ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه جهش‌یافته *dreb2a* در مقایسه با *dreb1a* در شرایط طبیعی

سمیه کهساری[۱]، محمدباقر باقریه نجار[۱*]، حمیدرضا صادقی‌پور[۱] و عیسی کهن باغخیراتی[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، [۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۲/۲۸)

چکیده

فاکتورهای رونویسی DREB یکی از بزرگترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی در گیاهان هستند که تصور می‌شود عملکردهای تنظیمی مهمی در تحمل به تنش محیطی ایفا می‌کنند، ولی اطلاعات کاملی در مورد نقش آنها در کنترل ویژگی‌های مورفولوژیکی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان رشدیافته تحت شرایط طبیعی وجود ندارد. در این مطالعه، برخی ویژگی‌های فنوتیپی گیاهان آرابیدوپسیس جهش‌یافته *dreb2a* و *dreb1a* در مقایسه با گیاه وحشی، تحت شرایط رشدی طبیعی مقایسه شد. بیشتر ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در گیاهان جهش‌یافته *dreb2a* و *dreb1a* مشابه هم و متفاوت با گیاه وحشی بود. ظهور ریشه‌چه و لپه‌ها در هر دو لاین جهش‌یافته سریع‌تر از لاین وحشی مشاهده شد، اما جوانه گلزا (bolting) با تأخیر تشکیل شد. شاخه‌های جانبی تشکیل‌شده روی گلاذین در لاین‌های جهش‌یافته ٪۲۵ کمتر از لاین وحشی ولی شاخه‌های جانبی کنار گلاذین ٪۲۰ بیشتر از گیاه وحشی بود. هر دو لاین جهش‌یافته در مقایسه با لاین وحشی در تعداد کل خورجین در گیاه (حدود ٪۱۰)، تعداد کل بذر به‌ازای هر گیاه (حدود ٪۴۰) و وزن کل بذر در گیاه (حدود ٪۱۳) افزایش نشان دادند، درحالیکه محتوای پروتئین محلول بذر و نسبت کروسیفرین/ ناپین در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی کمتر بود. قابل توجه اینکه، در دانهال ۱۴ روزه و برگ‌های گیاه در مرحله زایشی، در دو لاین جهش‌یافته در مقایسه با لاین وحشی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز به‌طور متوسط ٪۳۵ و هیدروژن پراکسید به‌طور متوسط ٪۷۰ بیشتر بود. این داده‌ها نشان می‌دهد که تغییر بیان ژن‌های مورد مطالعه، در کنترل ویژگی‌های مورفولوژیکی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان رشدیافته تحت شرایط طبیعی نقش اساسی ایفا می‌کنند و مطالعه مراحل آبشاری انتقال سیگنال مدیریت‌شده توسط فاکتورهای رونویسی خانواده DREB می‌تواند راه‌گشای درک عمیق‌تری از مکانیسم پاسخ این گیاهان به تنش‌های متنوع محیطی باشد.

کلمات کلیدی: آرابیدوپسیس تالیانا، تنش‌های محیطی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فاکتورهای رونویسی، جهش‌یافته‌های *dreb*.

مقدمه

گیاهان طی چرخه زندگی طبیعی خود همواره با طیف وسیعی از تنش‌های محیطی از قبیل خشکی، شوری و تغییرات دمایی مواجه می‌شوند. از آنجایی‌که این تنش‌ها منجر به کاهش شدید تولید بسیاری از محصولات زراعی می‌شوند، مطالعه پاسخ گیاهان به آنها برای پژوهشگران حائز اهمیت است. با توجه به آنالیز داده‌های ترانسکریپتوم، ژن‌های دخیل در پاسخ گیاهان به تنش خشکی پروتئین‌های مختلفی را کد می‌کنند (Seki *et al.*,

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m.b.bagherieh@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

2002). برخی از آنها پروتئین‌هایی هستند که سلول‌ها را از اثرات تنش آب محافظت می‌کنند. از این گروه می‌توان به محافظت‌کننده‌های اسمزی، پروتئین‌های کانال آبی و ناقل‌های غشایی، پروتئین‌های محافظت‌کننده و پایدارکننده ساختارهای سلولی و پروتئین‌های برطرف‌کننده آسیب‌های ناشی از فرم‌های فعال اکسیژن (ROS) و پروتئین‌های محافظت‌کننده ماکرومولکول‌ها از جمله پروتئین‌های (Late embryogenesis abundant) LEA، چپرون‌ها و غیره اشاره کرد (Cushman and Bohnert, 2000). گروه دیگر پروتئین‌های تنظیمی هستند که در تنظیم ترارسانی علامت تنش و تعدیل بیان ژن‌های دیگر نقش دارند و شامل فاکتورهای رونویسی متنوعی از قبیل myelocytomatosis oncogene (MYC)، myeloblastosis oncogene (MYB)، basic leucine zipper (bZIP) و dehydration responsive element binding (DREB) می‌شوند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

در ژنوم گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا نزدیک به ۱۵۰۰ فاکتور رونویسی گزارش شده است که تصور می‌شود در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش دخیل هستند (Riechmann *et al.*, 2000)، که حدود ٦ درصد پروتئوم گیاه را به خود اختصاص داده است (Joshi *et al.*, 2016). از جمله این فاکتورهای رونویسی، اعضای ابرخانواده AP2 (APETALA2) هستند که براساس تعداد تکرار و توالی دمین ۵۰-۷۰ آمینواسیدی AP2/ERF موجود در توالی آنها توصیف می‌شوند. این ابرخانواده در آرابیدوپسیس ۱٤۵ عضو دارد که در خانواده‌های DREB، ERF، AP2 و RAV طبقه‌بندی می‌شوند (Nakano *et al.*, 2006). فاکتورهای رونویسی خانواده DREB پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که به‌طور اختصاصی به توالی (A/GCCGAC) DRE/CRT موجود در پروموتور برخی ژن‌های دخیل در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی از جمله گرما، سرما، خشکی و شوری متصل شده و بیان آنها را از طریق مسیرهای وابسته به ABA و مستقل از آن فعال می‌کنند (Lata and Prassad, 2011). ژن‌های خانواده *DREB* در آرابیدوپسیس (Sakuma *et al.*, 2002)، جو (Choi *et al.*, 2002)، برنج (Dubouzet *et al.*, 2003)، گندم (Jaglo *et al.*, 2001) و سیب‌زمینی (Bouaziz *et al.*, 2015) شناسایی شده و به‌نظر می‌رسد در گیاهان عالی حفاظت‌شده هستند. این خانواده در آرابیدوپسیس شامل دو گروه *DREB1* و *DREB2* می‌شود.

گروه ژنی *DREB1* در آرابیدوپسیس شش عضو دارد که در این میان ژن‌های *DREB1A*/CBF3 (At4g25480) *DREB1B*/CBF1 (At4g25490) و (At4g25470) *DREB1C*/CBF2 در ژنوم آرابیدوپسیس به‌صورت پشت سر هم روی کروموزوم شماره چهار قرار گرفته‌اند (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1994) و نقش حیاتی آنها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نظیر سرما، شوری و خشکی به اثبات رسیده است (Agarwal *et al.*, 2006). بیش‌بیانی اعضای خانواده *DREB*1/CBF، منجر به تأخیر رشد (Sakuma *et al.*, 2006a) و بهبود تحمل یخ‌زدگی، خشکی و شوری بالا در لاین تراریخت آرابیدوپسیس می‌گردد (Kasuga *et al.*, 1999). جهش در ژن *dreb1a* باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز می‌شود (Kohan *et al.*, 2018).

