم‌کننده‌های مهم رشد گیاه (Mohammadi *et al.*, 2021) در مقادیر نانومولار تا میکرومولار در فرایندهای نموی متعدد، از جمله تقسیم سلولی، طویل شدن سلول (Manghwar *et al.*, 2022)، تمایز آوندی، نمو زایشی و تنظیم و تعدیل بیان ژن هستند (Müssig, 2005). این ترکیبات همچنین منجر به پاسخ سازشی به تنش‌های زیست‌محیطی مانند، تنش شوری، تنش فلزات سنگین، تنش دمایی، تنش خشکی، عفونت پاتوژنی (Fariduddin *et al.*, 2013) و تنش اکسیداتیو می‌شوند (Manghwar *et al.*, 2022). گزارش شده است که براسینواستروئیدها همچنین نسبت $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ و نسبت K^+/Na^+ ارقام گندم را از طریق افزایش جذب K^+ و Ca^{2+} و کاهش جذب Na^+ بهبود می‌بخشد که در افزایش تحمل شوری بسیار مهم است. پلی‌آمین‌ها در تمام موجودات زنده وجود دارند و برای رشد و نمو در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها حائز اهمیت هستند. فراوان‌ترین پلی‌آمین‌ها در باکتری‌ها پوترسین و اسپرمیدین هستند و طیف وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی در رشد و نمو گیاه، شامل رشد، جنین‌زایی، نمو اندام، پیری، تنش‌های زیست‌محیطی، آلودگی قارچی و ویروسی، تحریک همانندسازی DNA، فرایندهای رونویسی و ترجمه را در برمی‌گیرد. از طرفی پلی‌آمین‌ها پاسخ‌های فیزیولوژیکی متنوعی، شامل تشکیل غده، ریشه‌زایی،

جنین‌زایی، نمو گل، رسیدگی میوه، اندام‌زایی و پاسخ‌های تنش‌زیستی و غیر زیستی را تحریک می‌کنند. پلی‌آمین‌ها نقش اساسی در تنظیم پاسخ‌های دفاعی گیاهان به تنش‌های زیست‌محیطی متنوع شامل سمیت فلزی، تنش اکسیداتیو، خشکی، شوری و تنش سرما دارند (Liu et al., 2007; Farzi-Aminabad et al., 2021). گیاه کدو (*Cucurbita pepo* L.) از تیره‌ی Cucurbitaceae. به دلیل استفاده خوراکی و دارویی آن، یک محصول زراعی مهم اقتصادی می‌باشد و به‌ویژه در مرحله‌ی استقرار گیاهچه، حساس به شوری است، بنابراین، توسعه روش‌هایی برای اجتناب یا کاهش آسیب تنش شوری و پیدا کردن اصول فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تحمل به شوری در این گیاه از اهمیت نخست این بررسی هستند. در این مطالعه، اسپرمین به دلیل اینکه یک تترا آمین با ظرفیت بافری بیشتری است و از طرفی تحقیق بر روی اسپرمین بسیار کمتر از دو پلی آمین دیگر انجام شده است این پلی آمین انتخاب شد. نقش پلی‌آمین‌ها و براسینواستروئیدها در کاهش اثرات بسیاری از تنش‌های محیطی ثابت شده است اما در مورد نقش این مواد در افزایش یا کاهش مقاومت به تنش شوری در گیاه کدو طبعی اطلاعات محدودی وجود دارد. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی میزان تأثیر احتمالی ماده اسپرمین و اپی‌براسینولید در کاهش اثرات شوری در گیاه کدو طبعی است.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و تیماردهی

بذرهای گیاه کدوی تخم پوست‌کاغذی (*Cucurbita pepo*) از مرکز تحقیقات کشاورزی پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذر های یک اندازه به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی و سپس با آب مقطر شسته شدند. پس از آن در ظرف پتری‌های حاوی دو لایه کاغذ صافی مرطوب‌شده با آب مقطر، به مدت ۴۸ ساعت، در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به منظور جوانه‌زنی قرار گرفتند. بعد از سبز شدن، به ظروف پلاستیکی حاوی محلول غذایی هوگلند با رقت ۱/۲ تحت کشت هیدروپونیک منتقل و با پمپ هوا، هوادهی شدند. آزمایش در یک محیط کنترل‌شده با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد)، ۸ ساعت تاریکی (دما ۲۰ درجه سانتی‌گراد) و ۷۰/۶۰ درصد رطوبت نسبی رشد کردند. پس از ۱۰ روز رشد، گیاهچه‌های با اندازه یک‌نواخت، با محلول‌های مختلف به مدت ۵ روز پیش‌تیمار شدند: (۱) کنترل: محلول غذایی هوگلند با رقت ۰/۵ (سیگما) Spm (۲) (سیگما) ۰/۱ میلی‌مولار، (۳) Spm (۱ میلی‌مولار) حل شده در آب، (۴) EBL (سیگما) ۰/۱ میلی‌مولار و (۵) EBL (۰/۱ میلی‌مولار) حل شده در اتانول. مواد ذکر شده به محلول هوگلند اضافه شدند. بعد از ۵ روز پیش‌تیمار Spm و EBL، گیاهچه‌های تمام گروه‌ها با مقادیر متفاوت کلرور سدیم (صفر میلی‌مولار (کنترل)، ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار) تیمار شدند. در این تیمارها نیز نمک کلرور سدیم به محلول غذایی تازه اضافه شد. برای انتخاب تیمارهای مختلف، بهینه‌سازی در مطالعه‌ی مقدماتی انجام شد. با توجه به این‌که در مطالعات مورفو-فیزیولوژیکی، اثر سطح بالای شوری (۸۰ میلی‌مولار) قابل توجه بود، همچنین در مطالعه مقدماتی اثر بر هم‌کنش هر دو تنظیم‌کننده‌ی رشد در مرحله بهینه‌سازی، در غلظت پایین Spm (۰/۱ میلی‌مولار) و EBL (۰/۱ میلی‌مولار) با اثر مثبت مشاهده شد، بنابراین یک سطح شوری و سطح پایین غلظت هر دو تنظیم‌کننده رشد در مرحله مطالعات مولکولی انتخاب و بررسی شدند. محلول غذایی حاوی مواد فوق در هر تیمار (با ۳ تکرار) هر ۲ روز یک‌بار تعویض شد. ۷ روز پس از شروع تیمار شوری، ساقه و ریشه‌ی گیاهان با آب مقطر شسته شدند و برگ سوم کاملاً توسعه یافته و بخش میانی ریشه بلافاصله در ازت مایع منجمد شد و در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری‌های بعدی

نگهداری شدند. وزن تر ریشه و اندام هوایی نیز در هر گیاه کدوی تیمار شده، با ترازوی Sartorius (مدل BPSIID) با دقت ۰/۰۰۱ گرم، بر حسب گرم برای هر گیاه سنجش شد. از این نمونه‌ها برای فریز کردن و استفاده در آنالیزهای بعدی استفاده شد.

تعیین میزان سدیم، پتاسیم و کلسیم

به روش هضم اسیدی و با دستگاه جذب اتمی مدل (Spectra AA 220, Varian, Australia) یون‌ها اندازه‌گیری شدند. مقدار یون‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش گردید (Zheljazkov & Nielsen, 1996).

مطالعات مولکولی

از آنجاکه توالی ژن‌های موردنظر نامشخص بود، آغازگرها بر اساس توالی‌های ژن موجود از سایر گیاهان و بر اساس اصول ذکر شده طراحی گردیدند. اگرچه اولویت با گیاهان هم‌جنس یا هم‌خانواده است اما به دلیل در دسترس نبودن توالی‌های ژن مدنظر در پایگاه داده‌ها، آغازگرهای اختصاصی پیش برنده و برگرداننده‌ی ژن‌های *EF1α*، *SOS1* و *NHX1* بر اساس آرایه بندی متعدد از نقاط حفاظت شده موجود در توالی‌های همساخت (همساخت‌های *NHX1* (accession no: AB199912.1,)) و همساخت‌های *SOS1* (accession no: NM_001305732.1,))، همساخت‌های *EF1α* (accession no: XM_007225368.1, XM_006379735.1, GU004542.1, KT003582.1) و همساخت‌های *EF1α* (accession no: XM_008459007, XM_008465698) از بانک ژن NCBI گرفته و طراحی شد. هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW2 صورت گرفت. بر اساس نقاط حفاظت شده موجود، آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار Geneious طراحی گردیدند و سپس مناسب بودن آن‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزارهای BLAST و IDT بررسی شد. برای مطالعه‌ی بیان ژن، آغازگر مناسب طراحی و از ژن *EF1α* به‌عنوان ژن مرجع استفاده گردید. سنتز آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت پیشگام صورت گرفت. از این آغازگرها برای شناسایی و جداسازی ژن همساخت *SOS1* و *NHX1*، از RT-PCR استفاده شد. بدین منظور، ابتدا RNA کل، از ریشه استخراج سپس از روی mRNA های موجود DNA مکمل (cDNA) ساخته شد و از آن به همراه آغازگرهای مربوطه در واکنش‌های مختلف PCR برای شناسایی ژن هدف استفاده گردید. RNA کل از ریشه‌ی تازه‌ی گیاه کدو با استفاده از کیت استخراج RNA (Qiagene, RNeasy Plant Mini Kit, Germany) به روش ذکر شده در کیت استخراج شد. برای بررسی حضور و ارزیابی خلوص و تعیین غلظت RNA از روش‌های اسپکتوفتومتری با دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000C BioRad, PowerPac) (Spectrophometer, Thermo Scientific, USA) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز افقی (Universal, USA) روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. پس از الکتروفورز، کیفیت RNA با استفاده از دستگاه ژل اسکن مدل MO25889 (UVitec BTS) بررسی شد (Sambrook, 2001). به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA از آنزیم DNase شرکت تاکارا (TAKARA Bio Inc. DNase I, RNase-free) استفاده شد.

