بررسی نقش کارکردی ژن شبه استریکتوسیدین سینتاز- ٦ در گیاه *Arabidopsis thaliana* در شرایط تنش شوری

امین عابدی، رضا شیرزادیان خرم آباد* و محمد مهدی سوهانی

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

(تاریخ دریافت: ١٣٩٥/٠١/٠٩، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٥/٠٥/٠٢)

چکیده:

در آرابیدوپسیس ژن‌هایی شناسایی شده که دارای همولوژی بالایی با ژن استریکتوسیدین‌سینتاز گیاه پریوش (*Catharanthus roseus*) می-باشند. آنزیم استریکتوسیدین سینتاز در بیوسنتز مونوایندول الکالوئیدها نقش دارد. یکی از ژن‌هایی که بیان آن تغییرمعنی‌داری را در پاسخ به تنش‌های محیطی داشته ژن شبه استریکتوسیدین سینتاز شماره ٦ (*SSL6*) می‌باشد. به منظور بررسی نقش ژن *SSL6* در واکنش به تنش شوری، از لاین موتانت حاصل از درج T-DNA در ژن *SSL6* (*ssl6*) در آرابیدپسیس استفاده شد. برخی ویژگیهای مرفولوژی، فیزیولوژیکی و ملکولی شامل درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و بیان نسبی ژن‌های واکنش‌گر به تنش شامل *AAO3*، *RD29A*، *NCED3* و *P5CS1* در واکنش به شوری در لاین های جهش یافته اندازه گیری و با گیاهان شاهد مقایسه شد. داده‌های آزمایشی بر مبنای آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی آنالیز شدند. فاکتورها شامل ژنوتیپ تیپ وحشی (Col-0) و جهش یافته (*ssl6*) و سطوح مختلف شوری شامل صفر، ١٠٠ و ٢٠٠ میلی‌مولار بود. نتایج آزمایش نشان داد که درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و فعالیت آنزیم‌های SOD و POD در سطح یک درصد و آنزیم CAT در سطح پنج درصد در گیاه جهش یافته نسبت به گیاه تیپ وحشی دارای تفاوت معنی‌دار است. ژن‌های مورد بررسی در گیاه جهش یافته در زمان‌های ٣ و ٦ ساعت پس از تیمار شوری بیان بالاتری نسبت به گیاه تیپ وحشی نشان دادند. نتایج این تحقیق برای اولین بار نقش خاموشی ژن *SSL6* بر بر افزایش تحمل آرابیدوپسیس به تنش شوری را گزارش می‌کند. در واقع نقش کارکردی این ژن بر تنش شوری در آرابیدپسیس احتمالاً منفی است.

واژگان کلیدی: آرابیدپسیس، تنش شوری، *SSL6*، T-DNA

مقدمه:

گیاهان موجودات ثابت و بی‌حرکتی هستند که با بسیاری از تنش‌های محیطی مواجه شده، اما توانایی فرار ندارند. لذا تنش‌هایی نظیر خشکی و سرما میزان رشد و تولید گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Msanne *et al.*, 2011). تنش شوری از جمله تنش‌های محیطی است که حداقل ٢٠ درصد زمین‌های زراعی تحت آبیاری جهان را تحت تأثیر قرار می دهد (Qadir *et al.*, 2008). پیشرفت تنش شوری عمدتاً طی فرآیند سه مرحله‌ای انجام می‌شود. ابتدا غلظت شوری بالا پتانسیل اسمزی خاک را کاهش داده و موجب تنش آبی در گیاه می‌شود. در مرحله دوم، موجب سمیت یونی می‌شود که علت آن عدم تجمع سدیم در واکوئل نظیر هالوفیت‌ها می

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: r.shirzadian@guilan.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]

باشد. در مرحله سوم، تبادل نمک با مواد غذایی موجب کمبود و عدم تعادل در عناصر غذایی میکرو و ماکرو می‌شود. نتیجه این فرآیند سه مرحله‌ای مرگ گیاه می‌شود. (Munns, 2002). از مهمترین اثرات تنش شوری تولید بیش‌از حد گونه های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان می‌باشد که فعالیت زیاد و سمی آن منجر به تخریب پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود که نتیجه آن تنش اکسیداتیو است (Gill and Tuteja, 2010). مکانیسم‌های مولکولی مقاومت و تحمل به شوری نظیر فعالیت اسمولیت ها، اسموپراکتانت‌ها، آنزیم‌ها و ترکیبات ضد اکسیدانتی، پروتئین‌های مسیر پیام رسانی نظیر کینازها و نیز مسیر SOS در سال‌های اخیر شناسایی شده‌اند (Park *et al*., 2016). از اسمولیت‌های مهم می‌توان به سوربیتول، مانیتول، فروکتان، بتائین، پرولین و گلایسین بتائین اشاره کرد (Cheong and Yun, 2007). ترکیبات ضد اکسیدانتی آنزیمی نظیر کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و غیر آنزیمی توکوفرول، اسکوربیک اسید و گلوتاتیون را نام برد (Gill and Tuteja, 2010). مسیر SOS مهم‌ترین مسیر شناخته شده در پاسخ به تنش شوری و حفظ هموستازی داخل سلول می‌باشد. این مسر شامل پروتئین SOS_1 بعنوان آنتی‌پورتر انتقال دهنده Na^+، SOS_2 پروتئین کیناز سرین/ترئونین و پروتئین متصل شونده به کلسیم SOS3 می‌باشد. همکاری پروتئین‌های SOS2 و SOS3 در نهایت موجب فعال شدن SOS1 در شرایط تنش می‌گردد (Ji *et al*., 2013).

با وجود شناسایی بسیاری از ژن‌های درگیر در پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، یکی از موضوعات مهم در تحقیقات بیولوژی مولکولی بررسی و شناسایی نقش دقیق سایر ژن‌ها می‌باشد. کامل شدن و در دسترس قرا گرفتن اطلاعات ژنومی گیاهان، تمرکز از ژنومیکس ساختاری را به سمت ژنومیکس کارکردی تغییر داد (Radhamony *et al*., 2005). گیاه آرابیدوپسیس به دلیل ویژگی‌های بیولوژیکی خاص نظیر طول دوره کوتاه زندگی، تولید بذر فراوان و راحتی ترانسفورماسیون در شناسایی عملکرد ژن‌ها نقش اساسی ایفا می‌کند (Koornneef and Meinke 2010). ژنتیک پیش‌رو (Forward genetics) روش شناسایی نقش ژن بر مبنای فنوتیپ ایجاد شده است. ژنتیک معکوس (Reverse genetics) با تولید ژن جهش یافته و به دنبال آن بررسی تأثیر جهش بر فنوتیپ گیاه انجام می‌گیرد. از جمله روش‌های ژنتیک معکوس برچسب زنی ژن (Gene tagging) می‌باشد. این روش شامل درج تصادفی DNA با توالی شناخته شده نظیر T-DNA در ژنوم می‌باشد. اگر این درج همراه با تغییر فنوتیپ گیاه باشد قطعاً رابطه‌ی معینی بین فعالیت ژن مسئول فنوتیپ وجود دارد (Walden, 2002). درج T-DNA اغلب موجب خاموشی بیان ژن و ایجاد یک آلل صفت مغلوب می‌شود.