گروه ژنی *DREB2* در آرابیدوپسیس هشت عضو دارد که مسیرهای سیگنالینگ پاسخ‌دهنده به گرما، خشکی و شوری را تنظیم می‌کنند و در این میان، *DREB2B* (At3g11020) و *DREB2A* (At5g05410) بسیار به‌هم شبیه‌اند. بیش‌بیانی *DREB2A*، منجر به تأخیر رشد (Sakuma *et al.*, 2006a) و افزایش بیان ژن‌های القاپذیر با شوک گرمایی یا دهیدراسیون شده و تحمل گیاه به خشکی، شوری و شوک گرمایی را در آرابیدوپسیس بهبود می‌بخشد (Liu *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2006b). نتایج مطالعات Sakuma و همکاران (2006b) بر روی لاین جهش‌یافته *dreb2a* نشان داد جهش‌یافته‌های فوق تحت تنش گرما از قدرت زنده‌مانی کمتری برخوردارند. لیکن در خصوص ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ناشی از اثرات نقصان ژن *DREB2A* در گیاهان رشدیافته تحت شرایط طبیعی اطلاع جامعی در دست نیست. لذا در این پژوهش خصوصیات دقیق فنوتیپی از قبیل جوانه‌زنی، طول ریشه و مراحل رشدی بذر تا بذر و همچنین وضعیت ROS و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی لاین‌های جهش‌یافته *dreb2a* و *dreb1a* در شرایط طبیعی با گیاه وحشی مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

شرایط رشد گیاه: بذرهای آرابیدوپسیس تالیانا واریته کلمبیا (Col-0) شامل لاین وحشی و لاین جهش‌یافته حاوی T-DNA واردشده در تنها اگزون ژن *DREB2A* (شماره دسترسی N436350) و لاین جهش‌یافته حاوی T-DNA واردشده در جایگاه پروموتوری ژن *DREB1A* (شماره دسترسی N413033) از مجموعه ذخیره بذر ناتینگهام (NASC) در کشور انگلستان خریداری شد. از آنجایی‌که استوک‌های بذری خریداری‌شده مخلوطی از لاین‌های وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت بودند، لاین هموزیگوت با استفاده از غربالگری با نشانگرهای مولکولی جداسازی شد. بذرها با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۷ دقیقه و سپس با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. پس از ۵ بار شستشو با آب‌مقطر استریل، و پس از مدت ۳ روز سرمادهی مرطوب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بر روی پتری‌دیش‌های حاوی آگار و محیط‌کشت موراشیک و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) و یا گلدان جی‌فی (Jiffy company-The Nederlands) کشت شده و به اتاقک رشد با تناوب نوری ۸/۱٦ ساعت روشنایی/ تاریکی و دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ٤۰–۵۰ درصد منتقل شدند.

استخراج DNA و جداسازی لاین جهش‌یافته: استخراج DNA گیاهچه‌های ٤ تا ۵ هفته‌ای با استفاده از پروتکل (Kasajima *et al.*, 2004) به شرح زیر انجام شد. در این روش از بافر استخراج حاوی Nacl ۲۵۰ میلی‌مولار، Tris ۲۰۰ میلی‌مولار و EDTA ۲۵ میلی‌مولار با pH=۵/۷ و استات پتاسیم ۳ مولار استفاده شد. غربالگری لاین‌های جهش‌یافته از طریق واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده برای ژن *DREB2A* (با نرم‌افزار پرایمر3 WWW.PRIMER3.COM) و پرایمرهای معرفی‌شده برای T-DNA (جدول ۱) انجام گردید. مراحل جداسازی لاین جهش‌یافته *dreb1a* قبلاً توسط Kohan-Baghkheirati و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *DREB1A* و پرایمرهای T-DNA شرح داده شده است.

آنالیز فنوتیپی گیاه جهش‌یافته: آنالیزهای فنوتیپی در محیط‌کشت درون شیشه و گلدان جی‌فی در اطاقک رشد در دانشگاه گلستان در طول سال ۱۳۹٦ انجام شد. در هر پلیت ٤۰ بذر در سه تکرار و در هر گلدان ۵ بذر در ۱۰ تکرار استفاده شد (بذرهای مورد استفاده از کشت سه لاین در شرایط زمانی و مکانی یکسان به‌دست آمدند). در کشت گلدان، بعد از حدود یک هفته، در هر گلدان نهایتاً یک گیاه نگهداری شد. شاخص‌های نموی و مراحل رشد سه لاین آرابیدوپسیس در محیط‌کشت درون شیشه و گلدان جی‌فی براساس استاندارد تعریف‌شده توسط (Boyes *et al.*, 2001) (جدول ۲) آنالیز شد. برای گیاهان رشدیافته در محیط درون شیشه (محیط‌کشت MS) مراحل نموی تا مرحله ۱/۰٤ و برای گیاهان رشدیافته در گلدان مراحل نموی ۱/۰۲ تا مرحله ۸/۰۰ ثبت شد.

جهت بررسی طول ریشه در روز سوم بعد از جوانه‌زنی نوک ریشه‌ها را علامت زده و بعد از گذشت ۱۰ روز محل نوک ریشه دوباره علامت‌گذاری شد. تصویر پلیت‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال تهیه گردید. نهایتاً حد فاصل بین دو علامت‌گذاری روی پلیت با نرم‌افزار image j (http://rsbweb.nih.gov/ij) اندازه‌گیری شده و به‌عنوان میزان رشد طولی نسبی ریشه در ۱۰ روز گزارش شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز محلول: مقدار ۰/۰۵ گرم بافت تر (دانهال و برگ در مرحله زایشی) در هاون چینی سرد با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات مونوسدیک ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=٦/۸ مطابق روش (Kar and Mishra, 1976) هموژن گردید. هموژن حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه با شتاب g ۱۳۰۰۰ و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از روشناور برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز براساس میزان مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم توسط ریبوفلاوین در طول‌موج

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده‌شده

نام	توالی پرایمرها ('3-'5)
(At5g05410) *DREB2A*	F: GCTTCTTGAGCAGTAGGGAAAGTA R: CGAAAAAGCTACACACAAGAAGA
(At4g25480) *DREB1A*	F: TTTCCGCCAAAACTACTTG R: CAAAAGAAAAGGCGAAGACG
T-DNA	F: ATATTGACCATCATACTCATTGC R: GTGGATTGATGTGATATCTCC

جدول ۲- شاخص‌های نموی و مراحل رشد در گیاهان رشدیافته در محیط‌کشت درون شیشه و گلدان

مراحل رشد درون شیشه	توصیف	مراحل رشد در گلدان	توصیف
۰/۱	آبنوشی بذر	۱/۰۲	۲ برگ روزت بزرگتر از ۱ میلی‌متر
۰/۵	خروج ریشه‌چه	۱/۱٤	۱٤ برگ روزت بزرگتر از ۱ میلی‌متر
۰/۷	خروج هیپوکوتیل	۵/۱۰	ظهور اولین جوانه ساقه گل‌زا
۱/۰۰	بازشدن کامل لپه‌ها	٦/۰۰	بازشدن اولین گل
۱/۰۲	۲ برگ روزت بزرگتر از ۱ میلی‌متر	٦/۰۹	پایان گلدهی
۱/۰٤	٤ برگ روزت بزرگتر از ۱ میلی‌متر	۸/۰۰	بازشدن اولین خورجین

۵٦۰ نانومتر در حالت فتومتریک دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-1800) اندازه‌گیری شد (Beauchamp and Fridovich, 1971). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر حاوی ۲۵۰/۲ میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH=۷/۸)، ۲۰۰ میکرولیتر EDTA (۰/٦٦ میلی‌مولار)، ۳۰۰ میکرولیتر متیونین (۱۰ میلی‌مولار)، ۱۵۰ میکرولیتر NBT (٦٦ میکرومولار)، ۵۰ میکرولیتر ریبوفلاوین (۳/۳۵ میکرومولار) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود.

فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول طبق روش (Chance and Maehly, 1955) در طول‌موج ٤۷۰ نانومتر در حالت کینتیک اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-1800) و ضریب خاموشی $26/6\ L.mmol.cm^{-1}$ اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل ۲۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH=٦/۸ و ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ٤۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود.

اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید: ابتدا ۰/۱ گرم بافت تازه (دانهال و برگ در مرحله زایشی) با ٦۰۰ میکرولیتر محلول تیوکلرو استیک اسید ۰/۱ درصد مطابق روش Sergiev و همکاران (۱۹۹۷)، کاملاً به‌صورت هموژن در آمده، سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱٤۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. روشناور حاصل برای سنجش هیدروژن پراکسید استفاده شد.

برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید طبق روش Sergiev و همکاران (۱۹۹۷)، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از روشناور به ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) اضافه گردید. سپس یک میلی‌لیتر از مخلوط یدید پتاسیم ۱ مولار در بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار که به‌صورت تازه تهیه شد، به آن اضافه گردید. پس از گذشت ۱ ساعت شدت رنگ تشکیل شده به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-1800) در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

استخراج پروتئین از بذر: ۰/۱ گرم بذر گیاهان در ازت مایع با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸) پودر شده و بعد از هموژن‌شدن، ۱۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول و ۱۰ میکرولیتر phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) اضافه شد. مخلوط حاصله به میکروتیوب منتقل شده و در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

شرایط ٤ درجه سانتی‌گراد و g ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. از روشناور برای سنجش پروتئین محلول با روش (Bradford, 1976) استفاده گردید.

جداسازی پروتئین‌ها توسط الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE): الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات تحت شرایط احیائی در یک سیستم ژل ناپیوسته با غلظت آکریل آمید ۱۲/۵ ٪ مطابق روش (Fling and Gregerson, 1986) انجام شد و تصویر با کمک دستگاه Gel Doc تهیه شد.