برای انجام RT-PCR، از RNA کل استخراج شده از ریشه که با آنزیم DNase تیمار شده بود استفاده شد. بدین منظور با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand CDNA Synthesis Kit) و طبق روش ذکر شده در آن از روی RNA تیمار شده، رشته اول cDNA تهیه گردید. در نهایت از این cDNA در PCR به‌عنوان DNA الگو استفاده شد.

مراحل ساخت cDNA به صورت زیر است: مقدار ۶ میکرولیتر از RNA تیمار شده با DNase به همراه ۱ میکرولیتر آغازگر oligo(dT)18 و ۵ میکرولیتر آب دیونیزه در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری ریخته و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۶۵ قرار گرفت. این دما موجب از بین رفتن ساختارهای ثانویه RNA می شود. بلافاصله میکروتیوب حاوی مواد به مدت ۲ تا ۳ دقیقه به روی یخ قرار گرفت. این مرحله موجب اتصال آغازگرهای Oligo(dT)18 به RNA می شود. آغازگر Oligo(dT)18 با اتصال به دم پلی A موجود در سمت ۳ mRNA های یوکاریوتی، موجب ساخت cDNA از روی این mRNA ها می شود. در این مرحله ۴ میکرولیتر بافر آنزیم (5X Reaction Buffer)، ۱ میکرولیتر RiboLock RNase Inhibitor (20 u/μl)، ۲ میکرولیتر dNTP (10 mM dNTP Mix و ۱ میکرولیتر RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/μl) به میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای °C ۴۲ قرار گرفت. در دمای مذکور، آنزیم RT (Reverse transcriptase) به دنبال آغازگر oligo(dT)18 و با استفاده از dNTP ها از روی mRNA های موجود، cDNA را می سازد. واکنش پایانی به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۷۰ انجام گرفت. واکنش های تیمار RNA برای حذف آلودگی DNA و ساخت cDNA در دستگاه ترموسایکلر مدل PTC 1148 (MJ Mini Personal Thermal Cycler BioRad, USA) انجام شد. واکنش PCR نیز با استفاده از کیت PCR شرکت تاکارا (EmeraldAmp® (GT PCR Master Mix, TAKARA Bio Inc. Inc.) و طبق روش ذکر شده در کیت صورت پذیرفت. آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر قطعه ای از ژن همساخت SOS1 و NHX1 و نیز ژن مرجع EF1α در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: آغازگرهای اختصاصی (Forward و Reverse) طراحی شده برای ژن های EF1α، NHX1 و SOS1 در کدو (*C. pepo*)

Table1: Specific primers (Forward and Reverse) designed for Eflα, NHX1 and SOS1 genes in *C. pepo*

Gene name	Forward primer Sequence(5'-3')	Reverse primer Sequence(5'-3')	TM (°C)
<i>Eflα</i>	5'-GAGATGAACAAGAGGTCATCAAGTATGC-3'	5'-GAAATACCAGCCTCAAAACCAC CAGT-3'	57
<i>NHX1</i>	5'-GTTCAAGAGTCACGACCAAGC-3'	5'-TCATAAGACCAGCCCACCA-3'	62
<i>SOS1</i>	5'-TTCTATCAAATGGTCCTTGG-3'	5'-CCTTCTTGAGCAGTGAAGTAAG-3'	57

تجزیه و تحلیل آماری

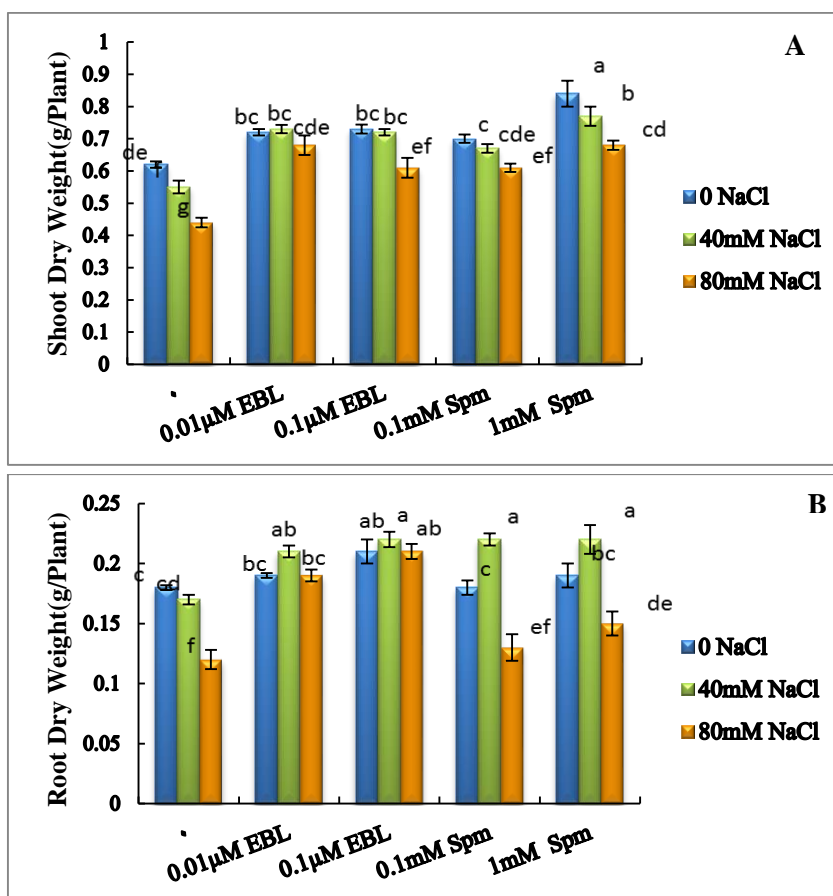
تجزیه و تحلیل های آماری در این مطالعه با آزمایش فاکتوریل و طبق طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت و داده ها با استفاده از نرم افزار SAS تحت آنالیز واریانس دوطرفه قرار گرفتند و اختلاف میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند. در مطالعات مولکولی، شدت باند هر کدام از ژن های هدف توسط ژن مرجع *EF1α* مربوطه نرمال سازی و توسط نرم افزار ImageJ اندازه گیری شد. در پایان نمودارهای مربوطه نیز با نرم افزار Excel 2010 رسم شد.

نتایج

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

تنش شوری در هر دو غلظت ۴۰ و ۸۰ میلی مولار، وزن خشک اندام هوایی را کاهش داد. پیش تیمار با EBL و Spm در هر

دو غلظت موجب افزایش وزن خشک اندام هوایی هم در گیاهان شاهد و هم تحت تنش شوری گردید. در شرایط غیر تنش و تنش، تفاوتی بین دو غلظت ۰/۱ و ۰/۱ میکرومولار EBL مشاهده نگردید. در هر دو شرایط شاهد و تنش شوری، غلظت ۱ میلی مولار Spm به طور معنی داری مؤثرتر از ۰/۱ میلی مولار بود و در مقایسه‌ی اثر دو تنظیم کننده‌ی رشد نیز غلظت ۱ میلی مولار Spm بیشترین اثر را در افزایش وزن خشک اندام هوایی نشان داد (شکل ۱- A). تنش شوری در غلظت ۸۰ میلی مولار وزن خشک ریشه را به طور معنی داری کاهش داد. در شرایط غیر تنش، تنها پیش تیمار با ۰/۱ میکرومولار EBL موجب افزایش معنی دار وزن خشک ریشه شد، اما در شرایط تنش شوری هر دو غلظت EBL و Spm باعث افزایش معنی داری در وزن خشک ریشه شدند. در شوری ۴۰ میلی مولار، تفاوتی بین دو غلظت EBL و Spm مشاهده نگردید ولی در شوری ۸۰ میلی مولار و در مقایسه دو تنظیم کننده‌ی رشد، غلظت ۰/۱ میکرومولار EBL بیشترین اثر را در افزایش وزن خشک ریشه نشان داد (شکل ۱- B).

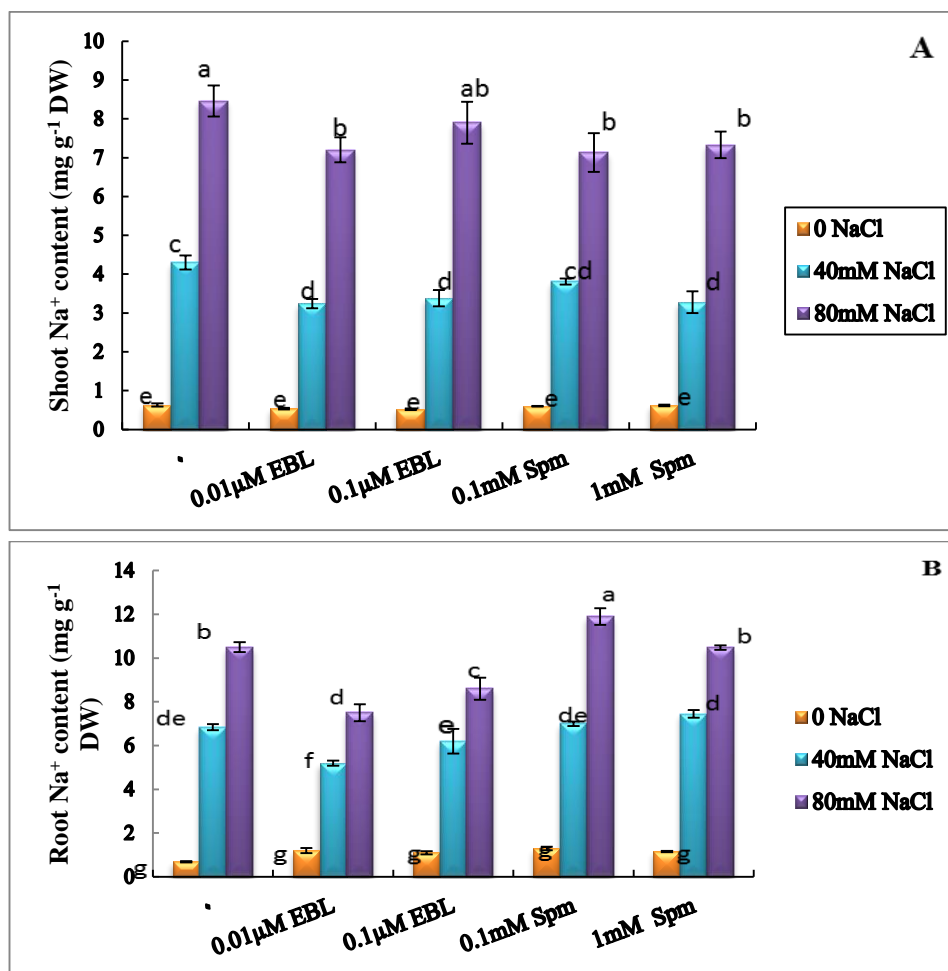


شکل ۱- اثر پیش تیمار اپی براسینولید (EBL) و اسپرمین (Spm) بر وزن خشک اندام هوایی (Shoot) (A) و ریشه (Root) (B) در کدو (*C. pepo*) تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۴ تکرار \pm SE است. ستون‌هایی که دارای حروف مشترکی می‌باشند بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی داری ($P \leq 0.05$) ندارند.