آنزیم استریکتوسیدین سینتاز (EC 4.3.3.2) (Str) اولین بار از گیاه پریوش (*Catharanthus roseus*) جداسازی و مطالعات بعدی نشان داده که بیان این آنزیم توسط بسیاری از محرک‌های زیستی و غیر زیستی و نیز تنظیم کننده‌های رشد القاء و در نتیجه مقدار متابولیت‌های ثانوی افزایش می‌یابد. در مطالعه تأثیر سرما، شوری و نیتریک اکسید بر بیان این آنزیم مشاهده شد که بیان آن بوسیله آبشار کینازی و با میانجیگری کلسیم تنظیم می‌گردد (Dutta *et al*., 2013; Stöckigt *et al*., 2008).

گیاه *Arabidopsis thaliana* علی‌رغم اینکه توانایی تولید ترکیبات پیچیده الکالوئیدی را ندارد، اما حاوی ژن‌هایی است که همولوژی بالایی با ژن STR پریوش داشته و لذا همولوگ ژن‌های فوق در آرابیدوپسیس شبه استرکتوسیدین سینتاز (Strictosidine Synthase Like, *SSL*) نامیده شدند (Fabbri *et al*., 2000). تاکنون بر اساس مطالعات انجام گرفته ۱۵ ژن دارای دومین استریکتوسیدین سینتاز در آرابیدوپسیس شناسایی شده است که نقش و نوع فعالیت بسیاری از آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها و نیز در مراحل نموی مشخص نشده است (Fabbri *et al*., 2000). در آزمایشی که برای شناسایی ژن‌های مارکر در پیری آرابیدوپسیس با استفاده از لکه گذاری RNA انجام گرفت، پروتئینی به نام YLS2 (Yellow-Leaf-Specific Gene 2) از خانواده ژنی *SSL* شناسایی شد که که بوسیله اتیلن و ABA القا شده و دارای بیان اختصاصی در مراحل پیری گیاه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]

در گل بوده و در ریشه و ساقه قابل شناسایی نیست (Yoshida *et al*., 2001). همچنین ژن LAP3 (Less Adherent Pollen 3) که از همین خانواده می‌باشد نقش مهمی در نمو دانه گرده داشته و خاموشی این ژن باعث نر عقیمی می‌گردد، زیرا دانه گرده تولید شده فاقد اگزین می‌باشد (Dobritsa *et al*., 2009).

مطالعاتی که بر روی القاء بیان ژن‌های *AtSSL4-AtSSL7* آرابیدوپسیس انجام گرفت، مشخص شد که ژن‌های شبه هومومیوسین در اثر زخم، تیمار با ویروس CMV و قارچ *Alternaria brassicicola* و نیز تیمار با ترکیبات فعال کننده پیام دفاعی نظیر سالسیلیک اسید، جاسمونات و اتیلن به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد که نشان دهنده نقش احتمالی این ژن‌ها در مکانیسم دفاعی القائی در گیاه می‌باشد (Sohani *et al*., 2008). همچنین میزان بیان این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های شوری، نور ماوراء بنفش و سالسیلیک اسید چند برابر شرایط شاهد می‌باشد. این افزایش بیان ژن *SSL6* در پاسخ به محرک‌های زیستی و غیر زیستی، احتمال ایفاء نقش این ژن در شرایط تنش را افزایش می‌دهد (Kibble *et al*., 2009).

در این تحقیق، به منظور بررسی نقش ژن *SSL6* در پاسخ گیاه آرابیدوپسیس به تنش شوری از لاین جهش یافته T-DNA که در آن ژن *SSL6* سرکوب شده است استفاده شد. درصد جوانه زنی، رشد ریشه و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی بر اثر این جهش در گیاه موتانت افزایش یافته و ژن‌های پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در گیاه موتانت نسبت به گیاه تیپ وحشی بیان بیشتری را نشان می‌دهند. تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی ارتباط ژن *SSL6* و تنش شوری گزارش نشده است، لذا برای اولین بار نقش خاموشی ژن *SSL6* بر بر افزایش تحمل آرابیدوپسیس به تنش شوری را گزارش می‌کند. در واقع نقش کارکردی این ژن بر تنش شوری در آرابیدپسیس احتمالاً منفی است.

مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی و شرایط رشد: در این تحقیق از ژنوتیپ‌های تیپ وحشی آرابیدوپسیس (Col-0) و لاین جهش یافته حاوی T-DNA در ژن *SSL6* (*ssl6*) به شماره دسترسی (SALK_046142) استفاده شد که از مرکز منابع زیستی آرابیدوپسیس (Arabidopsis Biological Resource Center) تهیه گردیده بود. در لاین جهش یافته، T-DNA در ناحیه پروموتری و در نزدیک 5′UTR در ژن *SSL6* درج شده است. داده‌های مربوط به ساختار ژن شامل اندازه UTR، اگزون و انترون و تعداد آن‌ها و نیز محل درج T-DNA از طریق سایت اختصاصی ژنوم آرابیدوپسیس ((TAIR (Arabidopsos.org بدست آمد (شکل ١).

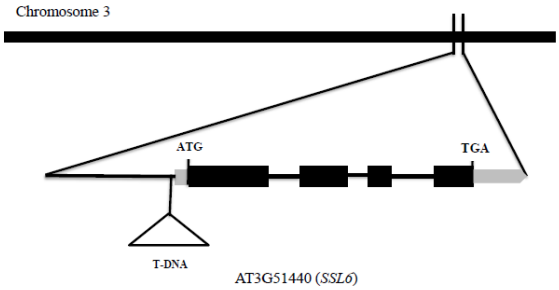
برای کشت گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای (*In vitro*) از محیط کشت MS ½ حاوی ١٪ ساکارز استفاده گردید. ضد عفونی بذرها بوسیله هیپوکلرید سدیم ١٪ به مدت ١٠ دقیقه و ٣ بار آبکشی با آب دو بار استریل شده انجام گرفت. برای ورنالیزاسیون، بذرها به مدت ٣ روز در تاریکی و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای کشت گیاهان در گلدان از نسبت مساوی ترکیب پرلیت، پیت‌ماس، ورمی‌کولیت و ورمی کمپوست استفاده شد. آبیاری گیاهان هر ٤ روز یکبار و از کف گلدان‌ها انجام گرفت. شرایط محیطی رشد گیاهان در کشت درون شیشه و گلدان شامل دمای ٢٢ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی/تاریکی ٨/١٦ با شدت نوری ١٢٠ mol/m^2sec بود.

بررسی تأثیر تنش شوری بر درصد جوانه زنی و طول ریشه: برای ارزیابی درصد جوانه زنی، بذرهای ژنوتیپ تیپ وحشی و ژنوتیپ *ssl6* در شرایط درون شیشه که محیط حاوی غلظت‌های صفر، ١٠٠ و ٢٠٠ میلی‌مولار NaCl کشت و بعد از ورنالیزاسیون به اتاقک رشد انتقال یافت. برآورد درصد جوانه زنی ٢٤ ساعت بعد از انتقال بذرها به اتاقک رشد شروع و به مدت ٧ روز ادامه داشت. بذوری جوانه زده درنظر گرفته شدند که ریشه-چه پوسته بذر را شکافته و بیرون آمده باشد (Yan *et al*., 2014).