آنالیزهای آماری: به‌منظور آنالیز و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و برای رسم نمودارها از Excel استفاده شد. برای بررسی معنی‌داربودن اختلاف میانگین داده‌ها از آزمون LSD در سطح ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج و بحث

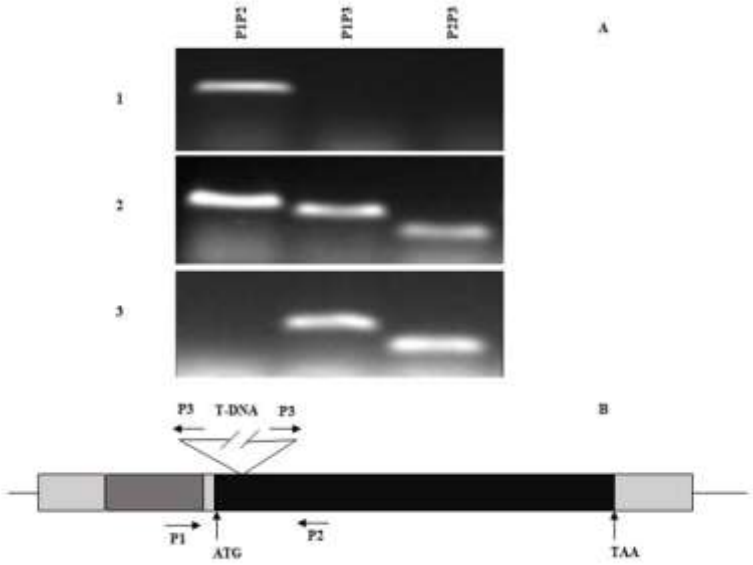
جداسازی جهش‌یافته *dreb2a*: T-DNA واردشده در لوکوس ژن *DREB2A* از طریق واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *DREB2A* و T-DNA ردیابی شد (شکل A–۱). همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، گیاهی که در آن قطعه مورد نظر با پرایمرهای P1P2 تکثیر شد ولی با پرایمرهای P1P3 و P2P3 تکثیر نشد، به‌عنوان لاین وحشی در نظر گرفته شد (لاین شماره یک در شکل A–۱)، گیاهی که در آن قطعه مربوط به ژن *DREB2A* با پرایمرهای P1P2 تکثیر نشد ولی با پرایمرهای P1P3 و P2P3 تکثیر شد، به‌عنوان لاین جهش‌یافته هموزیگوت در نظر گرفته شد (لاین شماره سه در شکل A–۱) و گیاهی که قطعه مورد نظر با پرایمرهای ژن *DREB2A* و T-DNA تکثیر شد، به‌عنوان لاین جهش‌یافته هتروزیگوت در نظر گرفته شد (لاین شماره دو در شکل A–۱). محل دقیق ورود T-DNA در این لاین در محل ٤٦٨ جفت باز در ناحیه شروع رونویسی ژن و در ناحیه اگزون ژن *DREB2A* است (شکل B–۱).

با توجه به اینکه اطلاعات کمی در رابطه با نقش پروتئین‌های DREB در جوانه‌زنی دانه وجود دارد، اثر جهش در ژن *DREB* بر روی قدرت جوانه‌زنی در محیط MS انجام شد. درصد جوانه‌زنی نهایی بین سه لاین تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل A–۲)، لیکن T50 که نشان‌دهنده مدت زمان لازم برای رسیدن به ۵۰ درصد جوانه‌زنی است، در دو لاین جهش‌یافته به‌طور متوسط ۵۲ درصد کمتر از لاین وحشی بود. این نتایج بیانگر زنده‌مانی مشابه بین سه لاین مورد آزمایش، ولی بالاتربودن قدرت بذر در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی است (شکل B–۲). Zhao و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند لاین جهش‌یافته‌های یگانه و دوگانه در ژن‌های *DREB1*، تفاوت معنی‌داری با لاین وحشی در درصد جوانه‌زنی نداشتند، لیکن درصد جوانه‌زنی در جهش سه‌گانه ژن‌های *DREB1* به‌طور معنی‌داری کمتر از لاین وحشی بود که نتیجه این مطالعه در رابطه با جهش‌یافته *dreb1a* را تأیید می‌کند، هر چند نتیجه مربوط به جهش‌یافته *dreb2a* برای اولین بار گزارش می‌شود. از طرفی مطالعات Kohan-Baghkheirati و همکاران (۲۰۱۸) حاکی از این است که جوانه‌زنی *dreb1a* کاهش یافته است که این تفاوت می‌تواند با قدرت بذر و شرایط نگهداری بذر مرتبط باشد. این نتایج نشان می‌دهد احتمالاً همولوگ‌های دیگر این دو ژن (*DREB1A* و *DREB2A*) می‌تواند نقش این دو ژن در کنترل درصد نهایی جوانه‌زنی را پوشش دهند.

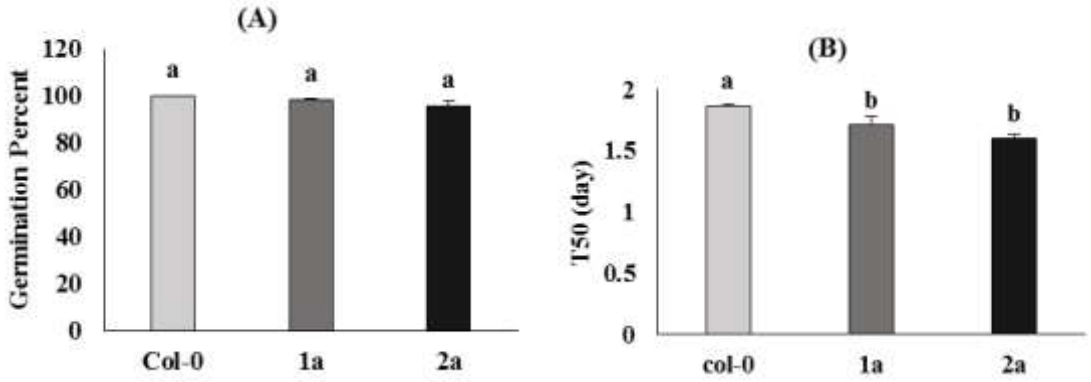
تأثیر نقصان بیان ژن *DREB1A* و *DREB2A* بر مراحل دانهال ١٤ روزه: بررسی دقیق‌تر فرآیند رشد دانهال این سه لاین در محیط MS نشان داد هر چند رشد دانهال‌ها از روز سوم به بعد روند مشابهی داشت و طول ریشه در گیاهان جهش‌یافته با طول ریشه در گیاهان وحشی تفاوت معنی‌داری نداشت، سرعت ظهور ریشه‌چه (مرحله ۰/۵) و بازشدن لپه‌ها (مرحله۱/۰۰) در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی بیشتر بود (شکل ۳).

تا آنجا که نویسندگان اطلاع دارند تاکنون مطلبی در رابطه با بررسی فنوتیپی در مرحله دانهال لاین *dreb2a* چاپ نشده است. نتایج مربوط به‌کار ما نشان داد که دو لاین جهش‌یافته در مقایسه با لاین وحشی فنوتیپ تسریع در ظهور ریشه‌چه و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]