Figure 1. Effect of Epibracinolide (EBL) and Spermine (Spm) pretreatment on dry weight of shoot (A) and Root (B) of *C. pepo* under salinity stress. Data is the mean of 3 replications \pm SE. Columns that have common letters are not significantly different ($P \leq 0.05$) according to Duncan's test.

مقدار سدیم در اندام هوایی و ریشه

تنش شوری باعث افزایش معنی دار تجمع سدیم در اندام هوایی و ریشه نسبت به گیاهان شاهد گردید و این افزایش در ریشه بیشتر بود. اثر پیش تیمار EBL و Spm بر محتوای سدیم دو اندام متفاوت بود. در نمونه‌های پیش تیمار شده با EBL و Spm کاهش تجمع سدیم اندام هوایی تحت شرایط تنش شوری مشاهده شد. در شوری ۴۰ میلی مولار تفاوتی بین دو غلظت EBL مشاهده نشد در حالی که در مورد Spm غلظت ۱ میلی مولار مؤثرتر بود. در شوری ۸۰ میلی مولار تفاوتی بین دو غلظت Spm بر کاهش سدیم اندام هوایی مشاهده نشد ولی غلظت ۰/۰۱ میکرومولار EBL مؤثرتر بود (شکل ۲-۱A). اثر دو تنظیم کننده رشد بر میزان تجمع سدیم ریشه به ویژه در شوری ۸۰ میلی مولار متفاوت بود، پیش تیمار با هر دو غلظت EBL منجر به کاهش سدیم ریشه گردید. البته اثر غلظت ۰/۰۱ میکرومولار EBL در هر دو سطح شوری چشمگیرتر بود. در حالی که پیش تیمار با غلظت ۱ میلی مولار Spm اثر معنی داری بر محتوای سدیم نداشت اما غلظت ۰/۱ میلی مولار Spm محتوای سدیم ریشه را افزایش داد. به نظر می‌رسد این نتایج با بیان ژن ناقل سدیمی در ارتباط باشد (شکل ۲-۱B).

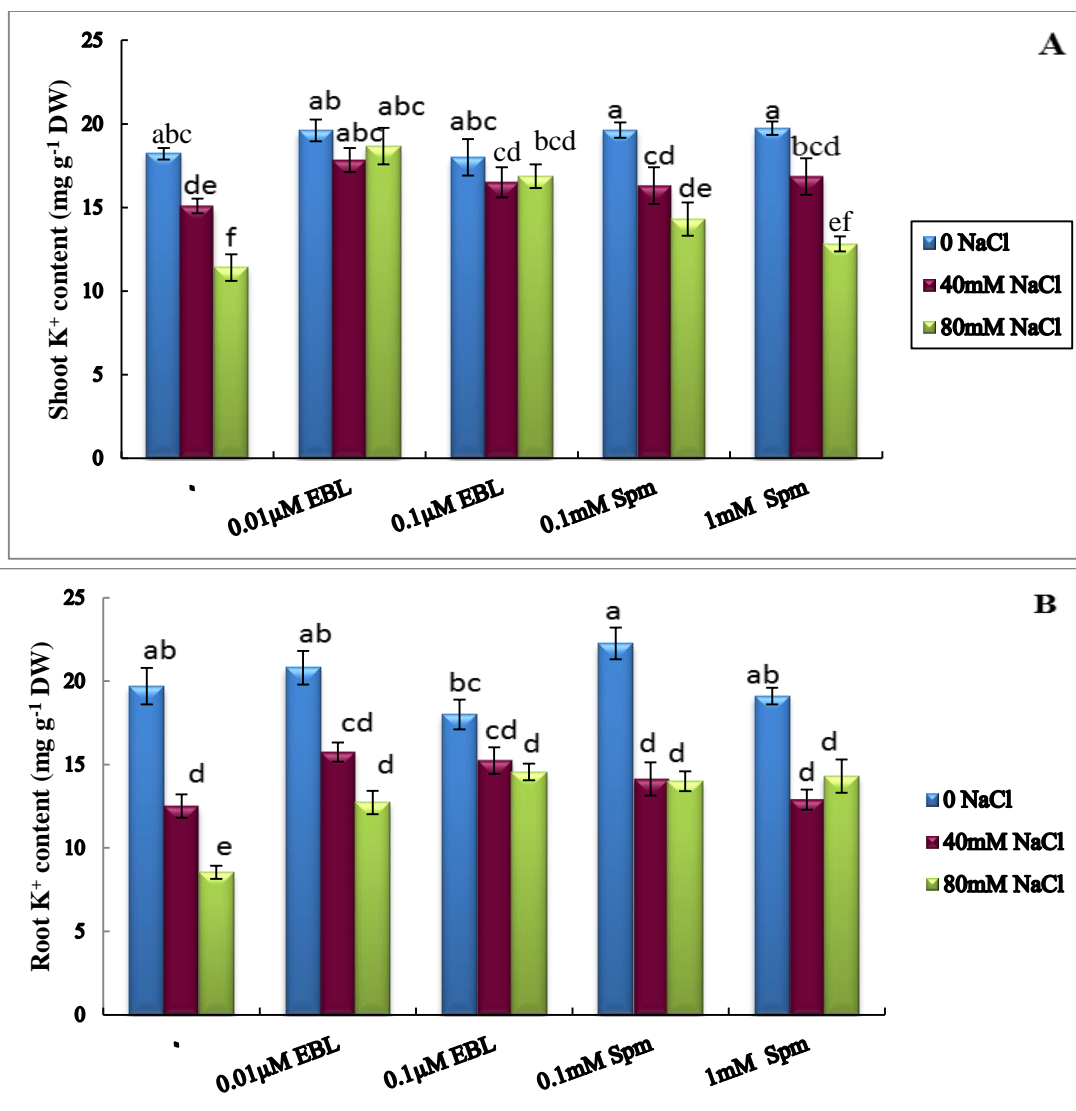


شکل ۲- اثر پیش تیمار اپیبراسینولید (EBL) و اسپرمین (Spm) بر محتوای سدیم اندام هوایی (Shoot) (A) و ریشه (Root) (B) *C. pepo* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SE است. ستون‌هایی که دارای حروف مشترکی می‌باشند بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی داری ($P \leq 0.05$) ندارند.

Figure 2. Effect of Epibrasinolide (EBL) and Spermine (Spm) pretreatment on Sodium content of shoot (A) and Root (B) of *C. pepo* under salinity stress. Data is the mean of 3 replications \pm SE. Columns that have common letters are not significantly different ($P \leq 0.05$) according to Duncan's test.

مقدار پتاسیم در اندام هوایی و ریشه

تنش شوری (به‌ویژه ۸۰ میلی‌مولار) تجمع پتاسیم در اندام هوایی و ریشه را نسبت به گیاهان شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش داد و این کاهش در ریشه بیشتر بود. در شرایط غیر تنش و شوری ۴۰ میلی‌مولار پیش تیمار EBL و Spm اثر معنی‌داری بر میزان پتاسیم اندام هوایی و ریشه نداشت. در شوری ۸۰ میلی‌مولار، غلظت ۰/۱ میلی‌مولار Spm و هر دو غلظت EBL منجر به افزایش پتاسیم اندام هوایی نسبت به گیاهان تیمار نشده گردید (شکل ۳-۱). پیش تیمار با هر دو غلظت EBL و Spm به‌طور معنی‌داری مقدار پتاسیم ریشه را در شوری ۸۰ میلی‌مولار افزایش داد (شکل ۳-۲).