در آزمون بررسی طول ریشه بذرهای گیاه تیپ وحشی و موتانت در شرایط درون شیشه کشت شده و پس از شکسته شدن خواب بذرها، به اتاقک رشد انتقال داده شدند. ٤ روزبعد از جوانه زنی، گیاهچه‌ها به محیط MS ½ حاوی ١٪ ساکارز داری غلظت‌های صفر، ١٠٠ و ٢٠٠ میلی‌مولار NaCl انتقال

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]



شکل ١- نمایی شماتیک از محل درج T-DNA در ژن *SSL6* بر اساس داده‌های دریافتی ازپایگاه داده TAIR. **T-DNA در بالا دست 5´ UTR درج شده است. بخش‌های سیاه رنگ مربوط به نواحی اگزون و خطوط مربوط به انترون و بخش‌های خاکستری مربوط به نواحی UTR می‌باشد.**

یافته و طول ریشه‌ها ٥ روز پس از تیمار اندازه‌گیری شد (Li *et al.*, 2010). برای اندازه‌گیری طول ریشه‌ها از نرم افزار ImageJ استفاده شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD, Peroxidase)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD, Superoxide dismutase) و کاتالاز (CAT, Catalase) در پاسخ به تنش شوری، بذرهای ورنالیزه شده دو ژنوتیپ Col-0 و *ssl6* در گلدان کشت شدند. بعد از چهار هفته غلظت‌های صفر، ١٠٠ و ٢٠٠ میلی مولار جهت اعمال تنش شوری همراه آب آبیاری به گیاهان داده شد. نمونه‌گیری از برگ‌ها ٤ روز بعد از اعمال تیمار انجام و نمونه‌ها پس از انجماد در ازت مایع به فریز ٧٠- انتقال یافتند. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و استخراج عصاره آنزیمی برگ گیاهان در ازت مایع خرد شده و سپس به هر نمونه ١ میلی لیتر بافر فسفات ٥٠ میلی‌مولار اضافه گردید. بافت هموژن شده به مدت ١٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با سرعت g ١٥٠٠٠ سانتریفیوژ شد و محلول رویی برای اندازه گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

فعالیت POD در برگ‌ها بر اساس اکسیداسیون گایاکول در حضور H_2O_2 اندازه‌گیری شد. افزایش جذب در طول موج ٤٧٠ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد (Chance and Maehly, 1955). محلول واکنش شامل ١٠٠ میکرولیتر عصاره استخراج شده، ٥٠٠ میکرولیتر از H_2O_2 ٥ میلی‌مولار، ٥٠٠ میکرولیتر گایاکول ٢٨ میلی‌مولار و ١٩٠٠ میکرولیتر از بافر فسفات پتاسیم ٥٠ میلی‌مولار بود. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز تجزیه H_2O_2 در طول موج ٢٤٠ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد. محلول واکنش شامل ٢/٦ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ٥٠ میلی مولار، ٤٠٠ میکرولیتر از H_2O_2 ١٥ میلی مولار و ٤٠ میکرولیتر هز عصاره آنزیمی بود (Sizer and Beers, 1952). فعالیت آنزیم‌ها به صورت U/gFWmin بیان شد. فعالیت آنزیم SOD با اندازه‌گیری توانایی‌آنزیم در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلو-تترازولیوم (NBT) تعیین شد. در این اندازه گیری بافر شماره یک شامل بافر فسفات ٥٠ میلی‌مولار، حاوی EDTA (١.٥ میلی‌مولار)، متیونین (٢٠٠ میلی‌مولار) و NBT (١/١٢ میکرو مولار) با pH=٧ و بافر دو شامل بافر ریبوفلاوین (٧٥ میلی‌مولار) می‌باشد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، نمونه بلانک به مدت ١٥ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و نمونه‌های کنترل (شاهد) و عصاره آنزیمی، به مدت ١٥ دقیقه، در شیکر با دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد و دارای دو عدد لامپ فلورسنت ٤٠ وات با سرعت ١٠٠ دور در دقیقه قرار گرفتند. سپس میزان جذب در طول موج ٥٦٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. یک واحد SOD به مقدار آنزیمی گفته می‌شود که سبب مهار ٥٠ درصد NBT به فورمازان شود. تفاوت بین جذب هر عصاره در مدت زمان روشنایی ١٥ دقیقه و جذب عصاره آنزیمی در همان مدت زمان روشنایی در واقع نشان دهنده بازداشتن

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]

واکنش خودبخودی و تشکیل فورمازان توسط SOD است. فعالیت آنزیم در نهایت بر حسب µMol/g FW محاسبه شد (Beauchamp and Fridovich, 1971).

طرح آزمایشی و آنالیزهای آماری: آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه گیلان انجام گرفت. فاکتورهای آزمایشی شامل ژنوتیپ تیپ وحشی آرابیدوپسیس (Col-0) و لاین جهش یافته *ssl6* و سطوح تیمار شوری بود. برای اندازه‌گیری درصد جوانه زنی و رشد ریشه، آزمایش در سه سطح تیماری و هرسطح تیمار در سه تکرار در داخل پتری انجام گرفت. برای اندازه گیری درصد جوانه زنی هرتکرار شامل یک پتری دیش بود که در نصف آن ٥٠ عدد بذر Col-0 و در نصف دیگر آن ٥٠ عدد بذر ssl6 کشت شده بود. در مورد صفت طول ریشه نیز هر تکرار شامل یک پتری دیش حاوی ٥ گیاهچه Col-0 و پنج گیاهچه ssl6 بود.

در بخش مربوط به اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، آزمایش در سه سطح تیماری و هرسطح تیمار در سه تکرار و در داخل گلدان انجام گرفت. از هر لاین ٤٠ گلدان (در هر گلدان ٤ عدد بذر) کشت شد. بعد از چهار هفته از میان گیاهانی که از نظر رشد و نمو بهتر انتخاب شدند. برای انجام آزمایش برای هر تکرار از هر لاین ٣ گلدان انتخاب و به ظرف بزرگتر انتقال یافت. در حالت کلی هر سطح تیمار دارای ٣ ظرف بزرگ بعنوان تکرار و در هر تکرار از هر لاین ٣ گلدان وجود داشت. برای اعمال تیمار غلظت-های مختلف NaCl در آب حل شده و به ظروف حاوی گلدان‌ها اضافه شد. پس از چهار روز نمونه برداری انجام گرفت. برای نمونه‌گیری در هر تکرار از هر سه گلدان نمونهبرداری انجام گرفته و نمونه‌ها باهم Pool شدند. آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها به ترتیب با نرم‌افزارهای SAS و Excel و مقایسه میانگین به روش دانکن انجام گرفت.

بررسی الگوی بیان نسبی برخی از ژن‌های پاسخ به تنش شوری: برای بررسی بیان نسبی ژن‌های پاسخ به تنش شوری، بذرهای دو ژنوتیپ Col-0 و *ssl6* در شرایط درون شیشه کشت و به مدت ٢ هفته رشد کردند. به منظور اعمال تیمار، ابتدا کاغذهای واتمن در محیط MS حاوی یک درصد ساکارز و غلظت ١٥٠ میلی‌مولار NaCl خیسانده شده و به پتری منتقل شدند. گیاهچه‌های رشد کرده با احتیاط از محیط کشت جدا شده و به محیط تیمار انتقال یافتند. نمونه برداری در زمان‌های صفر، ٣ و ٦ ساعت بعد از تیمار انجام گرفت. نمونه‌ها برای انجام آنالیزهای بعدی در فریزر ٧٠- قرارگرفتند (Dong and Liu, 2010).

جهت استخراج RNA از کیت RNXPlus شرکت سیناکلون استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده بوسیله الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی گردید. به منظور جلوگیری از تکثیر احتمالی مربوط به DNA ژنومی که در همراه RNA استخراج می‌شود، نمونه‌های استخراج شده با DNaseI (Thermo Fisher) تیمار شدند. ساخت cDNA با استفاده از Oligo dT و کیت سنتز cDNA (Thermo Fisher) انجام گرفت. طراحی پرایمر ژن‌های *ACT-2*، *AAO3*، *RD29A*، *NCED3* و *P5CS1* با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (http://primer3.ut.ee/) انجام شد (جدول ١).