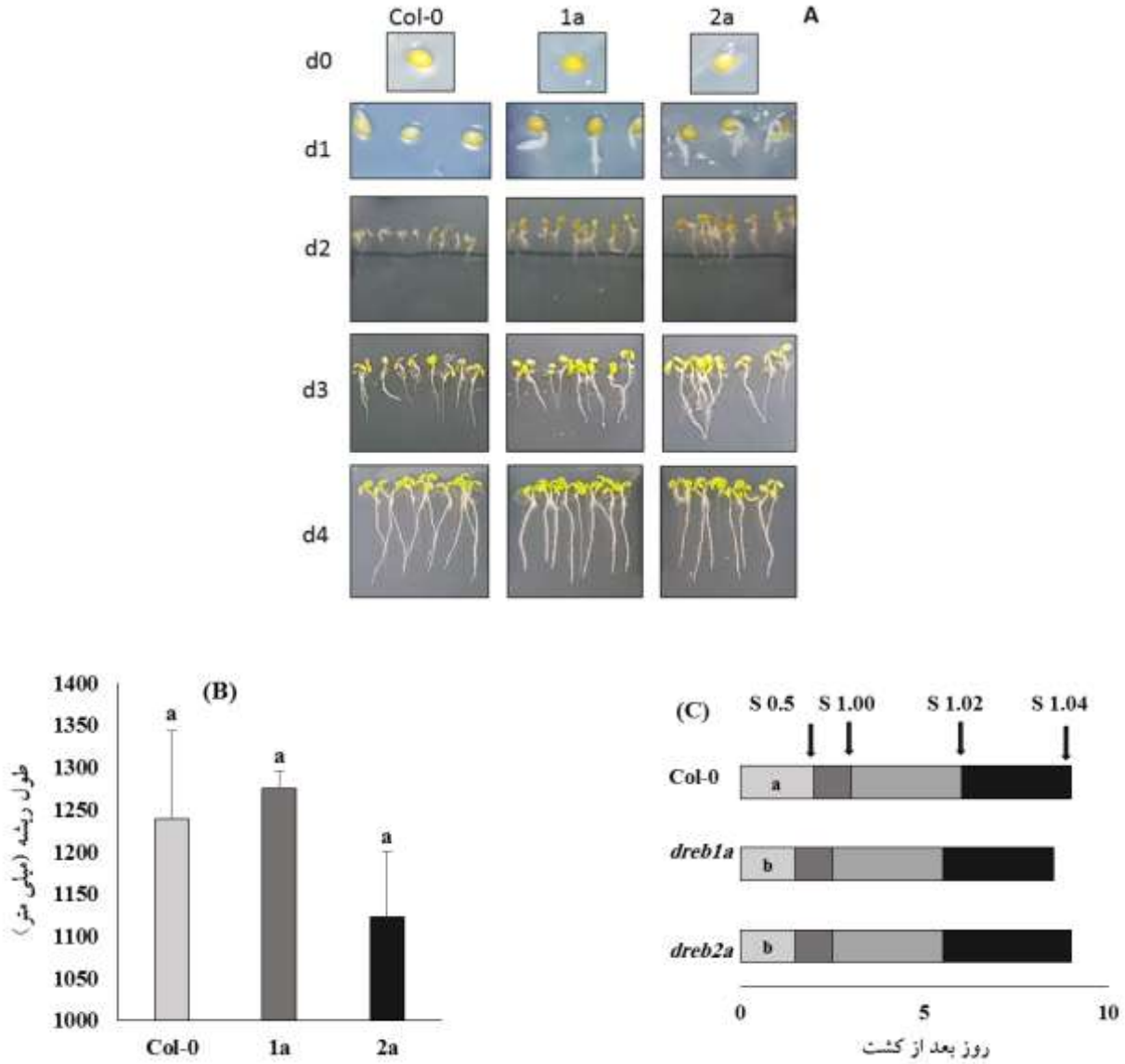
شکل ۱- A) شناسایی لاین هموزیگوت جهش‌یافته *dreb2a*. نتایج واکنش PCR با ترکیب پرایمرهای اختصاصی ژن و T-DNA. B) طرح شماتیک از محل ورود T-DNA در ناحیه اگزون ژن *DREB2A* در این شکل جعبه مشکی‌رنگ ناحیه کدکننده ژن، جعبه خاکستری ناحیه غیرترجمه‌ای، P پرایمر، ATG کدون آغاز و UAA کدون پایان را نشان می‌دهند.



شکل ۲- مقایسه A) درصد جوانه‌زنی نهایی، B) سرعت جوانه‌زنی (T50) بین دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* و لاین وحشی در غلظت ساکارز یک درصد (1% ms) (Col-0) نمایانگر لاین وحشی و 1A و 2a به‌ترتیب نمایانگر دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند). میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test, $P \leq 0.05$).

تسریع در بازشدن کامل کوتیلدون‌ها را نشان می‌دهند. از طرفی نتایج (Je *et al.*, 2014) نشان داد که بیش‌بیان *DREB2C* (یک همولوگ *DREB2A*) باعث تأخیر در رشد دانهال و بازشدن کامل لپه‌ها و افزایش در محتوای ABA در مقایسه با لاین وحشی می‌شود. نتایج Zhao و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد جهش‌یافته ARAG1 (یک ژن *DREB* در گیاه برنج) طی جوانه‌زنی و رشد دانهال نسبت به کاربرد ABA حساسیت افزایش‌یافته نشان می‌دهد. هر چند در رابطه با ارتباط پروتئین‌های DREB و مسیر وابسته به ABA اطلاعات کمی وجود دارد با توجه به افزایش محتوای ABA در لاین بیش‌بیان *DREB2C* و پاسخ جهش‌یافته arag1 نسبت به ABA می‌توان احتمال داد تسریع در جوانه‌زنی و بازشدن کامل لپه‌ها در دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* نسبت به لاین وحشی مرتبط با کاهش در سطح هورمون ABA و عملکرد DREB از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

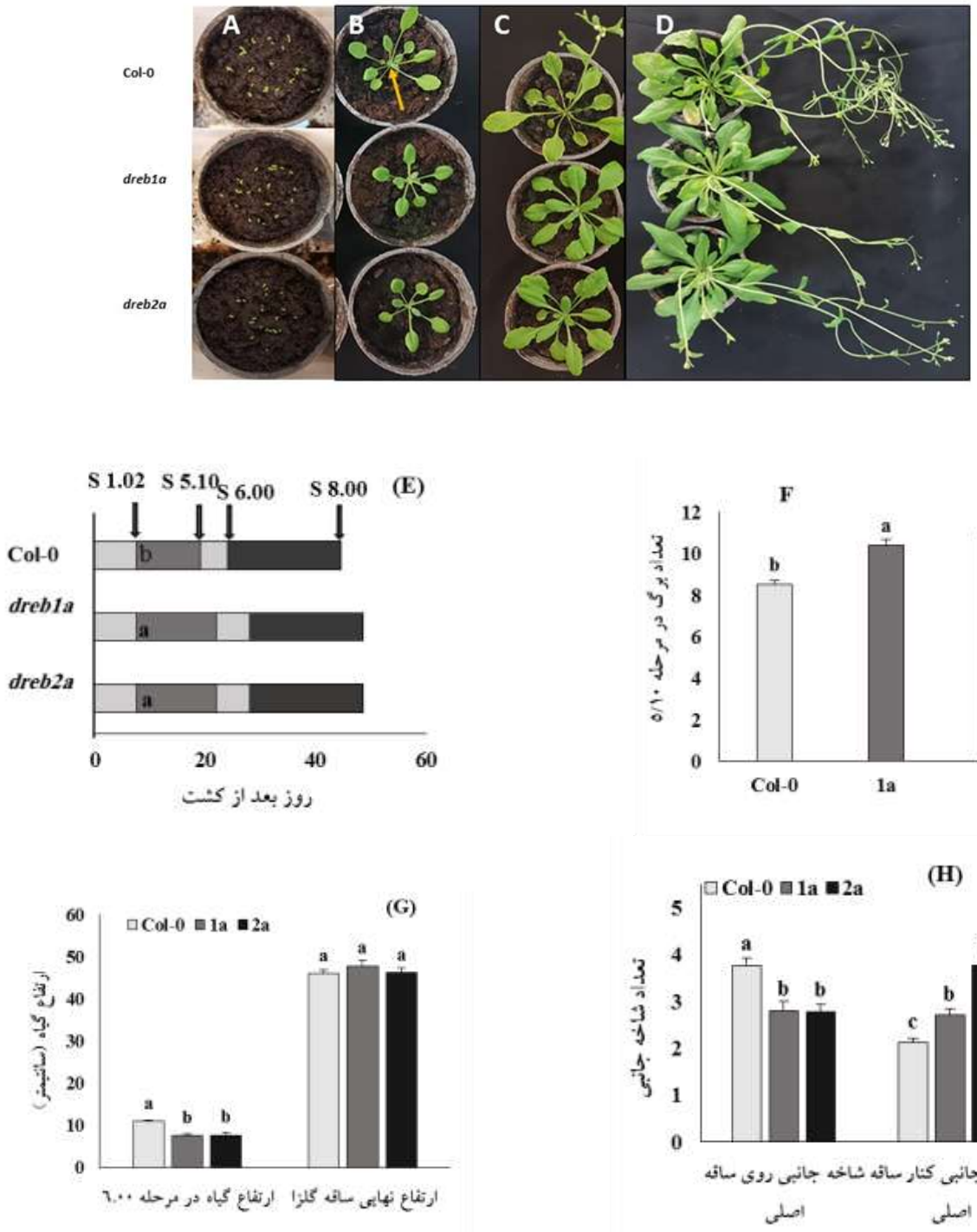


شکل ۳- مقایسه A) مراحل پس از جوانه‌زنی، B) طول ریشه و C) بررسی مراحل رشدی بین ۳ لاین آرابیدوپسیس در محیط MS. در دو لاین جهش‌یافته. مرحله بازشدن کامل لپه‌ها نسبت به لاین وحشی کوتاه‌تر است. (Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به‌ترتیب نمایانگر دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند و d0 تا d4 نمایانگر روز صفر تا روز چهار است). داده‌ها براساس میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند و ستاره نمایانگر تفاوت معنی دار ۰/۰۵ است (LSD test, $P \leq 0.05$).