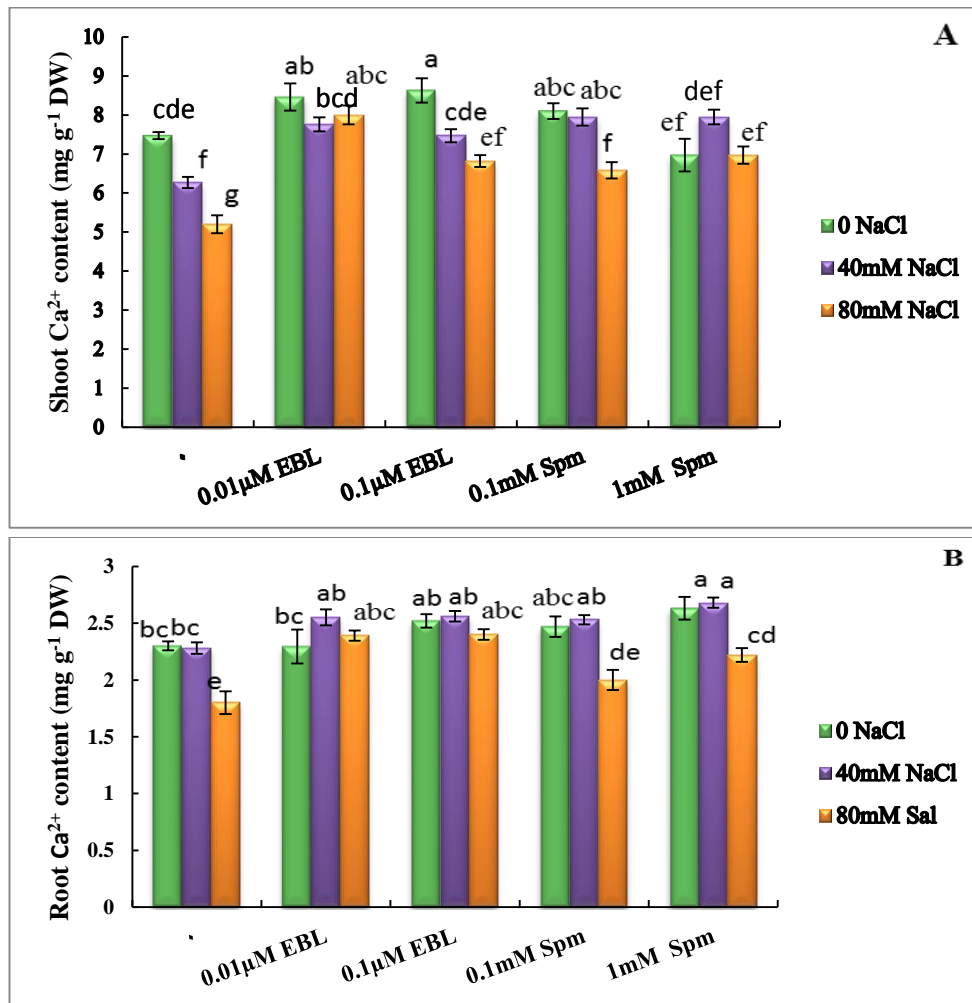


شکل ۳- اثر پیش تیمار اپی براسینولید (EBL) و اسپرمین (Spm) بر محتوای پتاسیم اندام هوایی (Shoot) (A) و ریشه (Root) (B) کدو (*C. pepo*) تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SE است. ستون‌هایی که دارای حروف مشترکی می‌باشند بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) ندارند.

Figure 3. Effect of Epibrasinolide (EBL) and Spermine (Spm) pretreatment on Potassium content of Shoot (A) and Root (B) of *C. pepo* under salinity stress. Data is the mean of 3 replications \pm SE. Columns that have common letters are not significantly different ($P \leq 0.05$) according to Duncan's test.

مقدار کلسیم در اندام هوایی و ریشه

تنش شوری، تجمع کلسیم در اندام هوایی و ریشه را به طور معنی دار نسبت به گیاهان شاهد کاهش داد و این کاهش در اندام هوایی بیشتر بود. در نمونه های پیش تیمار شده با EBL و Spm نسبت به نمونه های بدون پیش تیمار در معرض شوری، مقدار کلسیم اندام هوایی به طور معنی داری افزایش نشان داد. در شرایط تنش شوری (به ویژه ۸۰ میلی مولار) اثر غلظت ۰/۱ میکرومولار EBL بر افزایش مقدار کلسیم اندام هوایی چشمگیرتر بود. غلظت ۰/۱ میلی مولار Spm در شوری ۴۰ میلی مولار منجر به افزایش آن شد در حالی که در شوری ۸۰ میلی مولار تفاوت معنی داری در کلسیم اندام هوایی بین دو غلظت Spm به کار گرفته شده مشاهده نگردید که در شکل ۴-A قابل مشاهده است. در مقایسه ی اثر دو تنظیم کننده ی رشد در شرایط غیر تنش و شوری ۴۰ میلی مولار، فقط غلظت ۱ میلی مولار Spm میزان کلسیم ریشه را به طور معنی داری افزایش داد در حالی که در شوری ۸۰ میلی مولار، پیش تیمار با هر دو EBL و Spm منجر به افزایش آن گردید که تفاوتی بین دو غلظت EBL در افزایش مقدار کلسیم ریشه مشاهده نشد اما غلظت ۱ میلی مولار Spm مؤثرتر بود (شکل ۴-B).



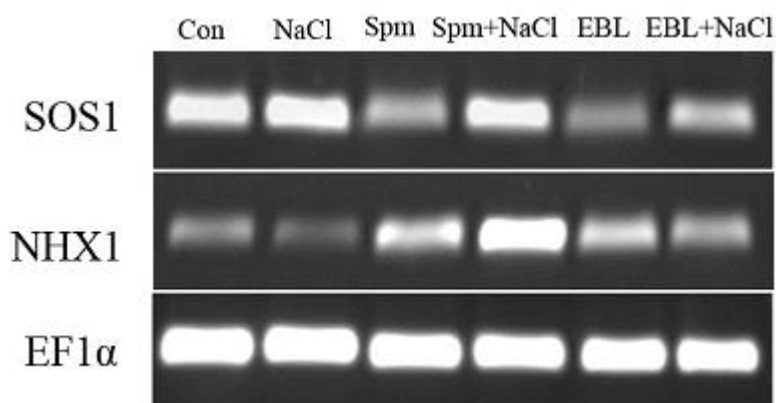
شکل ۴- اثر پیش تیمار ایپی براسینولید (EBL) و اسپرمین (Spm) بر محتوای کلسیم اندام هوایی (Shoot) (A) و ریشه (Root) (B) کدو (*C. pepo*) تحت تنش شوری. داده ها میانگین ۳ تکرار \pm SE است. ستون هایی که دارای حروف مشترکی می باشند بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی داری ($P \leq 0.05$) ندارند.

Figure4. Effect of Epibracinolide (EBL) and Spermine (Spm) pretreatment on Calcium content of Shoot (A) and Root (B) of *C. pepo* under salinity stress. Data is the mean of 3 replications \pm SE. Columns that have common letters are not significantly different ($P \leq 0.05$) according to Duncan's test.

شناسایی و جداسازی ژن همساخت *SOS1* و *NHX1*

نتایج حاصل از RT-PCR

پس از این که RNA کل استخراج شده از بافت ریشه گیاه با آنزیم DNase تیمار شد، از آن در RT-PCR استفاده گردید. چندین PCR با استفاده از cDNA حاصله، آغازگرهای اختصاصی هر ژن مربوطه و برنامه‌های PCR ذکر شده در فصل مواد و روش‌ها صورت پذیرفت و در نهایت پس از بهینه‌سازی واکنش تک باند اختصاصی مربوط به هر واکنش به دست آمد (شکل ۵).



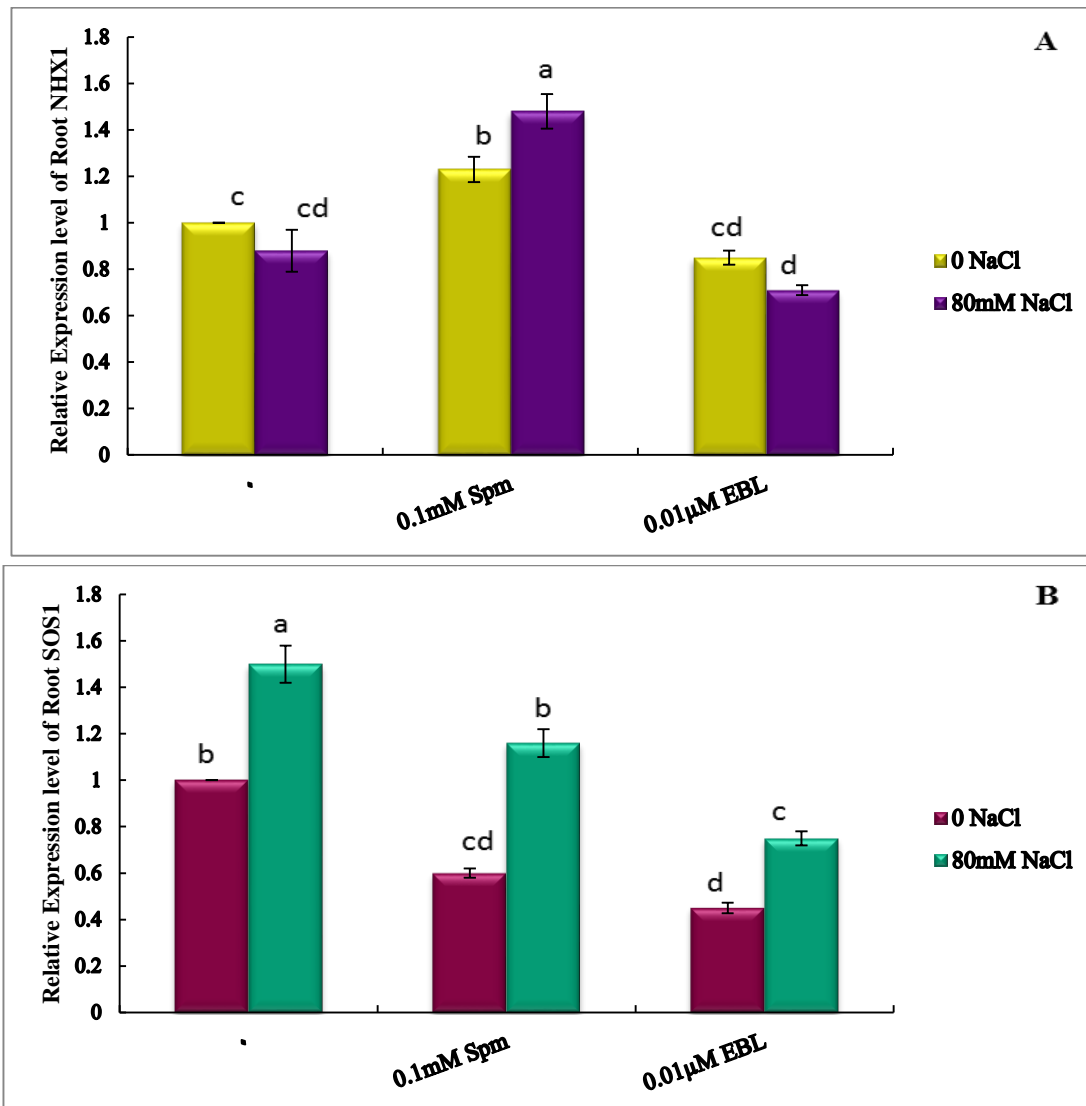
شکل ۵- الگوی بیان ژن‌های *SOS1* و *NHX1* در ریشه کدو (*C. pepo*). آنالیز بیان توسط RT-PCR نیمه کمی در شرایط: Con: کنترل (شاهد)، (80 mM) NaCl، (0.1 mM) Spm، (0.01 M μ) EBL، (0.1 M μ) EBL + NaCl، (0.1 M μ) Spm + NaCl، انجام شد. ژن *EF1 α* به عنوان ژن مرجع استفاده شد.