هر واکنش Real Time-PCR شامل ١ میکرولیتر cDNA رقیق شده (نسبت ١ به ١٠)، ٠/٣ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ٠/٣ میکرومولار، ٦/٢٥ میکرولیتر Master Mix شرکت Thermo Fisher و ٤/٦٥ میکرولیتر آب بود. ژن اکتین- ٢ جهت نرمال سازی داده‌های واکنش استفاده شد. برای انجام واکنش Real Time-PCR از دستگاه (Bio-Rad CFX96) استفاده شد. از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای آنالیز داده‌ها استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001).

نتایج و بحث:

به منظور بررسی تأثیر ژن *SSL6* در پاسخ گیاه *A. thaliana* به تنش شوری، از لاین سرکوب شده حاصل از درج T-DNA در این ژن استفاده گردید. بررسی صفات درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسیداز و همچنین بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]

جدول ١- نام و اطلاعات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

طول قطعه	پرایمر معکوس	پرایمر رفتی	شماره دسترسی*	نماد ژن
178	CGACTGGACCACGAGCAT	GCACACACAGACTGCATTGT	AT2G39800	P5CS1
163	AATGTGGCGATTCTGGCTTC	ACGACGACAAAGGAAGTGGA	AT5G52310	RD29A
185	CCGCAAAGAGACTTCACCAC	GTTCTCTCCTCCAAAGCGTC	AT2G27150	AAO3
168	GCTCCGATGAATGTACCGTG	CGGAGAAGGAGGAGAGGAAG	AT3G14440	NCED3
149	CGATACCTGAGAACATAGTGG	CTTGTTCCAGCCCTCGTTTG	AT3G18780	ACT2

* **Accession number**

جدول ٢- تجزیه واریانس اثر شوری بر روی صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های Col-0 و ssl6

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد جوانه زنی	طول ریشه (Cm)	SOD(µMol/g FW)	POD (U/gFWmin)	CAT(U/gFWmin)
ژنوتیپ	١	٥٦/٠٥**	٠/٣٥٦**	٠/٠٠١**	٠/١٢**	٠/٠٠١*
تیمار	٢	٣٥٥٧/٢٨**	٨/٨٤٧**	٠/٠٠٣٥**	٠/٢٤**	٠/٠٠٠١ns
ژنوتیپ*تیمار	٢	٣١/٢**	٠/١٦٩ns	٠/٠٠٠٠٥ns	٠/٠٣٧*	٠/٠٣٧ns
خطا	١٢	١٤/١٩	٠/٤٥٦	٠/٠٠٠٧٤	٠/٠٩٩	٠/٠٠١٥

Ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی دار در سطح ٥ درصد و ١ درصد.

جدول ٣- مقایسه میانگین اثرات اصلی تنش شوری بر روی برخی از صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های Col-0 و ssl6

منابع تغییر	سطوح	درصد جوانه زنی	طول ریشه (Cm)	SOD(µMol/g FW)	POD (U/gFWmin)	CAT(U/gFWmin)
ژنوتیپ	Col-0	٣٠/٧٨b	١/٤٤٤b	٠/٠٣٧b	٠/٢٦٣b	٠/٠٠٨b
	ssl6	٣٤/٣a	١/٧٢٥a	٠/٠٥٢a	٠/٤٣٢a	٠/٠٢٣a
تیمار شوری	صفر	٤٩/١٦a	٢/٢٨٤a	٠/٠١٦b	٠/١٦c	٠/٠٢٢a
	١٠٠ میلی‌مولار	٤٣/٨٨b	١/٨٤٣b	٠/٠٥٦a	٠/٣١b	٠/٠١٥a
	٢٠٠ میلی‌مولار	٤/٦c	٠/٦٢٦c	٠/٠٦a	٠/٥٦a	٠/٠١١a

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

واکنش‌گر در گیاهان وحشی و موتانت در شرایط تنش شوری نشان دهنده تأثیر منفی فعالیت SSL6 بر پاسخ گیاه به تنش شوری می‌باشد.

اندازه‌گیری درصد جوانه زنی و طول ریشه: در این تحقیق برای ارزیابی میزان حساسیت موتانت *ssl6* در پاسخ به تنش شوری طی جوانه‌زنی بذر، مقادیر مختلف NaCl به محیط کشت اضافه گردید. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها، سطوح مختلف تنش شوری و اثر متقابل ژنوتیپ و تیمار اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ٢).

بر اساس مقایسه میانگین اثرات اصلی، تفاوت درصد جوانه زنی در ژنوتیپ *ssl6* نسبت به ژنوتیپ Col-0 معنی‌دار بوده، همچنین با افزایش غلظت NaCl درصد جوانه‌زنی در هر دو ژنوتیپ به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرده است (جدول ٣). بر اساس مقایسه میانگین اثرات متقابل در سطح صفر تیمار، تفاوت معنی‌داری بین دو ژنوتیپ دیده نمی‌شود ولی در سطوح ١٠٠ و ٢٠٠ میلی‌مولار میانگین درصد جوانه‌زنی در ژنوتیپ *ssl6* به ترتیب ٤٥/٦ و ٩ درصد بوده که این مقدار برای ژنوتیپ مادری ٤٢/١٥ و ٠/٥٢ درصد می‌باشد و لذا در این دو سطح تفاوت بین دو ژنوتیپ معنی‌دار می‌باشد (جدول ٤).

بیشرین تفاوت در درصد جوانه‌زنی مربوط به غلظت ٢٠٠ میلی‌مولار بود که در ژنوتیپ تیپ وحشی حداکثر ٤٪ جوانه زنی مشاهده شد در حالی که در ژنوتیپ موتانت این مقدار تا ٤٦٪ افزایش یافت. نتایج فوق نشان داد که موتانت *ssl6* عملکرد بهتری نسبت به تیپ وحشی در خصوص جوانه‌زنی دارد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]

جدول ٤- مقایسه میانگین اثرات متقابل برخی از صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های Col-0 و atssl6

سطوح شوری	ژنوتیپ	درصد جوانه زنی	POD(U/gFWmin)
صفر	Col-0	٤٩/٦٦[a]	٠/١٦٩[a]
	ssl6	٤٨/٦٦[a]	٠/١٥[a]
١٠٠ میلی‌مولار	Col-0	٤٢/١٥[b]	٠/١٩٥[b]
	ssl6	٤٥/٦[a]	٠/٤٣[a]
٢٠٠ میلی‌مولار	Col-0	٠/٥٣[b]	٠/٤٢[b]
	ssl6	٩[a]	٠/٧٠[a]

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون توکی تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