طریق مسیر وابسته به ABA باشد.

به‌علاوه این آزمایش نشان داد طول ریشه در محیط MS تفاوت معنی‌داری بین سه لاین مورد آزمایش وجود ندارد. این نتیجه در مورد *dreb2a* اولین بار گزارش می‌شود و از طرفی نتایج آزمایش Zhau و همکاران (۲۰۱۵) بر روی جهش‌یافته *dreb1* در مورد گیاهان جهش‌یافته *dreb1* را تأیید می‌کند. لیکن نتایج Zhau و همکاران (۲۰۱۵) روی جهش‌یافته سه‌گانه *dreb1* فنوتیپ کاهش معنی‌دار طول ریشه را نشان داد. بنابراین نتایج پیشنهاد می‌کند احتمالاً همولوگ‌های دیگر ژن *DREB1A* می‌تواند جایگزین این ژن‌ها در دو لاین جهش‌یافته شده و نقش احتمالی این ژن‌ها بر طول ریشه را هم‌پوشانی کنند. در رابطه با فنوتیپ طول ریشه در جهش‌یافته *dreb2a* این احتمال وجود دارد که ژن *DREB2A* نقشی در طول ریشه ندارند و یا همولوگ‌های دیگر آن (*DREB2B, DREB2C*) نقش این ژن را

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]



شکل ٤- مقایسه ویژگی‌های بذری بین لاین وحشی و دو لاین جهش‌یافته. A) تعداد خورجین، B) تعداد بذر در خورجین، C) تعداد بذر، D) وزن هزار دانه، E) وزن کل بذر به‌ازای هر گیاه. (Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به‌ترتیب نمایانگر دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند). میانگین‌های دارای حروف مشابه، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test, P≤ 0.05).

هم‌پوشانی می‌کنند که برای فهم این مطلب نیاز به جهش‌یافته‌های دوگانه و سه‌گانه این گروه ژنی است.

تأثیر نقصان بیان ژن *DREB1A* و *DREB2A* بر مراحل

زایشی: مطالعه مقایسه‌ای ویژگی‌های مورفولوژیک از جمله تعداد برگ در زمان ظهور جوانه گلزا (مرحله۵/۰۱)، ارتفاع گلاذین (٦/۰۰)، ارتفاع گیاه کامل و تعداد شاخه جانبی بین سه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

لاین، نشان داد که دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* در زمان بروز جوانه گلزا دارای تعداد برگ بیشتری (به‌طور متوسط ۱۰ برگ) نسبت به لاین وحشی (به‌طور متوسط ۸ برگ) بودند که نشان می‌دهد گیاهان جهش‌یافته با تأخیر وارد فاز زایشی شدند (شکل F-٤). همچنین ارتفاع گلاذین در مرحله ٦/۰۰ در دو لاین جهش‌یافته حدود ۳۰ درصد کمتر از لاین وحشی بود، ولی ارتفاع گیاه کامل در پایان رشد زایشی بین سه لاین تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل G-٤). تعداد انشعاب جانبی تشکیل‌شده بر روی گلاذین (Lateral Branches on Main Flower Bolt, MB) در هر لاین جهش‌یافته کمتر از تعداد آنها در گیاه وحشی بود. از طرف دیگر تعداد انشعابات جانبی کنار گلاذین (Lateral flowering Bolt, LB) در گیاه جهش‌یافته بیشتر از گیاه وحشی بود (شکل H-٤).

زمان گلدهی یک سوئیچ اولیه از مرحله رویشی به مرحله زایشی است که گیاه را قادر می‌سازد تا قبل از شروع شرایط سخت تکثیر شود (Schmalenbach *et al.*, 2014). این پدیده به برنامه‌ریزی مجدد ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی و تخصیص مجدد منابع متابولیکی و بیوشیمیایی در سراسر گیاه نیاز دارد (Kazan, 2015). Cookson و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که تأخیر گلدهی منجر به کاهش نهایی سطح برگ و سرعت گسترش برگی می‌شود، اما دوره گسترش برگی در آن افزایش می‌یابد. جالب اینکه بیش‌بیانی ژن‌های *DREB1* و همچنین بیش‌بیانی در ژن *DREB2A* (35S:*DREB2A*)، رشد و گلدهی را به تأخیر انداخته و از طرفی سطح برگ را نیز کاهش داده‌اند (Gilmour *et al.*, 2004; Sakuma *et al.*, 2006a; Park *et al.*, 2015). برگشت این فنوتیپ با به‌کاربردن GA3 در لاین بیش‌بیان *DREB1* پیشنهاد می‌کند که مهار بیوسنتز GA می‌تواند یک عملکرد عمومی این ژن‌ها باشد (Magome *et al.*, 2004). نتایج نشان می‌دهد که سطح بیان دقیق ژن *DREB1A* و *DREB2A* در فرآیندهای تنظیمی هورمون‌هایی از قبیل GA حائز اهمیت است و کاهش و افزایش این هورمون منجر به این پدیده می‌شود. در مجموع به‌نظر می‌رسد که تأخیر در ورود به مرحله زایشی در لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی می‌تواند به برهم‌کنش فاکتور DREB1A و یا DREB2A با GA مربوط باشد. اندازه‌گیری میزان جیبرلین در دو لاین جهش‌یافته می‌تواند صحت این فرضیه را آزمون کند.

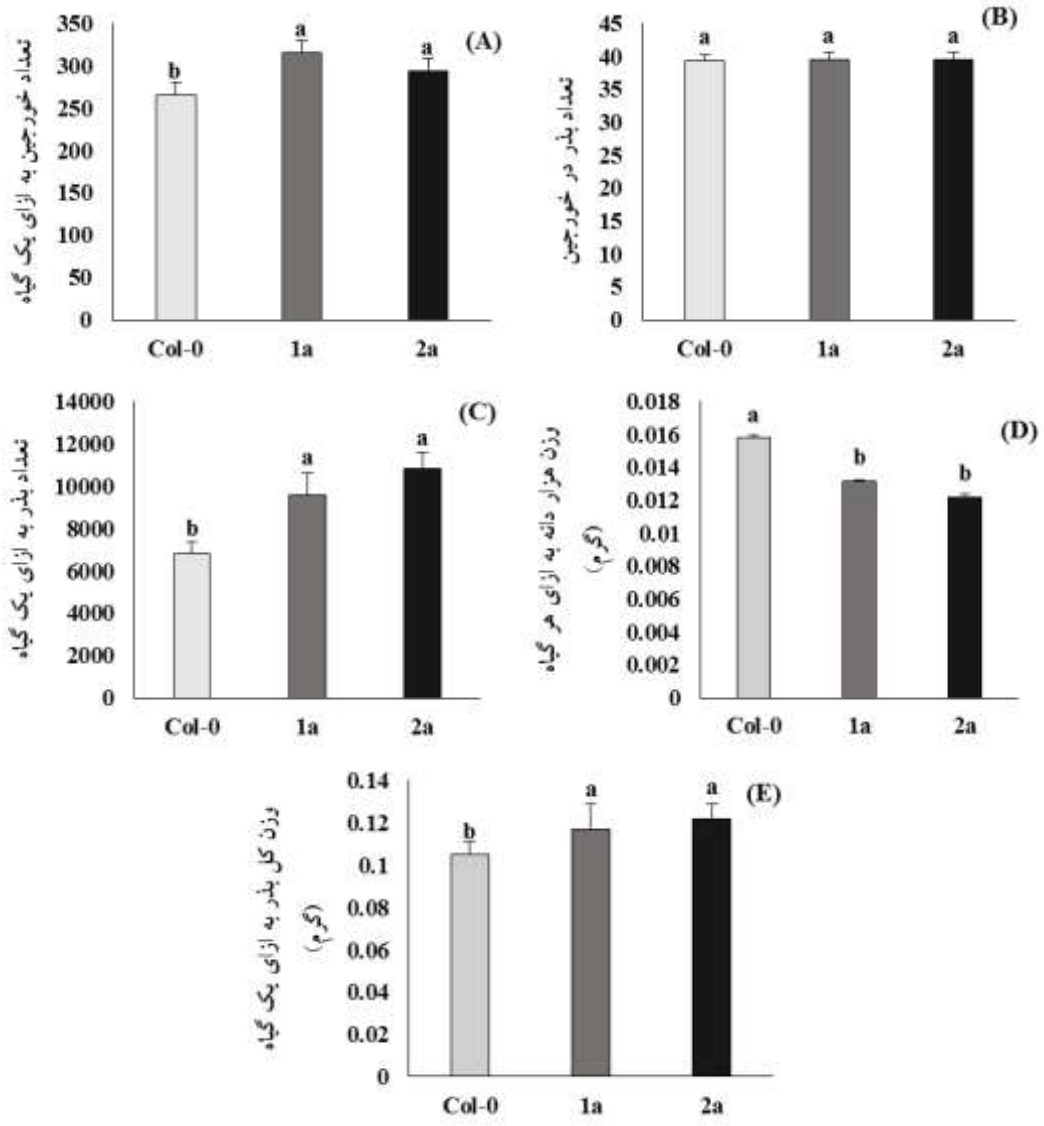
تأثیر نقصان ژن *DREB 1A* و *DREB2A* ویژگی‌های مورفولوژیک و محتوای پروتئین محلول بذر: به‌منظور شناسایی اثر بالقوه جهش در ژن *DREB1A* و *DREB2A* بر تولید محصول در آرابیدوپسیس، وزن کل، وزن هزار دانه و تعداد بذر به ازای هر گیاه بررسی شد. نتایج نشان داد که هر چند در تعداد بذرها در هر خورجین بین سه لاین تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، تعداد خورجین (متوسط ۱۰ درصد)، تعداد بذر در هر گیاه (متوسط ٤۰ درصد)، و وزن کل بذر (متوسط ۱۳ درصد) در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۵ A الی E).