Figure5. Expression pattern of *SOS1* and *NHX1* genes in *C. pepo* Root. Expression analysis was performed by semi-quantitative RT-PCR under the following conditions: Con (Control), NaCl (80 mM), Spm (0.1 mM), Spm + NaCl, EBL (0.01 M μ), EBL + NaCl. The *EF1 α* gene was used as the reference gene.

بیان ژن‌های ناقل سدیم (*SOS1* و *NHX1*)

با توجه به اینکه در مقایسه‌ی تیمارهای شوری، تیمار ۸۰ میلی مولار بیشتر بر پارامترهای رشد و فیزیولوژیکی اثر معنی‌داری داشت و از آنجایی که اندام ریشه به‌طور مستقیم در معرض تنش شوری و تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت هیدروپونیک قرار گرفت، بنابراین سطوح رونوشتی ژن‌های *SOS1* و *NHX1* در بافت ریشه گیاهچه‌های کدو در ۸۰ میلی مولار شوری در مقایسه با نمونه شاهد بدون تنش بررسی شد که در شکل ۵ و شکل ۶ نشان داده شده است. از ژن مرجع *EF1 α* جهت نرمال‌سازی سطوح رونوشتی *SOS1* و *NHX1* استفاده شد. تنش شوری اثر معنی‌داری بر بیان ژن *NHX1* در مقایسه با نمونه شاهد بدون تنش نداشت. اثر پیش تیمار EBL و Spm بر بیان این ژن متفاوت بود به طوری که Spm برون‌زا منجر به افزایش بیان ژن *NHX1* در شرایط غیر تنش و شوری شد در حالی که EBL اثر معنی‌داری بر بیان این ژن نداشت (شکل ۶- A). تنش شوری منجر به فرا

تنظیم بیان ژن *SOS1* در مقایسه با شرایط غیر تنش در بافت ریشه شد. پیش تیمار هر دو EBL و Spm منجر به کاهش معنی دار بیان این ژن در شرایط غیر تنش و شوری شد و EBL منجر به کاهش بیشتر آن شد (شکل ۶- B).



شکل ۶- اثر پیش تیمار اپی براسینولید (EBL) و اسپرمین (Spm) بر میزان بیان نسبی ژن های *NHX1* (A) و *SOS1* (B) ریشه کدو (*C. pepo*) تحت تنش شوری. شدت باند هر کدام از ژن های هدف توسط ژن مرجع *EF1α* مربوطه نرمال سازی و توسط نرم افزار ImageJ اندازه گیری شد. داده ها میانگین ۳ تکرار \pm SE است. ستون هایی که دارای حروف مشترکی می باشند بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی داری ($P \leq 0.05$) ندارند.

Figure 6. Effect of Epibrasinolide (EBL) and Sperm (Spm) pretreatment on the relative expression of *NHX1* (A) and *SOS1* (B) genes of *C. pepo* root under salinity stress. The band intensity of each of the target genes was normalized by the corresponding *EF1α* reference gene and measured by ImageJ software. Data is the mean of 3 replications \pm SE. Columns that have common letters are not significantly different ($P \leq 0.05$) according to Duncan's test.

جذب بیش‌ازحد نمک باعث ایجاد تنش اسمزی، سمیت یونی خاص (Rasool *et al.*, 2022) و عدم تعادل یونی شده (۱۲) و در نتیجه رشد گیاه را کاهش می‌دهد، حتی بقای گیاهان می‌تواند تحت مقادیر بالای شوری به خطر بیفتد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تنش شوری اثر منفی بر پارامترهای رشد از جمله وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه گیاه دارد. این نتایج با بسیاری از گزارش‌های پیشین که در آن تنش شوری موجب کاهش وزن خشک ریشه و ساقه در گیاهان کدو (Siddiqui *et al.*, 2014) و نعناع (Çoban & Baydar, 2016) می‌شود همخوانی دارد. شوری تمام فرایندهای اصلی مانند رشد، فتوسنتز (Rasool *et al.*, 2022)، سنتز پروتئین و متابولیسم لیپید و انرژی و در نتیجه، تمام مراحل گیاه از جوانه‌زنی، تولید بیوماس تا تولید دانه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Parida & Das, 2005). فاکتورهای دیگری چون تغییر در نسبت K^+/Na^+ بر فعالیت‌های بیوانرژی‌تیک سلول تأثیر می‌گذارد (یون پتاسیم به عنوان کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌های فتوسنتزی و تنفسی است) (Sudhir & Murthy, 2004). تغییر در تعادل هورمونی نیز یکی دیگر از دلایل کاهش رشد می‌باشد (Pandey *et al.*, 2003). دیگر دلایل کاهش رشد عبارتند از: مهار گسترش تقسیم سلولی، کاهش سطح برگ و بنابراین کاهش سطح دریافت نور، تسریع در پیری برگ‌ها، افزایش درجه حرارت برگ، تحت تأثیر قرار گرفتن دستگاه فتوسنتزی، کاهش کارایی زنجیره‌ی انتقال الکترون و کمپلکس جمع‌کننده‌ی نور، کاهش کارایی دکربوکسیلازی آنزیم روبیسکو و یا افزایش فعالیت اکسیژنازی این آنزیم، کاهش ظرفیت بازسازی RUBP، مهار سنتز ATP به دلیل مهار فعالیت کمپلکس ATP سنتتاز، غیرفعال شدن PSI و PSII به دلیل جدا شدن برخی از پروتئین‌ها از آن‌ها در حضور غلظت‌های بالای سدیم و کلر، تغییر در هدایت روزانه‌ی، نرخ تعرق، محتوای نسبی آب و کاهش تورگر، تغییر در مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و القای کلروفیلاز، سمیت نمک به دلیل جذب مقادیر زیاد یون‌های سدیم و کلر و رقابت و اختلال در جذب و انتقال یون‌های ضروری و عدم تعادل و کمبود عناصر ضروری، تنش اکسیداتیو و اکسیداسیون ترکیبات مهم زیستی از جمله پروتئین‌ها و یا پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به غشاهای زیستی از جمله غشاهای تیلاکوئیدی، که در شرایط تنش به‌ویژه تنش شوری در گزارشات مختلف ذکر شده است (Silva *et al.*, 2008) در این مطالعه پیش‌تیمار Spm و EBL موجب بهبود پارامترهای رشد در گیاهان تحت تنش گردید. مشابه نتایج این تحقیق بهبود پارامترهای رشد در تیمار براسینولید در گیاهان مختلف مانند نعناع (Çoban & Baydar, 2016) گزارش شده است. اثرات تشویقی براسینواستروئید بر رشد می‌تواند به دلایلی چون افزایش میزان تقسیم سلول در مناطق مریستمی، رشد طولی سلول و تعدیل خواص دیواره سلولی باشد که موجب افزایش رشد می‌گردد (Clouse, 2011). براسینواستروئیدها رشد طولی سلول را از طریق اثر بر اسکلت سلولی و ساختار دیواره سلولی افزایش می‌دهند. در این مطالعه نیز به‌وضوح اثر پیش‌تیمار با EBL، بر ریشه‌زایی، تولید ریشه جانبی و افزایش سطح ریشه نسبت به اندام هوایی و مقاومت به شوری در کشت هیدروپونیک مشخص بود. گزارش شده است که براسینواستروئیدها سنتز آنزیم‌های شل‌کننده دیواره (گزیلوگلوکان ترانسفراز / هیدرولاز) را از طریق افزایش بیان ژن گزیلوگلوکان اندو-ترانس‌گلیکوزیلاز افزایش می‌دهند (Sun *et al.*, 2005). دلایل دیگر بهبود پارامترهای رشد تحت تأثیر تیمار براسینولید را می‌توان تأثیر آن بر دستگاه فتوسنتزی و حفاظت از دستگاه فتوسنتزی (dos Santos *et al.*, 2021)، مقدار فتوسنتز، فعالیت آنزیم روبیسکو، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، هدایت روزانه‌ی، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، کاهش تنش اکسیداتیو (Kohli *et al.*, 2019)، افزایش همبستگی غشاهای زیستی (کاهش نشت یونی)، متابولیسم نیتروژن و تغذیه معدنی گیاه نام برد (Fariduddin *et al.*, 2014).