نتایج حاصل از مقایسه طول ریشه در دو ژنوتیپ مورد بررسی قرر گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف بین ژنوتیپ‌ها و سطوح تیمار شوری در سطح ١٪ معنی‌دار می باشد، در حالیکه اثر متقابل معنی‌دار نیست (جدول ٢). مقایسه میانگین ساده نشان داد طول ریشه در گیاه موتانت *ssl6* بیشتر بوده و نیز با افزایش سطح تیمار شوری از رشد ریشه در هر دو ژنوتیپ به صورت معنی‌داری کاسته شده است (جدول ٣). بنابراین ژنوتیپ موتانت نسبت به ژنوتیپ وحشی پاسخ مناسب‌تری در زمینه تحمل به تنش شوری داشته است. لذا طول ریشه‌های ژنوتیپ موتانت از کاهش کمتری در مقایسه با تیپ وحشی برخوردار بوده است. از جمله تاثیرات تنش شوری کاهش رشد و نمو گیاه است. وقتی گیاه در معرض تنش شوری قرار می‌گیر، د ساختمان ریشه آن (Root System Architecture RSA) تغییر کرده و طی آن از رشد ریشه اولیه جلوگیری و بر رشد ریشه‌های جانبی افزوده می‌شود (Galvan-Ampudia and Testerink, 2011). گیاه آرابیدوپسیس زمانی که در معرض تنش شوری قرار می‌گیرد، نرخ رشد ریشه آن با افزایش غلظت NaCl کاهش می‌یابد. مطالعات نشان داده است که این کاهش رشد به علت کاهش تقسیم سلولی و نیز کوچکتر بودن سلول‌های تولید شده در مریستم نوک ریشه می‌باشد. به عبارتی تنش شوری از طویل شدن سلول‌ها نیز جلوگیری بعمل می‌آورد (West *et al.*, 2004). با توجه به نتایج اندازه گیری طول ریشه، بنظر می‌رسد گیاه موتانت *ssl6* نسبت به گیاه مادری توانایی بیشتری در مقابله با تنش شوری داشته و لذا رشد طولی ریشه در گیاهان موتانت با کاهش کمتری مواجه بوده است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: به منظور ارزیابی تأثیر خاموشی ژن *SSL6* بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، در این تحقیق فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیداز بررسی گردید. بر اساس داده‌های حاصل از تجزیه واریانس فعالیت آنزیم SOD بین ژنوتیپ‌ها و نیز سطوح تنش در سطح ١ درصد معنی‌دار، اما اثر متقابل ژنوتیپ و تیمار معنی‌دار نبوده است (جدول ٢). مقایسه میانگین نشان داد که بین دو ژنوتیپ تفاوت وجود داشته و فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ *ssl6* برابر با ٠/٠٥١ µMol/g FW و بیشتر از ٠/٠٣٧ µMol/g FW در ژنوتیپ Col-0 می‌باشد. در بین سطوح مختلف تنش شوری اختلاف معنی‌داری بین سطوح ١٠٠ و ٢٠٠ میلی‌مولار با سطح صفر وجود دارد به عبارتی؛ افزایش شدت تنش باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD گردیده است (جدول ٣).

بر اساس نتایج حاصله از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از فعالیت آنزیم POD در مورد ژنوتیپ و تیمار در سطح ١ درصد و در مورد اثر متقابل ژنوتیپ و تیمار در سطح ٥ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ٢). مقایسه اثرات ساده در مورد ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیم POD در ژنوتیپ ssl6 به مقدار ٠/٤٣٢ U/gFWmin و در ژنوتیپ Col-0 ٠/٦٢٦ U/gFWmin بوده و تفاوت بین آنها معنی دار می باشد. همچنین در مورد سطوح تیمار شوری با افزایش غلظت NaCl فعالیت آنزیم POD افزایش یافته و بین هر سه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]

سطح تیمار اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳). در مورد اثر متقابل ژنوتیپ و تیمار داده‌های مقایسه میانگین نشان می-دهد که در سطح صفر اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم POD بین ژنوتیپ‌ها وجود ندارد، ولی در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار فعالیت آنزیم POD در ژنوتیپ ssl6 به ترتیب به مقدار ۰/٤۳ U/gFWmin و ۰/۷۰ U/gFWmin و در ژنوتیپ Col-0 به ترتیب به مقدار ۰/۱۹۵ U/gFWmin و ۰/٤۲ U/gFWmin بوده و بین دو ژنوتیپ اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ٤).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های فعالیت آنزیم کاتالاز نشان می‌دهد که در دو ژنوتیپ در سطح ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار بوده (جدول ۲) و مقایسه میانگین اثرات ساده نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ *ssl6* بیشتر از ژنوتیپ Col-0 بوده و تفاوت معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳). فعالیت این آنزیم در مورد تیمار شوری و اثر متقابل ژنوتیپ و تیمار معنی-دار نیست (جدول ۲).

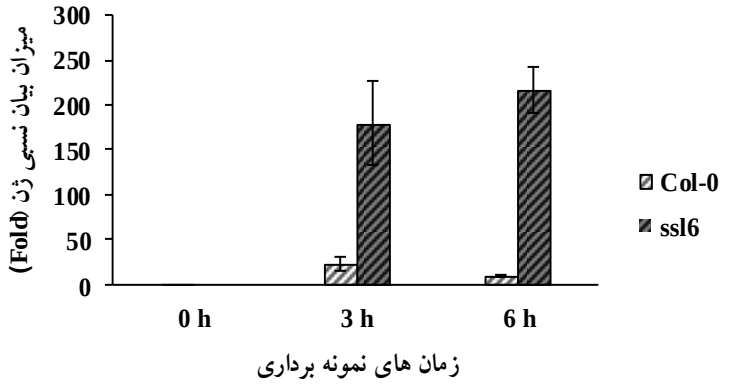
در حالت کلی اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در دو ژنوتیپ موتانت و تیپ وحشی حاکی از تأثیر مثبت سرکوب ژن *SSL6* در افزایش فعالیت آنزیم‌های جمع‌آوری کننده ROS های حاصل از تنش شوری در آرابیدوپسیس می‌باشد. انواع تنش‌های غیر زیستی موجب تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند که بسیار سمی و فعال بوده و باعث آسیب به پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA و نهایتاً باعث تنش اکسیداتیو می شوند. سیستم آنتی‌اکسیدانتی در مقابل تنش اکسیداتیو از گیاه حفاظت می‌کند. این سیستم در گیاهان شامل آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیداز و نیز ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی غیر آنزیمی نظیر آسکوربیک اسید و گلوتاتیون می‌باشد که سلول‌های گیاهی را از آسیب‌های اکسیداتیو از طریق جمع آوری ROS ها حفاظت می‌کند. (Gill and Tuteja, 2010). پاسخ گیاهان به تنش شوری بر اساس ژنوتیپ، مرحله نموی و نیز شدت و مدت تنش متفاوت است. در تحقیقی که به منظور تأثیر تنش شوری بر روی رشد گیاهچه‌های گندم صورت گرفت، گزارش شد که فعالیت بیشترآنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت SOD، CAT، APX و GR در رقم مقاوم بیشتر از ارقام حساس بوده و لذا گیاهچه های فوق رشد بیشتری در شرایط تنش دارد (El-Bastawisy, 2010).

افزایش شوری تأثیر منفی بر روی فیزیولوژی گیاه داشته باعث آسیب‌هایی نظیر آسیب اکسیداتیو می‌شود. نتیجه این تاثیرات می‌تواند باعث آسیب به غشاء سلولی، جلوگیری از فتوسنتز، تولید متابولیت‌های سمی، کاهش جذب مواد غذایی و در نهایت مرگ گیاه می‌شود (Tavakkoli *et al*., 2011). فعالیت آنزیم‌های جمع‌آوری کننده ROS همبستگی بالایی با دفاع آنتی‌اکسیدانتی و مقاومت به تنش شوری دارد. با این حال این میزان فعالیت در ارقام مختلف در شدت و مدت تنش متفاوت است. تولید ROS و افزایش فعالیت بسیاری از آنزیم-های آنتی‌اکسیدانتی در طول تنش شوری در مورد بسیاری از گیاهان گزارش شده است و بسیاری نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در ژنوتیپ‌های مقاوم در پاسخ به شوری افزایش یافته در حالی که در گونه‌های حساس تغییر مشاهده نمی‌شود (Ghosh *et al*., 2011). از جمله دلایل مقاومت برنج رقم Pokkali به شوری افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و نیز فعال شدن سریع این آنزیم‌ها ذکر شده (Vaidyanathan et al., 2003). سرکوب ژن *SSL6* در گیاهان موتانت *ssl6* موجب فعال شدن سیستم پاسخ آنتی‌اکسیدانتی و تحمل بیشتر در گیاهان موتانت در پاسخ به تنش شوری شده است. بنابراین خاموشی ژن *SSL6* در لاین جهش یافته *ssl6* موجب افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانتی در گیاه و احتمالاً بدنبال آن افزایش تحمل گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان وحشی شود.