یکی از فاکتورهایی که می‌تواند میزان محصول بذری در گیاه را تحت تأثیر قرار دهد تعداد شاخه‌های جانبی است. نتایج ما حاکی از این است که جهش در ژن *DREB1A* و *DREB2A* توانست تعداد شاخه‌های جانبی محور اصلی (MB) را کاهش داده و در عوض تعداد شاخه‌های جانبی محور فرعی (LB) را افزایش دهد. با توجه به اینکه شاخه‌زایی به تعادل در سطح اکسین، سیتوکینین و تولید و انتقال استریگولاکتون‌ها از ریشه به ساقه وابسته است (Hayward *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2011). داده‌های ما پیشنهاد می‌کند که ژن‌های خانواده *DREB* احتمالاً به نوعی در برقراری تعادل هورمونی بین اکسین و سیتوکینین و یا در فرایند تولید و انتقال استریگولاکتون‌ها موثرند. همچنین تأخیر در گلدهی، مدت زمان لازم برای آسیمیلاسیون کربن طی نمو رویشی را طولانی کرده و بنابراین منجر به افزایش نهایی محصول می‌شود (Cookson *et al.*, 2007). این گفته شاید بتواند نتایج مشاهده شده مربوط به افزایش تعداد خورجین و تعداد بذر در دو لاین جهش‌یافته در مقایسه با گیاه وحشی را توجیح کند.

با توجه به نقش *DREB*ها در پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی از جمله خشکی این فرضیه مطرح شد که ممکن است

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]

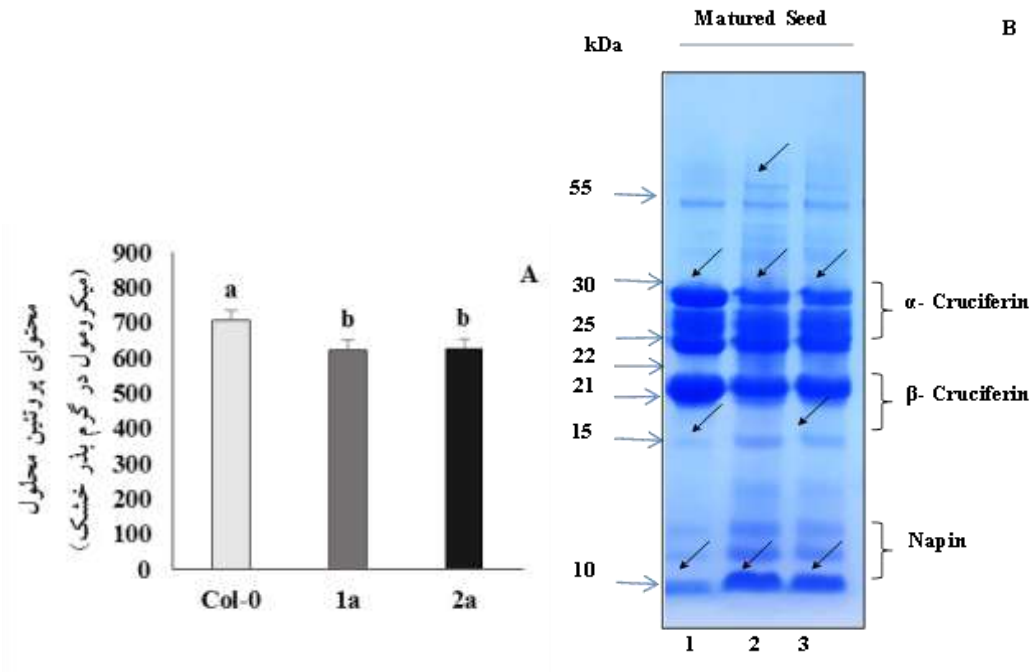
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]



شکل ۵- مقایسه ویژگی‌های بذری بین لاین وحشی و دو لاین جهش‌یافته. A) تعداد خورجین، B) تعداد بذر در خورجین، C) تعداد بذر، D) وزن هزار دانه، E) وزن کل بذر، به‌ازای هر گیاه. (Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به‌ترتیب نمایانگر دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند). میانگین‌های دارای حروف مشابه، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test, $P \leq 0.05$).

پروتئین‌های DREB در مرحله خشکیدگی بذر مؤثر باشند. از طرفی یکی از فاکتورهایی که در مراحل نمو بذر تحت تأثیر قرار می‌گیرد مقدار و نوع پروتئین‌های محلول است درنتیجه مقدار کمی و کیفی پروتئین‌های محلول بذرا بین سه لاین مورد بررسی قرار گرفت. دانه‌های روغنی خانواده شب‌بو حاوی ۲۲- ۲۸ درصد پروتئین هستند که عمدتاً شامل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر هستند (Withana-Gamage *et al.*, 2013). در آرابیدوپسیس، فراوان‌ترین پروتئین ذخیره‌ای، کروسیفرین‌ها بوده که از گروه 12S گلوبولین‌ها هستند و توسط چهار ژن پارالوگ کد می‌شوند. دومین پروتئین فراوان بذر آربیدوپسیس، ناپین‌ها هستند که از گروه 2S آلبومین‌ها هستند وتوسط یک خانواده پنج عضوی کد می‌شوند (Nguyen *et al.*, 2015). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد میزان پروتئین محلول در بذور دو لاین جهش‌یافته به‌طور معنی‌داری (متوسط ۱۳ درصد) کمتر از لاین وحشی بود (شکل A-٦). همچنین از نظر الگوی باندهای پروتئینی جداشده در الکتروفورز نسبت پروتئین‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]



شکل ٦- مقایسه A) محتوای پروتئین محلول و B) الگوی SDS-PAGE پروتئین‌ها در بذر خشک در لاین وحشی و دو لاین جهش‌یافته. در شکل B) شماره ۳-۱ به‌ترتیب نمایانگر پروتئین بذر وحشی، بذر *dreb1a*، بذر *dreb2a* هستند. (Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به‌ترتیب نمایانگر دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند). میانگین‌های دارای حروف مشابه، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test, $P \leq 0.05$).

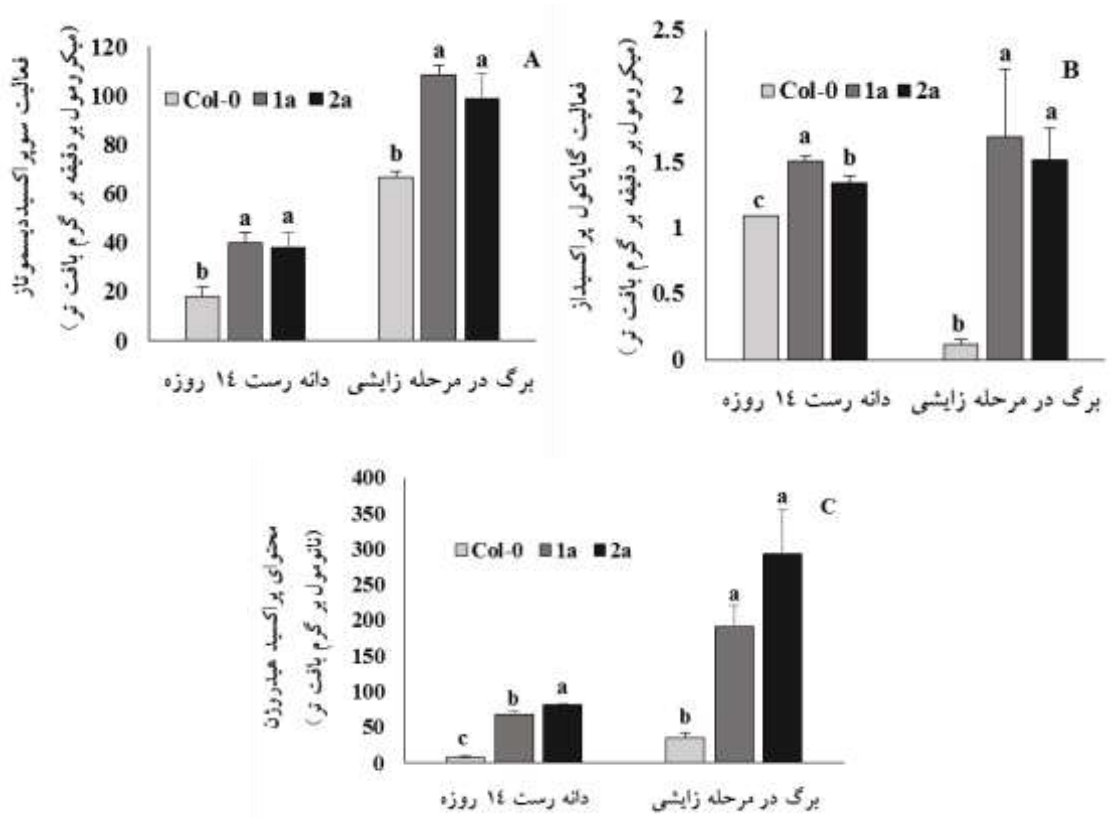
کروسیفرین به پروتئین‌های ناپین، بین دو لاین جهش‌یافته و لاین وحشی تفاوت قابل توجهی وجود داشت، به‌طوریکه این نسبت در لاین‌های جهش‌یافته در مقایسه با وحشی کمتر بود (شکل B-٦). تفاوت مشاهده شده در نتایج می‌تواند حاکی از این باشد که DREB روی تولید این پروتئین‌ها در مرحله نمو دانه مؤثر بوده و شاید بتوان تسریع جوانه‌زنی را به تغییر نسبت این پروتئین‌های ذخیره‌ای ارتباط داد. در مجموع هر چند پیامد اثر جهش در ژن‌های *DREB* بر روی تجمع پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مشهود است، درک مکانیسم این اثر نیازمند انجام آزمایش‌های تکمیلی است، خصوصاً اینکه تا آنجا که نویسندگان مقاله اطلاع دارند تحقیق حاضر اولین گزارش در خصوص پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در لاین‌های جهش‌یافته *DREB* آرابیدوسیس است.

جهش در ژن‌های *DREB* وضعیت آنتی‌اکسیدانی گیاه را در شرایط رشد طبیعی تحت تأثیر قرار می‌دهد.

در ادامه بررسی‌های فنوتیپی اثر جهش در ژن‌های *DREB1A* و *DREB2A* روی برخی فاکتورهای بیوشیمیایی بررسی شد. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز محلول در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی در دانهال ١٤ روزه (متوسط ۳۰ درصد) و همچنین در برگ گیاهان کشت‌شده در خاک در مرحله زایشی (متوسط ۵۰ درصد) بیشتر بود (شکل A, B-٧). همچنین محتوای هیدروژن پراکسید در دانهال ١٤ روزه و بافت برگی در مرحله زایشی بین دو لاین جهش‌یافته و لاین وحشی در شرایط طبیعی بررسی شد (شکل C-٧). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد میزان هیدروژن پراکسید در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی به‌طور متوسط ۷۰ درصد بیشتر بود.

گونه‌های کنشگر اکسیژن از قبیل رادیکال‌های سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، هیدروژن پراکسید و رادیکال هیدروکسیل (OH-) و اکسیژن یکتا ($^1O_2$) طی متابولیسم طبیعی گیاه تولید می‌شوند (Gupta *et al.*, 2014). گیاهان برای غلبه بر تنش اکسیداتیو ناشی از ROS، از مکانیسم‌های پالایش آنزیمی (سوپراکسید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]



شکل ۷- مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان A) سوپراکسید دیسموتاز، B) پراکسیداز محلول، C) محتوای هیدروژن پراکسید در گیاهان کشت‌شده در محیط MS و گیاهان کشت‌شده در خاک بین لاین وحشی و دو لاین جهش‌یافته. (Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به‌ترتیب نمایانگر دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند). میانگین‌های دارای حروف مشابه، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test, $P \leq 0.05$).

دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و غیره) و غیرآنزیمی (کاروتنوئیدها، گزانتوفیل‌ها، گلوتاتیون، توکوفرول، آسکوربات و غیره) کمک می‌گیرند. سامانه آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز، رادیکال‌های آزاد را به هیدروژن پراکسید و آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز، هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کنند (Jagadeeswaran *et al.*, 2009). نتایج ما حاکی از این است که در شرایط کنترل (کشت در محیط MS و یا گلدان جی‌فی) میزان هیدروژن پراکسید و همچنین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز محلول در دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* در مقایسه با لاین وحشی بالاتر بود. روند مشابهی در مطالعات Kohan-Baghkheirati و همکاران (۲۰۱۸) در رابطه با لاین جهش‌یافته *dreb1a* مشاهده شد. هر چند نتایج گزارش شده در مورد لاین جهش‌یافته *dreb2a* اولین بار می‌باشد و تاکنون گزارشی در این زمینه ارائه نشده است. از طرفی مطالعاتی که توسط Li و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پروکسیداز در لاین بیش‌بیان *DREB1A* است. در کل نتایج نشان می‌دهد که افزایش یا کاهش بیان ژن‌های *DREB* می‌تواند باعث افزایش فعایت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شود و مطالعات انجام‌شده روی آرابیدوپسیس پیشنهاد می‌کند که همکاری اجزا مختلف شبکه پالایش ROS در گیاهان بسیار پیچیده است و تنظیم آن به چندین فاکتور مختلف وابسته است (Rizhsky *et al.*, 2003).

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات مهم تنش‌های محیطی بر تولیدات گیاهان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

زراعی در جهان و ایران و نقش حیاتی فاکتورهای رونویسی خانواده DREB در تنظیم پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی و به‌منظور تفسیر نتایج در شرایط تنش، نیاز به داشتن اطلاعات پایه‌ای از تغییر بیان ژن‌های خانواده *DREB* در شرایط طبیعی وجود دارد. لذا در این تحقیق خصوصیات دقیق فنوتیپی و بیوشیمیایی گیاهان جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* مورد آنالیز قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی دارای تسریع در ظهور ریشه‌چه و ظهور لپه بوده، لیکن در مرحله ورود به فاز زایشی از لحاظ زمانی تأخیر داشته و دارای تعداد برگ بیشتری بودند. همچنین ارتفاع گلاذین در مرحله ٦/٠٠ در دو لاین جهش‌یافته کمتر از لاین وحشی بود، ولی ارتفاع گیاه کامل در پایان رشد زایشی بین سه لاین تفاوت معنی‌داری نداشت. تعداد شاخه‌های جانبی تشکیل شده بر روی گلاذین در لاین‌های جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی کمتر، ولی تعداد محورهای گلزا بیشتر بود. نتایج آزمایش همچنین نشان داد از لحاظ تعداد بذر موجود در هر خورجین تفاوت معنی‌داری بین سه لاین مشاهده نشد، ولی تعداد خورجین، تعداد بذر در هر گیاه و وزن کل بذر در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی افزایش معنی‌داری نشان داد. همچنین بررسی محتوای پروتئین محلول بذر نشان داد پروتئین محلول بذر در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی کاهش داشته و نسبت کروسیفرین/ ناپین در الگوی SDS-PAGE پروتئین محلول بذرهای گیاهان جهش‌یافته در مقایسه با لاین وحشی کمتر بود. بررسی وضعیت آنتی‌اکسیدانی در دانهال ١٤ روزه و برگ در مرحله زایشی حاکی از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز و افزایش محتوای هیدروژن پراکسید در دو لاین جهش‌یافته در مقایسه با لاین وحشی بود. با تکیه بر این نتایج به‌نظر می‌رسد تغییر بیان ژن‌های *DREB* روی سرعت جوانه‌زنی، فاکتورهای فنوتیپی بذر از قبیل تعداد بذر و فاکتورهای بیوشیمیایی بذر از قبیل نسبت پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و همچنین وضعیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مؤثر باشد. در مجموع به‌نظر می‌رسد برهمکنش بین فاکتور رونویسی DREB1A و DREB2A با مسیرهای سیگنالی هورمون‌های گیاهی نظیر آبسیزیک اسید، اکسین، سیتوکینین و به‌ویژه جیبرلین می‌تواند اغلب فنوتیپ‌های مشاهده شده در این دو لاین جهش‌یافته را توضیح دهد. این تحقیق اولین گزارش در زمینه خصوصیات دقیق فنوتیپی و بیوشیمیایی گیاهان جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* است. با این‌حال جهت درک بهتر و کامل‌تر نقش ژن‌های *DREB* روی فاکتورهای مطالعه‌شده، اندازه‌گیری هورمون‌های گیاهی از جمله ABA وGA و همچنین استفاده از لاین‌های جهش‌یافته نسبت به همه همولوگ‌های مربوط به هر گروه ژنی جهش‌یافته و بررسی پاسخ این جهش‌یافته‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی می‌تواند این مطالعه را کامل‌تر کند.

منابع

Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K. and Sopory, S. K. (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell Reports 25: 1263-1274.

Beauchamp, C and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-87.

Bouaziz, D., Charfeddine, M., Jbir, R., Saidi, M. N., Pirrello. J., Bouzayen, M., Charfeddine, S. and Gargouri-Bouzid, R. (2015) Identification and functional characterization of ten AP2/ERF genes in potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 123: 155-72.

Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R and Gorlach, J. (2001) Growth stage–based phenotypic analysis of Arabidopsis a model for high throughput functional genomics in plants. The Plant Cell Online 13: 1499-1510.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-252.

Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology 2: 764-775.

Choi, D.W., Rodriguez, E. M. and Close, T. J. (2002) Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location. Plant Physiology 129: 1781-1787.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

Cookson, S. J., Chenu, K. and Granier, C. (2007) Day length affects the dynamics of leaf expansion and cellular development in *Arabidopsis thaliana* partially through floral transition timing. Annals of Botany 99: 703-713.

Cushman, J. C and Bohnert, H. J. (2000) Genome approaches to plant stress tolerance. Current Opinion in Plant Biology 3: 117-124.

Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant Journal 33: 751-763.

Fling, S. P and Gregerson, D. S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. Analytical Biochemistry 155: 83-8.

Fowler, S. and Thomashow, M. F. (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. The Plant Cell 14: 1675-1690.

Gilmour, S. J., Fowler, S. G. and Thomashow, M. F. (2004) Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. Plant Molecular Biology 54: 767-781.

Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C. and Leyser, O. (2009) Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. Plant Physiology 151: 400-412.

Jaglo, K. R., Kleff, S., Amundsen, K. L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J. Z and Thomashow, M. F. (2001) Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved inbrassica napus and other plant species. Plant Physiology 127: 910-917.

Je, J., Chen, H., Song, C. and Lim, C. (2014) Arabidopsis DREB2C modulates ABA biosynthesis during germination. Biochemical and Biophysical Research Communications 452: 91-8.

Gupta, K., Jha, B. and Agarwal, P. K. (2014) A dehydration-responsive element binding (DREB) transcription factor from the succulent halophyte Salicornia brachiata enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. Marine Biotechnology 16: 657-673.

Kar, M. and Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 57: 315-319.

Kasajima, I., Ide,Y., Ohkama-Ohtsu, N., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T. (2004) A protocol for rapid DNA extraction from Arabidopsis thaliana for PCR analysis. Plant Molecular Biology Reporter 22: 49-52.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotechnology 17: 287-291.

Kazan, K. (2015) Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. Trends in Plant Science 20: 219-229.

Kohan-Baghkheirati, E., Bagherieh-Najjar, M. B., Abdolzadeh, A. and Geisler-Lee, J. (2018) Altered *DREB1A* gene expression in arabidopsis thaliana affects root growth, antioxidant enzymes activity, and response to salinity but not to cold. Journal of Genetic Resources 4: 90-104.

Lata, C. and Prasad, M. (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. Journal of Experimental Botany 62: 4731-4748.

Li, X., Cheng, X., Liu, J., Zeng, H., Han, L. and Tang, W. (2011) Heterologous expression of the Arabidopsis *DREB1A*/CBF3 gene enhances drought and freezing tolerance in transgenic *Lolium perenne* plants. Plant Biotechnology Reports 5: 61-69.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. Plant Cell 10: 1391-1406.

Jagadeeswaran, G., Saini, A. and Sunkar, R (2009) Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis. Planta 229: 1009-1014.

Je, J., Chen, H., Song, C. and Li, C. O. (2014) Arabidopsis DREB2C Modulates ABA Biosynthesis during germination. Biochemical and Biophysical Research Communications 452: 91-98.

Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A. (2016) Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. Frontiers in Plant Science 7: 1029.

Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya,Y. and Oda, K. (2004) dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. Plant Journal 37: 720-9.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. and Shinshi, H. (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. Plant Physiology 140: 411-432.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

Nguyen, T. P., Cueff, G., Hegedus, D., Rajjou, L. and Bentsink, L. (2015) A role for seed storage proteins in Arabidopsis seed longevity. Journal of Experimental Botany 66: 6399-413.

Park, S., Lee, C. M., Doherty, C. J., Gilmour, S. J., Kim, Y. and Thomashow, M. F. (2015) Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. Plant Journal 82: 193-207.

Riechmann, J. L., Heard, J. and Martin, G. (2000) Arabidopsis transcription factor: genome wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290: 2105-2110.

Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. (2003) The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. Journal of Biological Chemistry 278: 38921-5.

Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 290: 998-1009.

Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006a) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. The Plant Cell 18: 1292-1309.

Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006b) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. PNAS 103: 18822-18827.

Schmalenbach, I., Zhang, L., Reymond, M. and Jimenez-Gomez, J. (2014) The relationship between flowering time and growth responses to drought in the Arabidopsis landsberg erecta x antwerp-1 population. Frontiers in Plant Science 5: 609.

Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajim, A. M., Enju, A. and Sakurai, T. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. The Plant Journal 31: 279-292.

Sergiev, I., Alexieva, V. and Karanov, E. (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Comptes Rendus de l 'Academie Bulgare des Sciences 51: 121-124.

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Gene networks involved in drought stress tolerance and response. Journal of Experimental Botany 58: 221-227.

Su, Y. H., Liu, Y. B. and Zhang, X. S. (2011) Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. Molecular Plant 4: 616-625.

Withana-Gamage, T. S., Hegedus, D. D., Qiu, X., Yu, P., May, T., Lydiate, D. J., and Wanasundara, P. K. J. P. D. (2013) Characterization of *Arabidopsis thaliana* lines with altered seed storage protein profiles using synchrotron-powered FT-IR spectromicroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 901-912.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. The Plant Cell Online 6: 251-264.

Zhao, L., Hu, Y., Chong, K. and Wang. T. (2010) ARAG1, an ABA-responsive *DREB* gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice. Annals of Botany 105: 401-409.

Zhau, C., Zhang, Z., Xie, S., Si, T., Li, Y. and Zhu, J. K. (2015) Mutational evidence for the critical role of CBF genes in cold acclimation in Arabidopsis. Plant Physiology 171: 2744-59.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]

Morphological and biochemical characteristics of *dreb2a* mutant plant grown under normal conditions

Somayeh Kohsari [1], Mohammad Bagher Bagherieh Najjar [1*], Hamid Reza Sadeghipour [1] and Eisa Kohan baghkheirati [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Hakim Sabzevari, Sabzevar, Iran
(Received: 15/01/2019, Accepted: 18/05/2019)

Abstract

DREB transcription factors are one of the largest families of transcription factors in plants that are believed to play important regulatory functions in tolerance to environmental stress, but there is no complete information on their role in controlling the morphological and antioxidant properties of grown plants under normal conditions. In this study, some phenotypic characteristics of the dreb2a and dreb1a mutant arabidopsis were compared to the wild plant under normal growth conditions**.** Most properties of *dreb2a* were similiar to those of *dreb1a* mutant, but significantly different from the wild type. Both mutant lines showed accelerated emergence of radicle and cotyledons, but delayed appearance of bolting. Lateral branches formed on the flowering bolt in the mutant lines were 25% less, while the flowering axes were 20% more than that in the wild type plants. Both mutant lines displayed higher total number of siliques per plant (about 10%), total number of seeds per plant (about 40%) and total seed weight per plant (about 13%), while, they had lower seed soluble protein content and the cruciferin/napin ratio, as compared to the wild type. It is noteworthy that in 14-day seedlings and leaves of the plant at the stage of reproduction in two mutant lines compared to the wild line, the activity of antioxidant superoxide dismutase and peroxidase activity was on average 35% and hydrogen peroxide was on average 70% higher. These data indicated that the change in the expression of the studied genes played a key role in controlling the morphological and antioxidant status of the plants grown under normal conditions, and studying the cascade stages of the signal transduction managed by DREB family transcription factors can lead to a deeper understanding of the response mechanism of these plants to various environmental stresses.
Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Environment stresses، Antioxidant enzymes, Transcription Factors، *dreb* mutants.

Corresponding author, Email: m.b.bagherieh@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.20.1]