در این مطالعه، تنش شوری موجب افزایش معنی‌دار محتوای سدیم در اندام هوایی و ریشه گیاه کدو شد اما محتوای پتاسیم را کاهش داد. تنش شوری ترکیبی از اثرات مربوط به تنش اسمزی و آب‌زدایی و آسیب به دلیل افزایش یون‌های سدیم را در

برمی‌گیرد که به‌طور منفی رشد و نمو گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Zhu, 2001). گزارش شده‌است که یکی از عوامل مهم حساسیت به شوری اتلاف و فقدان پتاسیم بافت‌های گیاه است که از طریق دیپلاریزاسیون غشای پلاسمایی به دلیل درون شارش سدیم ایجاد شده‌است (Shabala & Cuin, 2008) که احتمالاً می‌تواند دلیل مشاهدات یافته‌های این پژوهش نیز باشد. تنش شوری نه تنها قابلیت دسترسی پتاسیم و کلسیم را کاهش می‌دهد، بلکه انتقال و تحرک کلسیم و پتاسیم به مناطق در حال رشد گیاه را نیز کاهش می‌دهد (Zhou *et al.*, 2019). شواهد ثابت کرده‌است که مقادیر بالای نمک در محلول خاک ممکن است در فعالیت‌های یون-ماده مغذی اختلال ایجاد کند، در نتیجه گیاه مستعد و حساس به آسیب‌های خاص یونی و اسمزی بعلاوه اختلالات تغذیه‌ای شود و در نهایت منجر به کاهش بازده و کیفیت محصول گردد. به مواد تغذیه‌ای معدنی مانند پتاسیم و کلسیم به‌طور اساسی برای فعالیت آنزیم‌ها، سنتز پروتئین‌ها و تمامیت غشا و دیواره سلولی نیاز است (Grattan & Grieve, 1998). نتایج حاصل این تحقیق افزایش در تجمع یون Na^+ همراه با کاهش در K^+ و Ca^{2+} را نشان داد که با این دیدگاه که گیاهان در حال رشد در شرایط شوری از عدم تعادل یونی، کمبود تغذیه‌ای و سمیت خاص یونی آسیب می‌بینند، همخوانی دارد (Karlidag *et al.*, 2011). پیش‌تیمار Spm محتوای پتاسیم و کلسیم را در هر دو اندام هوایی و ریشه گیاه کدو افزایش داد، درحالی‌که محتوای سدیم ریشه را افزایش و سدیم اندام هوایی را کاهش داد. گزارش شده‌است که پلی‌آمین‌ها از طریق انسداد کانال‌های کاتیونی غیرانتخابی از برون‌شارش یون K^+ ناشی از تنش شوری در مزوفیل نخود جلوگیری می‌کنند (Shabala *et al.*, 2007). پلی‌آمین‌ها به‌طور غیرمستقیم از طریق برهم‌کنش با فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی و تشویق و حفظ پایداری غشا، انتقال یون را تحت تأثیر قرار می‌دهند. نشان داده شده‌است که افزایش پایداری با واسطه پلی‌آمین‌ها اثر معنی‌داری بر هر دو ناقل‌های H^+/ATPase و $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ در شرایط تنش شوری دارد (Pottosin & Shabala, 2014) کدهبندی کافی سدیم سیتوزولی به درون واکوئل مکانیسم دیگری است که موجب تحمل به شوری در گیاهان می‌شود. این کدهبندی از طریق پادبرهای Na^+/H^+ تونوپلاستی که توسط پمپ‌های H^+-ATPase و H^+-PPase تونوپلاستی سوخت‌گیری می‌شوند انجام می‌گیرد (Hasegawa, 2013). بعلاوه، برگشت نشت یون‌های سمی Na^+ به درون سیتوزول بایستی مهار شود؛ بنابراین، برای جلوگیری از انرژی مصرفی بیهوده حاصل از گردش Na^+ بین سیتوزول و واکوئل و انجام کدهبندی واکوئلی کافی یون‌های سمی Na^+ ، انتقال تونوپلاستی غیرفعال بایستی به کمترین میزان خود نگه داشته شود؛ و این ممکن نیست مگر اینکه کنترل محکم و مؤثر بر کانال‌های واکوئلی سریع (FV) و کند (SV) نفوذپذیر Na^+ انجام شود. گزارش شده‌است که این کانال‌ها به پلی‌آمین حساس می‌باشند و از طریق مقادیر مناسب فیزیولوژیکی پلی‌آمین‌ها مسدود می‌شوند (Pottosin & Shabala, 2014). بنابراین، پیش‌تیمار Spm ممکن است در تواناسازی کدهبندی Na^+ واکوئلی مؤثر ضروری باشد. جذب Na^+ و فقدان K^+ القا شده توسط تنش شوری یک عدم توازن یونی در گیاه به وجود می‌آورد؛ این عدم توازن تا حدی توسط پلی‌آمین‌ها که فعالیت انتقال غشایی را تنظیم می‌کنند کنترل می‌شود و در نتیجه هومئوستازی K^+/Na^+ حفظ خواهد شد (Hasegawa, 2013). به‌نظر می‌رسد که پلی‌آمین‌ها، به‌ویژه Spm و Spd، به دلیل ماهیت پلی‌کاتیونی با مولکول‌های آنیونی متعددی، مانند DNA، RNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی برهم‌کنش داشته باشند (Hussain *et al.*, 2011). بنابراین، Spm ممکن است بار سطحی را تعدیل و در نتیجه نفوذپذیری و پایداری غشا را تنظیم کند. در این پژوهش، پیش‌تیمار با اسپرمیدین محتوای Na^+ اندام هوایی را کاهش داد. همچنین محتوای K^+ اندام‌ها افزایش یافت. گزارش شده‌است که اسپرمیدین نسبت K^+/Na^+ را در تنش شوری افزایش می‌دهد اما هرگز به سطح کنترل نمی‌رسد (Zhang *et al.*, 2016). در این مطالعه، EBL به‌طور معنی‌داری تجمع Na^+ را کاهش داد، درحالی‌که سطوح K^+ و Ca^{2+} را افزایش داد. نتایج

مشابهی در بادمجان در شرایط تنش شوری به‌دست‌آمده است (Ding *et al.*, 2012). نشان داده شده‌است که اسپری EBL بر روی برگ نسبت K^+/Na^+ را در توت‌فرنگی در شرایط تنش شوری افزایش داده است (Karlıdag *et al.*, 2011). اثر تشویقی رشد حاصل از تیمار با براسینواستروئیدها ممکن است به دلیل نقش آن‌ها در هومئوستازی یون‌ها باشد که این هومئوستازی در فرایندهای بیوشیمیایی یا فیزیولوژیکی کنترل‌کننده‌ی رشد ضروری است. به‌عنوان مثال، براسینواستروئیدها از طریق افزایش فعالیت آکوپورین‌ها، در توسعه‌ی سلولی ناشی از تورگر یا پمپ پروتونی و تعدیل تحمل به تنش نقش دارند (Morillon *et al.*, 2001). افزایش در Ca^{2+} سیتوزولی، به‌عنوان یک پیامبر ثانویه، ممکن است اغلب فرایندها از جمله بیان ژن‌های پاسخ به تنش اسمزی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را القا کند.

در این پژوهش، بیان ژن *SOS1* در بافت ریشه در تنش شوری افزایش یافت. بیان ژن *SOS1* در گیاهان در پاسخ به تنش شوری فرا تنظیم می‌شود. نتایج مشابهی توسط Shi و همکاران (۲۰۰۰) مشاهده شده‌است که نشان داده‌اند بیان ژن *SOS1* در گیاه آرابیدوپسیس در پاسخ به تنش شوری افزایش یافته‌است. این تنظیم مثبت بیان ژن به نقش *SOS1* در تحمل به شوری اشاره می‌کند (Shi *et al.*, 2000). *SOS1* برای هومئوستازی هر دو یون Na^+ و K^+ در تنش شوری ضروری است. ژن *SOS1* اغلب در سلول‌های احاطه‌کننده گزیم بیان می‌شود که نشان می‌دهد *SOS1* ممکن است در بارگیری Na^+ به‌درون گزیم در انتقال طولانی فاصله عمل کند. اثر *SOS1* بر انتقال K^+ ممکن است به دلیل اثر آن بر شیب پروتونی از میان غشای سلولی سلول‌های آوندی باشد. به‌عنوان مثال، فعالیت یک همبر K^+-H^+ می‌توانست از طریق چرخش H^+ با *SOS1* همراه شود و چنین همبری ممکن است برای انتقال با تمایل بالای K^+/Na^+ به درون گزیم لازم باشد. همبر K^+ که از طریق چرخش Na^+ با *SOS1* همراه می‌شود نیز ممکن است وجود داشته باشد (Shi *et al.*, 2000) در این پژوهش پیش‌تیمار Spm کاهش معنی‌داری بر بیان ژن *SOS1* در شرایط تنش شوری داشت. گزارش شده است که عدم حضور Spm رونویسی مسیر سیگنالینگ SOS و اجزاء دخیل در آن را تحت تأثیر قرار نداد (Yamaguchi *et al.*, 2006) به نظر می‌رسد برای مطالعه اثر دقیق Spm بر بیان ژن *SOS1* در گیاه کدو، بایستی سایر اجزاء این مسیر سیگنالینگ نیز مطالعه شود. تجمع کمتر Na^+ در برگ‌ها به دلیل رشد گیاه و تحمل به تنش‌های غیر زیستی مفید می‌باشد زیرا برگ‌ها اندام‌های متابولیکی مهم هستند. به‌عنوان مثال، *SOS1* یک پادبر Na^+/H^+ غشای پلاسمایی را کد می‌کند که مسئول دفع سدیم به آپوپلاست می‌باشد (Olias *et al.*, 2009). گزارش شده‌است که گیاه گوجه‌فرنگی با بیان کاهش‌یافته‌ی ژن *SOS1* در برگ‌ها نسبت به ساقه، Na^+ بیشتری را تجمع می‌دهد که بیانگر این است که این پادبر در انتقال Na^+ از برگ‌ها به ساقه نقش دارد و محدودکننده‌ی کده‌بندی‌های برگ می‌باشد. توانایی گیاه گوجه‌فرنگی وحشی در حفظ و نگه‌داری Na^+ در ساقه‌ها و بنابراین ممانعت از ورود Na^+ به بافت‌های فتوسنتزی، تا حد زیادی به عملکرد *SOS1* وابسته است (Hauser & Horie, 2010). در گزارشی نشان می‌دهد که رونوشت‌های هر دو *MdSOS1* و *MdHKT1* در برگ‌های رقم مقاوم سیب بالاتر بودند و این گونه‌ی گیاهی ظرفیت بهتری برای دفع سدیم از برگ‌ها را دارد که منجر به نگهداری کمتر سدیم در برگ‌ها اما حفظ بیشتر آن در ساقه‌ها شد (Liu *et al.*, 2012) در برخی گونه‌ها، انتقال و ذخیره Na^+ به درون واکوئل‌ها یک عامل کلیدی در بهبود رشد طی دوره‌ی تنش شوری می‌باشد (Munns & Tester, 2008).