بررسی بیان نسبی ژن‌های واکنش‌گر به تنش شوری: اندازه گیری میزان بیان ژن‌های مؤثر بر پاسخ گیاه به تنش و ایجاد تحمل بیشتر به تنش شوری از جمله روش‌های ارزیابی تحمل یا حساسیت گیاهان در واکنش به تنش شوری می‌باشد. این ژن‌ها عموماً کد کننده پروتئین‌هایی هستند که عمدتاً در تولید متابولیت‌های مؤثر در پاسخ گیاهان به تنش شوری نظیر هورمون ABA یا اسید آمینه پرولین نقش دارند. در شرایط

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]



شکل ۲- الگوی بیان نسبی ژن RD29A در پاسخ به تنش شوری در زمان‌های صفر، ۳ و ٦ ساعت (h) پس از تیمار (داده‌ها به صورت میانگین± خطای استاندارد ارائه شده‌اند).

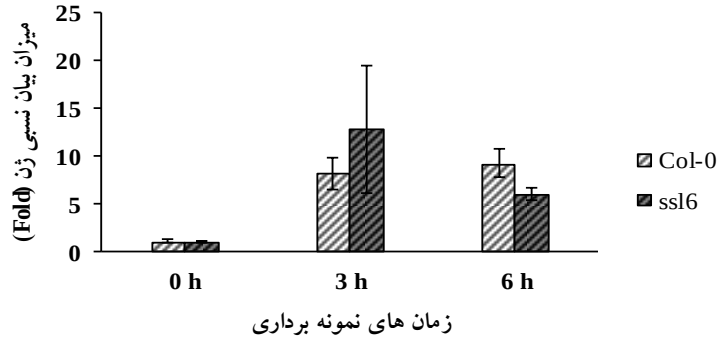
تنش، میزان بیان نسبی ژن‌های پاسخ به تنش نظیر *RD29A* (Responsive to Desiccation 29A)، *P5CS1* (Δ -pyrroline-5-carboxylate synthase 1)، *AAO3* (abscisic-aldehyde oxidase) و *NCED3* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase3) افزایش می‌یابد و افزایش تحمل به تنش شوری و سایر تنش‌های غیر زیستی را در گیاهان به دنبال دارد (Li *et al*., 2015; Liu *et al*., 2015; Shi *et al*., 2012).

بیان نسبی ژن *RD29A* در گیاهان موتانت *ssl6* در زمان‌های ۳ و ٦ ساعت پس از تیمار شوری به ترتیب ۸ و ٢٤ برابر در مقایسه با ژنوتیپ Col-0 بوده است که تفاوت معنی داری با بیان این ژن در ژنوتیپ Col-0 دارد (شکل ۲).

ژن *RD29A* به تنش‌های غیر زیستی حساس و بیان آن در واکنش به این تنش‌ها افزایش می‌یابد. لذا در گروه ژن‌هایی دسته بندی می‌شود که در مقاومت به تنش‌های غیر زیستی نقش دارد (Msanne *et al*., 2011). پروتئین کد شده بوسیله این ژن از نظر کارکرد شناخته شده نبوده و مکانیسم مقاومت حاصل از آن مشخص نمی‌باشد. با این حال آن‌ها را پروتئین‌های شبه LEA (like late embryogenesis abundant) می‌نامند (Kaur and Gupta, 2005). از ژن‌های کد کننده LEA که فعالیت چاپرونی دارند برای تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های غیر زیستی استفاده می‌شود (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). مطالعه لاین‌های T-DNA ژن *RD29A* مشخص کرد که از نظر مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان جهش یافته به تنش شوری حساس بودند که نشان از نقش این ژن در پاسخ به تنش‌ها دارد (Msanne *et al*., 2011). ناحیه پروموتری این ژن حاوی عناصر تنظیم کننده DRE/CRT و ABRE واکنش به تنش‌های غیر زیستی بوده و باعث القاء بیان این ژن از طریق میانکنش با فاکتور رونویسی DREB می‌گردد (Kant *et al*., 2007). بیان ژن Δ- پرولین- ٥- کربوکسیلات سینتاز (*P5CS1*) ۳ ساعت پس از تیمار شوری در هر دو ژنوتیپ افزایش نشان می‌دهد که این افزایش در گیاه موتانت بیشتر و ۱/۷۵ برابر گیاه تیپ وحشی می باشد. درزمان ٦ ساعت پس از تیمار شوری بیان ژن *P5CS1* در گیاه موتانت کاهش یافته است در حالی که میزان بیان نسبی این ژن در گیاه تیپ وحشی اندکی افزایش نشان می‌دهد (شکل ۳).

Δ- پرولین- ٥- کربوکسیلات سینتاز (*P5CS1*) آنزیم کلیدی بیوسنتز پرولین می‌باشد. میزان رونویسی این ژن در شرایط تنش شوری، خشکی و نیز تیمار با ABA تغییر کرده و به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد. آنالیز بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان موتانت که در آن *P5CS1* خاموش شده‌اند در پاسخ به تنش شوری نشان دهنده کاهش میزان پرولین و حساسیت شدید به تنش شوری بوده و میزان گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. تجمع پرولین یک پاسخ عمومی در گیاهان عالی به تنش شوری و خشکی می‌باشد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]



شکل ۳- الگوی بیان نسبی ژن P5CS1 در پاسخ به تنش شوری در زمان‌های صفر، ۳ و ٦ ساعت (h) پس از تیمار (داده‌ها به صورت میانگین± خطای استاندارد ارائه شده‌اند).

(Szekley *et al.*, 2008). پرولین بعنوان یک اسمولیت بسیار مهم با فعالیت چاپرونی از ساختار پروتئین‌ها حفاظت کرده و نیز با فعالیت آنتی اکسیدانتی سطوح رادیکال‌های آزاد را کنترل می‌کند (Hong *et al.*, 2000). اسید آمینه پرولین در پاسخ به تنش‌های محیطی در گیاهان تجمع می‌یابد. علاوه بر نقش پرولین در تنظیم اسمز سلولی، پرولین در حفاظت ساختار غشاء سلولی و پروتئین، جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد نقش داشته و نیز باعث القاء ژن‌های پاسخ به شوری دارای عناصر تنظیمی پاسخ به پرولین در ناحیه پروموتری می‌باشند می‌گردد (Ashraf and Foolad, 2007).

بیان نسبی ژن آبسیزیک آلدئید اکسیداز (*AAO3*) در گیاه Col-0 تغییر معنی‌داری در ساعت‌های پس از اعمال تیمار نداشته و القاء نشده است. در گیاه موتانت *ssl6* بیان ژن در ۳ و ٦ ساعت پس از تیمار افزایش حدود ٤ برابری را نسبت به زمان صفر نشان می‌دهد (شکل ٤).

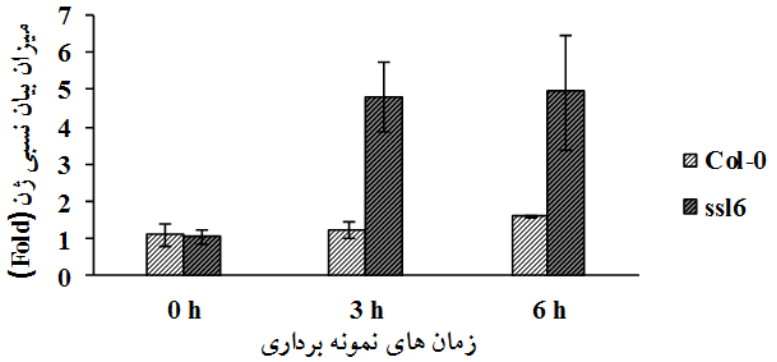
الگوی بیان نسبی ژن ۹-سیس- اپوکسی‌کاروتنوئید دی اکسیژناز (*NCED3*) افزایشی می‌باشد، ولی بیان آن ٦ ساعت پس از اعمال تیمار شوری کاهش یافته است. ژن *NCED3* در گیاه تیپ وحشی نیز افزایش یافته و نسبت به زمان صفر تقریباً ٤ برابر افزایش یافته است، با این حال میزان این افزایش نسبت به گیاه جهش یافته کمتر است. افزایش بیان ژن *NCED3* در گیاه موتانت *ssl6* نسبت به گیاه تیپ وحشی در زمان ۳ و ٦ ساعت پس از تیمار به ترتیب ۲/٤ و ۱/۷۵ برابر افزایش نشان می‌دهد (شکل ۵).

آنزیم‌های AAO3 و NCED3 از جمله آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز ABA می‌باشد. آخرین مرحله بیوسنتز ABA بوسیله آنزیم آبسیزیک آلدئید اکسیداز (AAO3) کاتالیز می‌شود. گیاه آرابیدوپسیس دارای ٤ ژن کد کننده آنزیم AAO می‌باشد که از ۱ تا ٤ نام گذاری شده‌اند. آنزیم AAO3 نقش اصلی را در بیوسنتز ABA در بین این آنزیم‌ها دارد. از سویی دیگر آنزیم NCED3 آنزیم کلیدی بیوسنتز و نیز کنترل سطح ABA در گیاه آرابیدوپسیس می‌باشد (Seo *et al.*, 2000). تنش‌های غیر زیستی نظیر شوری باعث افزایش ABA در گیاه می‌شوند. مطالعات نشان داده است که تجمع ABA فاکتور اصلی در کنترل پاسخ‌های گیاه برای مقاومت و تحمل به تنش می‌باشد. این پاسخ‌ها شامل تغییرات هدایت روزنه‌ای، رشد، تجمع اسمولیت‌ها و تغییر بیان ژن‌ها می‌باشد (Verslues and Zhu, 2005).

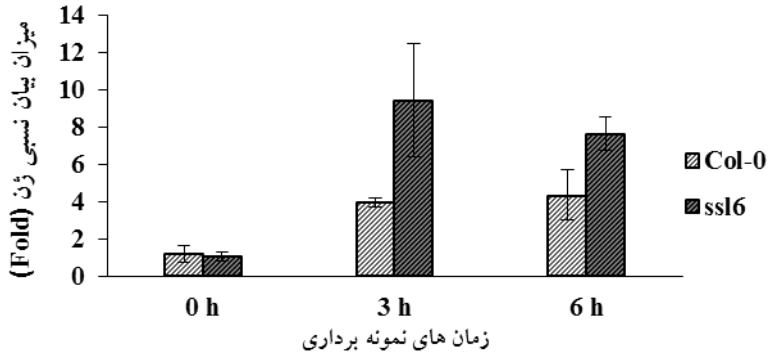
بررسی بیان نسبی چهار ژن واکنش گر به تنش‌های غیر زیستی نشان داد که بیان این ژن‌ها در گیاه موتانت *ssl6* افزایشی بوده و در زمان‌های ۳ و ٦ ساعت پس از تیمار افزایش یافته است. در گیاه تیپ وحشی نیز بجز ژن *AAO3* که بیان آن در ساعات پس از اعمال تیمار افزایش محسوسی ندارد، بیان سایر ژن‌ها افزایش داشته است. نتایج بررسی بیان نسبی این ژن‌ها نشان دهنده تأثیر مثبت سرکوب ژن *SSL6* بر بیان ژن‌های پاسخ به تنش شوری است. ژن‌های *RD29A*،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]



شکل ٤- الگوی بیان نسبی ژن ر پاسخ به تنش شوری در زمان‌های صفر، ۳ و ٦ ساعت (h) پس از تیمار (داده‌ها به صورت میانگین± خطای استاندارد ارائه شده‌اند).



شکل ٥- الگوی بیان نسبی ژن NCED3 در پاسخ به تنش شوری در زمان‌های صفر، ۳ و ٦ ساعت (h) پس از تیمار (داده‌ها به صورت میانگین± خطای استاندارد ارائه شده‌اند).

AAO3 و *NCED3* ژن هایی هستند که از دو طریق وابسته به هورمون ABA و نیز مستقل از آن القا شده و نقش کارکردی خود را ایفا می‌کنند. وجود عناصر تنظیمی پاسخ به ABA و همچنین تنش‌های غیر زیستی می‌تواند باعث بیان ژن‌های درگیر در تنش گردد (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Singh and Laxim, 2015; Barrero *et al*., 2006). احتمالاً ژن *SSL6* یک ممانعت کننده مسیرهای پاسخ به تنش‌های غیر زیستی از طریق تأثیر بر روی عوامل انتقال پیام نظیر فاکتورهای رونویسی و یا مسیر ABA می باشد. بنابراین سرکوب ژن *SSL6* از طریق درج T-DNA اثر مهار کنندگی آن را از بین برده و موجب القاء بیان ژن های مقاومت به تنش شوری شده است.

نتیجه‌گیری کلی:

در این تحقیق با استفاده از لاین جهش یافته حاصل از درج T-DNA در ژن SSL6 به بررسی نقش احتمالی این ژن در پاسخ به تنش شوری پرداخته شد. اندازه‌گیری درصد جوانه‌زنی و نیز رشد ریشه در شرایط تنش نشان دهنده پاسخ بهتر گیاه جهش یافته نسبت به گیاه مادری می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و نیز ژن‌های واکنش‌گر به تنش شوری می‌توان نتیجه گرفت که در گیاهان موتانت بخشی از سیستم دفاعی گیاه فعال شده است که می-تواند موجب ایجاد تحمل بیشتر در گیاه موتانت نسبت به گیاه تیپ وحشی گردد. مطالعات انجام گرفته بر روی میزان آنزیم-های POD، SOD و CAT نشان می‌دهد که افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در گیاه موتانت نسبت به گیاه مادری ارتباط مستقیمی با میزان تحمل گیاهان تنش شوری می‌تواند داشته باشد. باتوجه به نقش ژن‌های *AAO3*، *RD29A*، *NCED3* و *P5CS1* در تولید ترکیباتی نظیر پرولین و ABA و افزایش بیان این ژن‌ها در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]

گیاهان موتانت، می‌توان گفت که احتمالاً میزان تولید پرولین و ABA در گیاه موتانت *ssl6* تغییر یافته و لذا باعث ایجاد تحمل بیشتر در این گیاهان در شرایط تنش شوری شده است. این تحقیق اولین گزارش در مورد تأثیر منفی ژن SSL6 در پاسخ گیاه آرابیدوپسیس به تنش شوری و افزایش تحمل گیاه آرابیدوپسیس نسبت به این تنش در صورت سرکوب بیان ژن *SSL6* می‌باشد. با این حال جهت درک بهتر و کامل‌تر نقش ژن *SSL6* در پاسخ گیاه به تنش شوری فرابیان آن و همچنین اندازه‌گیری محتوای پرولین و ABA و نیز بررسی مسیر پیام رسانی SOS در گیاهان موتانت و تیپ وحشی در پاسخ به تنش شوری می‌تواند این مطالعه را کامل‌تر نماید.

منابع:

Ashraf, M. and Foolad, M. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.

Barrero, J., Rodriguez, P. L., Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M. R., & Micol, J. L. (2006) Both abscisic acid (ABA) dependent and ABA independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. Plant, cell and environment 29: 2000-2008.

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

Beers, R. F. and Sizer, I. W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. The Journal of Biological Chemistry 195: 133-140.

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

Cheong, M. S. and Yun, D. J. (2007) Salt-stress signaling. Journal of Plant Biology 50: 148-155.

Dobritsa, A. A., Nishikawa, S. I., Preuss, D., Wochniak, E. U., Summer, L. W., Hammond, A., Carson, A. L. and Swanso, R. J. (2009) LAP3, a novel plant protein required for pollen development, is essential for proper exine formation. Sexual Plant Reproduction 22: 167-177.

Dong, C. J. and Liu, J. Y. (2010) The Arabidopsis EAR-motif-containing protein RAP2. 1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. BMC plant biology 10: 47.

Dutta, A., Sen, J. and Deswal, R. (2013). New evidences about strictosidine synthase (Str) regulation by salinity, cold stress and nitric oxide in Catharanthus roseus. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 22: 124–131.

El-Bastawisy, Z. M. (2010) Variation in antioxidants among three wheat cultivars varying in tolerance to NaCl. Gen Appl Plant Physiol 36: 189-203.

Fabbri, M., Delp, G., Schmidt, O. and Theopold, U. (2000) Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid-synthesizing enzymes. Biochemical and Biophysical Research Communications 271: 191–196.

Galvan-Ampudia, C. S. and Testerink, C. (2011) Salt stress signals shape the plant root. Current opinion in plant biology 14: 296-302.

Ghosh, N., Adak, M. K., Ghosh, P. D., Gupta, S., Sen Gupta. D. N. and Mandal, C. (2011) Differential responses of two rice varieties to salt stress. Plant Biotechnology Reports 5: 89–103.

Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology Biochemistry 48: 909–930.

Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. and Verma, D. P. S. (2000) Removal of feedback inhibition of D(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiology 122: 1129–1136.

Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A. and Li, X. (2013) The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. Molecular Plant 6: 275-286.

Kant, P., Kant, S., Gordon, M., Shaked, R and Barak, S. (2007). STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, two DEAD-box RNA helicases that attenuate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses. Plant physiology 145: 814-830.

Kaur N. and Gupta A. K. (2005) Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. Current Science 88: 1771–1780.

Kibble, N. A., Sohani, M. M., Shirely, N., Byrt, C., Roessner, U., Bacic, A., Schmidt, O. and Schultz, C. J. (2009) Phylogenetic analysis and functional characterization of strictosidine synthase-like genes in Arabidopsis thaliana. Functional Plant Biology 36: 1098–1109.

Koornneef, M. and Meinke, D. (2010) The development of Arabidopsis as a model plant. The Plant Journal 61: 909-921.

Li, F., Guo, S., Zhao, Y., Chen, D., Chong, K. and Xu, Y. (2010). Overexpression of a homopeptide repeat-containing bHLH protein gene (OrbHLH001) from Dongxiang Wild Rice confers freezing and salt tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant cell reports 29: 977-986.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]

Li, J., Ban, L., Wen, H., Wang, Z., Dzyubenko, N., Chapurin, V. and Wang, X. (2015) An aquaporin protein is associated with drought stress tolerance.Biochemical and biophysical research communications 459: 208-213.

Liu, R., Liu, Y., Ye, N., Zhu, G., Chen, M., Jia, L. and Zhang, J. (2015) AtDsPTP1 acts as a negative regulator in osmotic stress signalling during Arabidopsis seed germination and seedling establishment. Journal of experimental botany 66: 1339-1353.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods 25: 402-408.

Msanne, J., Lin, J., Stone, J. M. and Awada, T. (2011) Characterization of abiotic stress-responsive Arabidopsis thaliana RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes. Planta 234: 97-107.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant, cell & environment 25: 239-250.

Park, H. J., Kim, W. Y. and Yun, D. J. (2016) A New Insight of Salt Stress Signaling in Plant. Molecules and cells.

Qadir, M., Tubeileh, A., Akhtar, J., Larbi, A., Minhas, P. S. and Khan, M. A. (2008). Productivity enhancement of salt-affected environments through crop diversification. Land Degradation and Development 19: 429–453.

Radhamony, R. N., Mohan Prasad, A. and Srinivasan, R. (2005) T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis: a tool for functional genomics. Electronic Journal of Biotechnology 8: 82-106.

Seo, M., Peeters, A. J. M., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart J. A. D., Koornneef, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000) The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences 97: 12908-12913.

Shi, H. T., Li, R. J., Cai, W., Liu, W., Wang C. L. and Lu, Y. T. (2012) Increasing Nitric Oxide Content in Arabidopsis thaliana by Expressing Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase Resulted in Enhanced Stress Tolerance. Plant and Cell Physiology 53: 344–357.

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

Singh, D. and Laxmi, A. (2015) Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. Frontiers in plant science 6.

Sohani, M. M., Schenk, P. M., Schultz, C. J. and Schmidt, O. (2009) Phylogenetic and transcriptional analysis of a srictosidine synthase-like gene family in Arabidopsis thaliana reveals involvement in plant defence responses. Plant Biology 11: 105-117.

Stockigt, J., Barleben, L., Panjikar, S. and Loris, E. A. (2008) 3D-structure and function of strictosidine synthase the key enzyme of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis. Plant Physiology Biochemistry 46:340-355.

Szekley, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C. and Szabados, L. (2008) Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. The Plant Journal 53: 11-28.

Tavakkoli, E., Fatehi, F., Coventry, S., Rengasamy, P. and McDonald, G. K. (2011) Additive effects of Na+ and Cl– ions on barley growth under salinity stress. Journal of Experimental Botany 62: 2189–2203.

Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R and Thomas, G. (2003) Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.)—differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. Plant Science 165: 1411-1418.

Verslues, P. E. and Zhu, J. K. (2005) Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. Biochemical Society Transactions 33: 375-379.

Walden, R. (2002) T-DNA tagging in a genomics era. Critical reviews in plant sciences 21: 143-165.

West, G., Inze, D. and Beemster, G. T. (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. Plant physiology 135: 1050-1058.

Yan, A., Wu, M., Yan, L., Hu, R., Ali, I. and Gan, Y. (2014) AtEXP2 is involved in seed germination and abiotic stress response in Arabidopsis. PloS one 9: e85208.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annu. Rev. Plant Biol 57: 781-803.

Yoshida, S., Ito, M., Nishida, I. and Watanabe, A. (2001) Isolation and RNA Gel Blot Analysis of Genes that Could Serve as Potential Molecular Markers for Leaf Senescence in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiology 42: 170-178.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.26.8] [Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26]