گزارش شده است که برگ‌های گونه حساس سیب در شرایط تنش شوری میزان کمتری از رونوشت *MdNHX1* داشتند ممکن است دلیل اینکه این گونه نمی‌توانست Na^+ اضافی را به درون واکوئل، منتقل کند توضیح دهد. در مقابل، گونه مقاوم سیب رونوشت‌های بیشتری از *MdNHX1* داشت که می‌توانست به انتقال Na^+ اضافی و حفظ شرایط زیست‌محیطی بهتر کمک

کند (Liu *et al.*, 2012). Wu و همکاران (۲۰۰۴) کشف کردند که سطح mRNA مربوط به GhNHX1 القا شده توسط تنش شوری سه تا هفت برابر در ارقام مقاوم پنبه نسبت به ارقام حساس آن بیشتر می‌باشد (Wu *et al.*, 2004). Galvez و همکاران (۲۰۱۲) نیز ثابت کردند که گیاهان وحشی گوجه‌فرنگی، مقاوم به شوری هستند و Na^+ بیشتری در بخش‌های هوایی خود تجمع می‌دهند. این یافته‌ها به مشاهداتی مربوط می‌شود که تنش شوری به‌ویژه ایزوفرم‌های LeNHX3 و LeNHX4 را در گونه‌ی مقاوم القا می‌کند (Gálvez *et al.*, 2012) به هر حال، Lohaus و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کرده‌اند که در پاسخ به شوری بالا، ژنوتیپ مقاوم ذرت در مقایسه با ژنوتیپ حساس، Na^+ بیشتری در ریشه‌ها و ساقه‌ها (البته نه برگ‌ها) تجمع می‌دهد (Lohaus *et al.*, 2000). Zahran و همکاران (۲۰۰۷) پیشنهاد کردند که دو مکانیسم متفاوت، اجتناب از Na^+ یا تجمع آن در اجزاء سلولی برای مقابله با تنش شوری، توسط دو لگوم وحشی انجام شده‌است و اینکه بیان پادبرهای NHX به فنوتیپ‌های تجمع‌دهنده Na^+ مربوط می‌شد (Zahran *et al.*, 2007). این نتایج نشان می‌دهد که انواع مختلف گیاهان Na^+ را در اندام‌های مختلف تجمع می‌دهند که احتمالاً به مکانیسم‌های مقابله‌کننده‌ی توزیع یون در آن‌ها مربوط می‌شود. بنابراین علیرغم افزایش تجمع یون Na^+ ، پیش‌تیمار Spm از طریق بیش‌بیان ژن NHX1 و کده‌بندی یون Na^+ اضافی به‌درون واکوئل و حفظ محیط مطلوب‌تر منجر به افزایش مقاومت به تنش شوری و افزایش رشد گیاه می‌شود. در شرایط تنش شوری، در سلول‌های گیاهی بسیار حیاتی و ضروری است که سطح پایین Na^+ سیتوزولی و در مقابل سطح بالای K^+ حفظ شود و در نتیجه منجر به نسبت بالای K^+/Na^+ می‌شود که برای متابولیسم‌های حیاتی سلول حائز اهمیت است (Blumwald, 2000). نشان داده شده‌است که حساسیت آنزیم‌های سیتوزولی گیاهان شورزی و شیرین‌زی به افزایش سطوح شوری به یک اندازه می‌باشد و به نظر می‌رسد که حفظ نسبت بالای K^+/Na^+ سیتوزولی صرف‌نظر از اختلاف ذاتی آن‌ها در حساسیت به شوری یک نیاز اساسی برای سلول‌های گیاهی در شرایط تنش شوری است (Blumwald, 2000). Apse و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند بیش‌بیان AtNHX1 منجر به افزایش تحمل به شوری در گیاه آرابیدوپسیس تراریخت می‌شود که این گیاه تراریخت را قادر کرده‌است تا در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار کلرور سدیم رشد کند (Apse *et al.*, 1999). این نتایج ثابت می‌کند که فعالیت پادبر Na^+/H^+ واکوئلی در واقع برای تحمل گیاه به شوری ضروری است. خانواده ژنی NHX در گونه‌های گیاهی مختلف از جمله غلاتی مانند گندم، جو و برنج بر اساس AtNHX1 شناسایی و استخراج شدند (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009). گیاهان تراریخت بیش‌بیان‌کننده‌ی ناقل‌های NHX1 مختلف، افزایش به تحمل به شوری را نشان دادند (Yamaguchi & Blumwald, 2005) که تأییدکننده‌ی ضرورت کده‌بندی Na^+ در تحمل به شوری است. بر اساس محتوای Na^+ اندام هوایی گیاه در شرایط تنش شوری، پیشنهاد شده‌است که تحمل به شوری به‌شدت با توانایی محدودیت در تجمع Na^+ در اندام هوایی مرتبط می‌شود. در این پژوهش، Spm به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای سطوح بیان ژن NHX1 را در ریشه‌ها افزایش داد. همچنین گزارش شده‌است که تجمع پلی‌آمین در شرایط تنش شوری هدایت کاتیون تونوپلاستی را به‌ویژه در جهت انتخاب کامل K^+ در مقایسه با Na^+ که هر دو یون ناقل مشترک دارند باعث می‌شود، بنابراین به نظر می‌رسد که منجر به کده‌بندی واکوئلی بیشتر Na^+ و بهبود همئوستازی K^+/Na^+ سیتوزولی می‌شود (Zepeda-Jazo *et al.*, 2008). هر دو تغییر در سطوح بیان ژن و فعال‌سازی پروتئین‌های موجود دخیل در انتقال و کده‌بندی K^+ برای حفظ همئوستازی K^+ سیتوزولی در شرایط شوری ضروری هستند. بنابراین تنظیم و تعدیل پس ترجمه‌ای فعالیت کانال‌ها یا ناقل‌های موجود توسط عوامل متعدد و پیامبرهای ثانویه (از جمله پلی‌آمین‌ها) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. پلی‌آمین‌ها ممکن است نه فقط به‌عنوان جاروب‌کننده‌ی ROS، بلکه همچنین به‌عنوان فعال‌کننده‌ی بیان ژن‌های کدکننده‌ی پادبرهای Na^+/H^+ عمل کنند. گزارشات در مورد اثر EBL

بر بیان ناقل‌های سدیم بسیار محدود است. در این بررسی پیش تیمار EBL اثر معنی‌داری بر بیان ژن NHX1 نداشت و منجر به کاهش بیان ژن SOS1 در شرایط غیر تنش و شوری شد. با توجه به اینکه مسیر SOS از چندین جزء تشکیل شده است بایستی اثر EBL بر بیان سایر ژن‌های دخیل در این مسیر نیز مطالعه شود. بنابراین ممکن است EBL از طریق اثر بر بیان سایر ژن‌های این مسیر توانسته باشد منجر به بهبود تنش شوری در گیاه کدو شود که در مطالعات بعدی به آن پرداخته می‌شود. به‌طور کلی به نظر می‌رسد اثر هر دو تنظیم کننده رشد گیاهی Spm و EBL بر تخفیف تنش شوری به روش متفاوت باشد از جمله اینکه EBL با اثر بر ریشه‌زایی، تولید ریشه جانبی و افزایش سطح ریشه نسبت به اندام هوایی منجر به مقاومت به تنش شوری شده است در حالی که Spm از طریق افزایش بیان ژن NHX1 و در نتیجه تنظیم جذب و تجمع یون‌ها آستانه‌ی تحمل گیاه کدو در برابر شوری را افزایش داده است.

نتیجه‌گیری کلی

تنش شوری باعث کاهش پارامترهای رشد شامل وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه کدو و افزایش یون سدیم و بیان ژن SOS1 شد. مطالعات این پژوهش در مورد اثر پیش تیمار گیاه با Spm نشان داد که این ترکیب احتمالاً از طریق حفظ تمامیت غشاهای زیستی، افزایش بیان ژن NHX1 و در نتیجه تنظیم جذب و تجمع یون‌ها آستانه تحمل گیاه کدو در برابر شوری را افزایش داده است. پیش تیمار گیاه با Spm و EBL موجب بهبود رشد و افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش شوری گردید. تنش شوری موجب اختلال در جذب و انتقال یون‌های پتاسیم و کلسیم در گیاه کدو گردید. پیش تیمار با Spm و EBL موجب بهبود وضعیت تغذیه‌ای در گیاهان تحت تنش شد. به نظر می‌رسد که این ترکیبات از طریق حفظ تمامیت و افزایش ثبات غشای سلول‌ها، جذب عناصر توسط ریشه را بهبود بخشیده و در نتیجه موجب افزایش رشد در این نمونه‌ها شده‌اند. بر اساس نتایج مربوط به تجمع سدیم در اندام‌های مختلف گیاهان پیش تیمار شده با Spm و EBL می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که اثر دو تنظیم کننده‌ی رشد بر میزان تجمع سدیم ریشه به‌ویژه در شوری ۸۰ میلی‌مولار متفاوت بود به‌طوری‌که EBL و Spm (۱/۰ میلی‌مولار) به ترتیب منجر به کاهش و افزایش آن گردید. همان‌گونه که نتایج بیان ژن ناقل سدیم NHX1 نشان داد. به نظر می‌رسد Spm از طریق افزایش بیان این ژن منجر به کده‌بندی واکوئلی بیشتر Na^+ و بهبود هومئوستازی K^+/Na^+ سیتوزولی می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد هر دو ترکیب از طریق مهار انتقال یون سدیم از ریشه به بخش‌های هوایی حساس در تخفیف تنش شوری اثر داشته‌اند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهید باهنر کرمان در خصوص تأمین مالی انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

عدم تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A. and Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* 285: 1256-1258.
- Barragán, V., Leidi, E.O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J.A., Cubero, B. and Pardo, J.M. (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis. *The Plant Cell* 24: 1127-1142.
- Bassil, E., Ohto, M.-a., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., Belmonte, M., Peleg, Z., Yamaguchi, T. and Blumwald, E. (2011). The Arabidopsis intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX₅ and NHX₆ are endosome associated and necessary for plant growth and development. *The Plant Cell* 23: 224-239.
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 431-434.
- Clouse, S.D. (2011). Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *The Plant Cell* 23: 1219-1230.
- Çoban, Ö. and Baydar, N.G. (2016). Brassinosteroid effects on some physical and biochemical properties and secondary metabolite accumulation in peppermint (*Mentha piperita* L.) under salt stress. *Industrial Crops and Products* 86: 251-258.
- Ding, H.-D., Zhu, X.-H., Zhu, Z.-W., Yang, S.-J., Zha, D.-S. and Wu, X.-X. (2012). Amelioration of salt-induced oxidative stress in eggplant by application of 24-epibrassinolide. *Biologia Plantarum* 56: 767-770.
- dos Santos, L.A., Batista, B.L. and Lobato, A.K.d.S. (2021). 24-Epibrassinolide delays chlorophyll degradation and stimulates the photosynthetic machinery in magnesium-stressed soybean plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00344-00021-10539-00344>.
- Fariduddin, Q., Mir, B.A., Yusuf, M. & Ahmad, A. (2013). Comparative roles of brassinosteroids and polyamines in salt stress tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 2037-2053.
- Fariduddin, Q., Yusuf, M., Ahmad, I. and Ahmad, A. (2014). Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum* 58: 9-17.
- Farzi-Aminabad, R., Ghassemi-Golezani, K. and Nasrullahzadeh, S. (2021). Grain and oil yields of safflower (L.) Affected by water deficit and growth regulators. *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)* 67: 87-94.
- Gálvez, F.J., Baghour, M., Hao, G., Cagnac, O., Rodríguez-Rosales, M.P. and Venema, K. (2012). Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry* 51: 109-115.
- Grattan, S. and Grieve, C. (1998). Salinity–mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 78: 127-157.
- Gupta, B. and Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics* 2014: 1-18.
- Hasegawa, P.M. (2013). Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany* 92: 19-31.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology* 51: 463-499.
- Hauser, F. and Horie, T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell & Environment* 33: 552-565.
- Hussain, S.S., Ali, M., Ahmad, M. and Siddique, K.H. (2011). Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* 29: 300-311.
- Karlidag, H., Yildirim, E. and Turan, M. (2011). Role of 24-epibrassinolide in mitigating the adverse effects of salt stress on stomatal conductance, membrane permeability, and leaf water content, ionic composition in salt stressed strawberry (*Fragaria× ananassa*). *Scientia Horticulturae* 130: 133-140.
- Kohli, S.K., Bali, S., Tejpal, R., Bhalla, V., Verma, V., Bhardwaj, R., Alqarawi, A., Abd_Allah, E.F. and Ahmad, P. (2019). In-situ localization and biochemical analysis of bio-molecules reveals Pb-stress amelioration in *Brassica juncea* L. by co-application of 24-Epibrassinolide and salicylic acid. *Scientific Reports* 9: 1-15.

- Liu, C., Li, C., Liang, D., Wei, Z., Zhou, S., Wang, R. and Ma, F. (2012). Differential expression of ion transporters and aquaporins in leaves may contribute to different salt tolerance in *Malus* species. *Plant Physiology and Biochemistry* 58: 159-165.
- Liu, J.-H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. and Moriguchi, T. (2007). Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology* 24: 117-126.
- Lohaus, G., Hussmann, M., Pennewiss, K., Schneider, H., Zhu, J.J. and Sattelmacher, B. (2000). Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *Journal of Experimental Botany* 51: 1721-1732.
- Manghwar, H., Hussain, A., Ali, Q. and Liu, F. (2022). Brassinosteroids (BRs) Role in plant development and coping with different stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1012-1027.
- Mohammadi, H., Akhondzadeh, M. and Hatami, M. (2021). Exogenously applied 24-Epibrassinolide modulates physiological and biochemical constituents in lavender (*Lavandula angustifolia*) plants under drought stress conditions. *Agriculture & Forestry/Poljoprivreda i Sumarstvo* 67: 103-120.
- Morillon, R., Catterou, M., Sangwan, R.S., Sangwan, B.S. and Lassalles, J.-P. (2001). Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 212: 199-204.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* 25: 239-250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645-663.
- Munns, R., James, R.A. and Läuchli, A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57: 1025-1043.
- Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Müssig, C. (2005). Brassinosteroid-promoted growth. *Plant Biology* 7: 110-117.
- Olias, R., Eljakaoui, Z., Li, J., De Morales, P.A., Marin-Manzano, M.C., Pardo, J.M. and Belver, A. (2009). The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. *Plant, Cell & Environment* 32: 904-916.
- Pandey, D., Goswami, C. and Kumar, B. (2003). Physiological effects of plant hormones in cotton under drought. *Biologia Plantarum* 47: 535-540.
- Parida, A.K. and Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Pottosin, I. and Shabala, S. (2014). Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science* 5: 154.
- Rasool, A., Shah, W.H., Mushtaq, N.U., Saleem, S., Hakeem, K.R. and ul Rehman, R. (2022). Salinity-induced changes on different physiological and biochemical features of plants. *Plant Abiotic Stress Physiology*. Apple Academic Press, pp. 201-224.
- Rodríguez-Rosales, M.P., Gálvez, F.J., Huertas, R., Aranda, M.N., Baghour, M., Cagnac, O. and Venema, K. (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signaling & Behavior* 4: 265-276.
- Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*/Joseph Sambrook, David W. Russell. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shabala, S. and Cuin, T.A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 133: 651-669.
- Shabala, S., Cuin, T.A. and Pottosin, I. (2007). Polyamines prevent NaCl-induced K⁺ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. *FEBS Letters* 581: 1993-1999.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J.-K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 6896-6901.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M. and Zhu, J.-K. (2002). The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *The Plant Cell* 14: 465-477.

- Siddiqui, M.H., Al-Wahaibi, M.H., Faisal, M. & Al Sahli, A.A. (2014). Nano-silicon dioxide mitigates the adverse effects of salt stress on *Cucurbita pepo* L. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 2429-2437.
- Silva, C., Martinez, V. and Carvajal, M. (2008). Osmotic versus toxic effects of NaCl on pepper plants. *Biologia Plantarum* 52: 72-79.
- Sudhir, P. & Murthy, S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42: 481-486.
- Sun, Y., Veerabomma, S., Abdel-Mageed, H.A., Fokar, M., Asami, T., Yoshida, S. & Allen, R.D. (2005). Brassinosteroid regulates fiber development on cultured *Cotton ovules*. *Plant and Cell Physiology* 46: 1384-1391.
- Wu, C.-A., Yang, G.-D., Meng, Q.-W. & Zheng, C.-C. (2004). The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter plays an important role in salt stress. *Plant and Cell Physiology* 45: 600-607.
- Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Miyazaki, A., Takahashi, T., Michael, A. and Kusano, T. (2006). The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 580: 6783-6788.
- Yamaguchi, T. and Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science* 10: 615-620.
- Zahran, H.H., Marín-Manzano, M.C., Sánchez-Raya, A.J., Bedmar, E.J., Venema, K. and Rodríguez-Rosales, M.P. (2007). Effect of salt stress on the expression of NHX-type ion transporters in *Medicago intertexta* and *Melilotus indicus* plants. *Physiologia Plantarum* 131: 122-130.
- Zepeda-Jazo, I., Shabala, S., Chen, Z. and Pottosin, I.I. (2008). Na⁺-K⁺ transport in roots under salt stress. *Plant Signaling & Behavior* 3: 401-403.
- Zhang, N., Shi, X., Guan, Z., Zhao, S., Zhang, F., Chen, S., Fang, W. and Chen, F. (2016). Treatment with spermidine protects chrysanthemum seedlings against salinity stress damage. *Plant Physiology and Biochemistry* 105: 260-270.
- Zheljazkov, V.D. and Nielsen, N.E. (1996). Effect of heavy metals on peppermint and cornmint. *Plant and soil* 178: 59-66.
- Zhou, Y., Diao, M., Chen, X., Cui, J., Pang, S., Li, Y., Hou, C. and Liu, H.-y. (2019). Application of exogenous glutathione confers salinity stress tolerance in tomato seedlings by modulating ions homeostasis and polyamine metabolism. *Scientia Horticulturae* 250: 45-58.
- Zhu, J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.

The effect of pretreatment of Epibrasinolide and Spermine on some growth, physiological parameters and SOS1 and NHX1 gene expressions in Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) under salinity stress

F. Nejad-Alimoradi^{1*}, F. Nasibi², M. Sheikhbahaei³

Received: 2022.3.13

Accepted: 2022.6.25

Abstract

Introduction: The positive potential of brassinosteroids and polyamines as protective agents for environmental stresses has been proven. **Methods:** In this study, *Cucurbita pepo* was pretreated with 24-epibrasinolide (EBL) (0, 0.01 and 0.1 μ M) and spermine (0, 0.1 and 1 mM) and then salinity treatment (0, 40 and 80 mM sodium chloride) was applied. **Results and discussion:** Salinity stress decreased dry weight, potassium and calcium contents and increased sodium content. EBL and Spm increased potassium, calcium and decreased sodium in shoots. Salinity stress increased root SOS1 gene expression and had no effect on NHX1 gene expression. EBL and Spm decreased expression of SOS1 gene while Spm increased expression of NHX1 gene. Therefore, it seems that Spm via the over-expression of the *NHX1* gene substantially increased the tolerance to stress by sequestering excess Na^+ into the vacuoles and sustaining a better cellular environment for improvement of plant growth under salinity stress.

Key words: Polyamine, Plant growth regulator, Osmotic stress, Sodium transporter gene

¹. Assistant Professor, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran *(Corresponding author: alimoradi@pnu.ac.ir)

². Associate Professor of Plant Physiology, Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

³. PhD student in Generic, Department of Biology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran