# بررسی تأثیر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* با استفاده از کینتیک فلوئورسنس کلروفیل a در گیاه *Nicotiana benthamiana* در پاسخ به تنش شوری

**زهره علمی انارکی[۱]، منصور شریعتی[۱*] و سید علی حسینی تفرشی[۲]**

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

[۲] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۳/۲۷)

**چکیده**

**پروتئین‌های HSP (Heat Shock Proteins)، پروتئین‌های تنشی هستند که در پاسخ به بسیاری از تنش‌های محیطی از جمله شوری در سلول‌ها بیان شده و سبب حفاظت از سلول می‌شوند. در میان آنها HSP90، HSP70 و smHSP نقش مهمی را در سلول ایفا می‌کنند. در این تحقیق، ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* از گیاه مقاوم به شوری کور (*Capparis spinosa*) انتخاب و از روش خاموش سازی ژن با القا ویروسی (Virus Induced Gene Silencing) به منظور بررسی نقش آنها استفاده گردید. پس از توقف بیان ژن‌ها در گیاه تنباکو *Nicotiana benthamiana* با کمک وکتور ویروسی pTRV2 حاوی قطعات ژنی گیاه کور، گیاهان تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی مولار نمک قرارگرفتند. پس از سه هفته میزان شاخص‌های مربوط به کینتیک فلوئورسنس کلروفیل a نمونه‌ها اندازه گیری گردید. نتایج نشان داد که خاموش سازی ژن *HSP70* به ویژه پس از اعمال تنش شوری نسبت به دو ژن *HSP90* و *smHSP* سبب کاهش قابل ملاحظه‌ای در شاخص‌های $F_V/F_o$، $\psi_o$، $\varphi_{Eo}$، $\varphi_{Ro}$، $Sm/t_{Fm}$، $\psi_o/(1-\psi_o)$ و $PI_{ABS}$ در گیاه تنباکو شده است. از طرفی میزان اتلاف انرژی در کل مراکز واکنش نسبت به مراکز فعال واکنش ($DI_O/RC$) به خصوص پس از اعمال تنش شوری در این گیاه افزایش مشخصی را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که در میان ژن‌های *HSP* مورد بررسی، خاموش سازی *HSP70* سبب آسیب‌های شدید در مراکز واکنش فتوسیستم II به خصوص پس از تنش شوری داشته است.**

**واژه‌های کلیدی: پروتئین شوک حرارتی، تنباکو، خاموش سازی ژن با القاء ویروسی، شوری، فلوئورسنس کلروفیل a**

**مقدمه**

گیاهان در محیط اطراف خود در برهمکنش با بسیاری از عوامل و تنش‌های مختلف زیست محیطی از جمله تشعشعات، خشکی، شوری، تغییرات ناگهانی در دما و حضور فلزات سنگین، سم‌ها و ترکیبات اکسید کننده ناشی از فعالیت‌های بشر و فاکتورهای زیستی مانند گیاه خوارها و پاتوژن‌ها می‌باشند. گیاهان قادر به تغییر محیط خود برای اجتناب از چنین تنش‌هایی نیستند، بنابراین راه‌های مختلف و سازگاری‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی متنوعی را برای تحمل این شرایط به کار می‌گیرند. از طرفی پاسخ به تنش‌ها در سطح مولکولی نیز در تمامی موجودات زنده دیده می‌شود که منجر به تغییر ناگهانی در بیان ژن‌ها شده که سبب افزایش در سنتز گروه‌های پروتئینی

[*] نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mansour_shariati@yahoo.com

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

خاص از جمله HSPs (Heat Shock Proteins) یا پروتئین‌های تنشی و یا القاء شده با تنش می‌گردد(Vierling 1991; Al-Whaibi 2011). این پروتئین‌ها تقریباً تحت تأثیر بسیاری از تنش‌ها در سلول بیان می‌شوند. مثلاً در گیاه *Arabidopsis* و بعضی دیگر از گونه‌های گیاهی، دیده شده است که دمای پائین، تنش‌های اسمتیک، شوری، اکسیداتیو، خشکی، تشعشعات شدید و فلزات سنگین منجر به سنتز این دسته از پروتئین‌ها شده‌اند (Swindell *et al.*, 2007). برخی از HSPs تحت شرایط طبیعی نیز در سلول‌ها حضور داشته و نقش مهمی را در ایجاد همئوستازی سلولی ایفا می‌کنند. آنها مسئول تاخوردگی پروتئین‌ها، مونتاژ یا تجمع دادن پروتئین‌ها، جا به جا شدن و تجزیه در بسیاری از مراحل طبیعی سلولی، کمک به حفظ ساختار پروتئین‌ها و غشاءها و کمک کردن به تا خوردگی مجدد پروتئین‌ها تحت شرایط تنش زا می‌باشند (Gupta *et al.*, 2010; De Maio 1999). این پروتئین‌ها وزن مولکولی بین ۱۰ تا ۲۰۰ کیلو دالتون دارند و به عنوان چپرون شناخته می‌شوند که در ایجاد سیگنال به دنبال تنش گرما مشارکت می‌کنند و بر اساس وزن مولکولی تقریبیشان، شباهت بین توالی اسید آمینه‌ها و عملکردشان به پنج دسته HSP 100 KD، HSP 90 KD، HSP 70 KD، HSP 60 KD و Small Heat Shock Proteins (sHSPs) تقسیم می‌شوند (Usman *et al.*, 2014).

سیستم فتوسنتزی گیاهان قسمت عمده‌ای از متابولیسم داخل گیاه را تشکیل می‌دهد و به تنش‌ها به شکل چشمگیری حساس می‌باشد. رشد گیاه و تولید بیوماس به میزان فتوسنتز خالص بستگی دارد و تنش شوری بسته به شدت آن بر فتوسنتز تأثیر می‌گذارد. کارایی فتوسنتز بستگی به واکنش‌های فتوشیمیایی، آنزیم‌های دخیل در تثبیت کربن، ساختار دستگاه فتوسنتزی و انتقال حدواسط های فتوسنتزی بین اجزای سلولی دارد. بنابراین، در تنش شوری عوامل زیادی از جمله کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، تغییر در فعالیت آنزیم‌های دخیل در جذب و تثبیت $CO_2$، سمیت نمک و آسیب اکسیداتیو به غشاهای فتوسنتزی، فتوسنتز را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Orcutt 2000; Parida and Das 2005). شوری بر آناتومی برگ و زیر ساختارهای کلروپلاستی نیز تأثیر می‌گذارد، بنابراین، فتوسنتز تحت تأثیر این عوامل نیز قرار می‌گیرد. تحقیقات نشان می‌دهند که کاهش کارایی سیستم‌های فتوسنتزی در شرایط تنشی به خصوص شوری مرتبط با کمپلکس فتوسیستم II در دستگاه فتوسنتزی می‌باشد که آسیب به آن باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Kalaji *et al.*, 2011; Mehta *et al.*, 2010). تحقیقات زیادی نشان می‌دهد که رابطه مستقیمی بین چگونگی عملکرد اجزای فتوسنتزی به خصوص فتوسیستم II و تغییرات فلوئورسنس کلروفیل a وجود دارد (Strasser *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2010; Lazar 2009) به طوریکه در درجه حرارت استاندارد و طول موج بالاتر از ۶۸۰ نانومتر عمده فلوئورسنس ساطع شده از گیاه مربوط به فتوسیستم II می‌باشد (Baker 2008; Strasser *et al.*, 2004). بنابراین هر گونه تغییر در میزان فلوئورسنس کلروفیل a می‌تواند نشانگر تغییری در مسیر انتقال الکترون در طی مراحل فتوشیمیایی باشد. از این رو بسیاری از عوامل اکولوژیکی و شرایط تنشی که قادر به تأثیر گذاری بر سیستم‌های فتوسنتزی هستند می‌توانند سبب تغییر خصوصیات و میزان فلوئورسنس کلروفیل a شوند. گزارش شده است که به محض نوردهی به نمونه‌های فتوسنتزی که با تاریکی سازگار شده‌اند، تغییرات مشخصی در شدت فلوئورسنس کلروفیل a رخ می‌دهد (Govindjee 1995). کینتیک فلوئورسنس با یک صعود سریع که مدت آن کمتر از یک ثانیه است، آغاز شده و با یک نزول آهسته‌تر که در نهایت به یک سطح پایدار و ثابت ختم می‌شود، ادامه پیدا می‌کند (Strauss *et al.*, 2006). بر طبق نظر Strasser (2004)، فاز صعودی کینتیک فلئورسنس بازتابی از واکنش‌های اولیه فتوسنتز است که سبب مهار مراکز واکنش فتوسیستم II می‌شود (Strasser *et al.*, 2004). بنابراین کینتیک فلئورسنس اطلاعاتی در مورد فعالیت‌های فتوشیمیایی فتوسیستم II از ابتدای دریافت فوتون‌های نوری تا تحویل الکترون‌ها به فتوسیستم I، می‌دهد.

تحقیقات نشان داده است که به دنبال تنش‌های محیطی از

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

جمله شوری بیان ژن‌های متعدد در گیاه افزایش یافته که در میان آنها ژن‌های *HSP* به عنوان چپرون‌های مولکولی تأثیر مهمی را در حفاظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ایجاد شده و کمک به بهبود و بقاء سلول‌ها بعد از برگشت به شرایط رشد طبیعی به دنبال تنش‌های غیر زیستی دارند (Morimoto and Santoro 1998; Gupta and Huang 2014). به عنوان مثال در گیاه برنج میزان بیان ۹ ژن متعلق به خانواده *HSP* تحت تنش‌های غیر زیستی از جمله شوری بررسی شده است که نتایج افزایش بیان ژن‌های *OsHsp93.04*، *OsHsp71.10*، *OsHsp71.18*، *OsHsp72.57*، *OsHsp18.03* و *OsHsp24.15* را نشان داد (Ye *et al.*, 2012). در بررسی دیگر مشخص شده است که تشدید بیان ژن *HSP70* یک سیانوباکتر مقاوم به شوری *Aphanothece halophytica* در گیاه *Nicotiana tabacum* سبب بهبود تعدادی از پارامترهای فیزیولوژیکی از جمله میزان تثبیت $CO_2$، میزان کل پروتئین و میزان آنزیم روبیسکو در پاسخ به تنش شوری شده است (Sugino *et al.*, 1999). از طرفی بررسی‌ها نشان داده است که بیان ژن‌های مربوط به *HSP* های کلروپلاستی از جمله *HSP70* و *smHSP* نقش مهمی را در ایجاد حفاظت نوری و تعمیر فتوسیستم II در برابر آسیب‌های نوری و تنش‌های غیر زیستی مثل سرما، خشکی، گرما، تشعشعات UV، تیمار خارجی ABA و تنش‌های اکسیداتیو دارد (Heckathorn *et al.*, 1998; Schroda *et al.*, 1999; Downs *et al.*, 1999; Neta-Sharir *et al.*, 2005). امروزه استفاده از تکنیک خاموش سازی ژن با تحریک ویروس Virus Induced Gene Silencing (VIGS) به عنوان یکی از ابزارهای مناسب برای خاموش نمودن موقت ژن‌های گیاهی و بررسی عملکرد آنها از روی فنوتیپ ایجاد شده بسیار رو به گسترش است. در این روش نیازی به ایجاد خط تراریخته پایدار ژنتیکی نیست و تنها از طریق جداسازی توالی ژن‌های مورد نظر از یک گیاه که احتمال می‌رود سطح بیان مناسبی از این ژن‌ها داشته باشد و سپس خاموش سازی آنها و بررسی عملکردشان در گونه گیاهی دیگر که دارای سیستم VIGS بهینه است (مشابه تنباکو) برای خاموش سازی ژن‌های هومولوگ یا مشابه آنها استفاده می‌شود. در این شیوه از تحقیق یک ناقل ویروسی نوترکیب که ترادف جزئی از ژنی که می‌خواهیم خاموش شود را حمل می‌کند، ابتدا وارد آگروباکتریوم کرده تا کارایی انتقال بهتری را داخل میزبان پیدا کند. در مرحله بعد آگروباکتریوم حاوی ناقل به برگ‌های اولیه گیاهچه‌های جوان تلقیح تا ویروس بداخل سلول نفوذ کرده و ژنوم خود را به همراه ترادف ژنی اضافی به صورت mRNA تکثیر می‌کند. سپس نسخه‌های mRNA در سلول میزبان توسط RNase ها تجزیه شده و بیان ژن‌ها به صورت موقت متوقف می‌شود. لذا با توجه به اهمیت نقش ژن‌های *HSP* در ایجاد مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی از جمله شوری، در این پژوهش تلاش شده است که از طریق سیستم خاموش سازی غیر متجانس با القاء ویروسی (VIGS) به عنوان ابزاری مناسب جهت سرکوب موقت فعالیت یک ژن در سطح بیان mRNA، اثر سه ژن *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه مقاوم به شوری و گرما *Capparis spinosa* L با استفاده از وکتور خاموش سازی Tobacco Rattle Virus (TRV) بر روی میزان فلوئورسنس کلروفیل a به عنوان یک معیار مناسب جهت سنجش میزان فعالیت فتوسنتزی گیاه در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری در گیاه گلیکوفیت تنباکو (*Nicotiana benthamiana*) مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

**کاشت گیاهان تنباکو:** بذرهای گیاه *N. benthamiana* در سینی‌های کشت نشاء حاوی پیت ماس (Klassman, Germany) و حدود ۱ گرم کود کامل NPK کاشته و در داخل اتاق کشت تحقیقاتی در دمای ۲۲ºC و رطوبت نسبی ۷۰٪ و تحت یک دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. تا قبل از جوانه زنی بذرها، به منظور حفظ رطوبت، روی گلدان‌ها با استفاده از سلفون پوشیده شد. پس از ظهور گیاهچه‌ها، تنها یکی از آنها حفظ و بقیه حذف شدند. آبیاری مداوم گیاهچه‌ها چند روز یک بار از طریق اضافه نمودن آب و چند نوبت محیط جانسون (Epstein 1972) به تشتک زیر گلدان‌ها صورت گرفت. ٤-٥ روز قبل از انجام VIGS گیاهچه‌ها به

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

**جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای PCR نمونه RNA استخراج شده از گیاه کور**

| نام ژن | نام آغازگر | توالی | طول آغازگر | دما (سانتی گراد) |
|---|---|---|---|---|
| *HSP70* | FCS 70 | 5'-TTGACTTCTACACCACCATCAC-3' | ۲۲ | ٦۰ |
| | RCS 70 | 5'-GCGCTCTTTCACCTTCATAAAC-3' | ۲۲ | ٦۰ |
| *HSP90* | FCS 90 | 5'-CTACTCWGCTTAYYTKGTWGCT-3' | ۲۲ | ٥۹ |
| | RCS 90 | 5'-CTGDCCYTCCTTCATYCTKGTC-3' | ۲۲ | ٦٤ |
| *smHSP* | FSM | 5'-AGAAACAGAGGAGGAGGAGAA-3' | ۲۱ | ٥۹ |
| | RSM | 5'-GGAATGGAGATGAGAAGGACAC-3' | ۲۲ | ٦۲ |

ظروف پلاستیکی حاوی پیت ماس و کود NPK منتقل گردیدند.

**شناسایی و طراحی آغازگر ژن‌های *HSP* در گیاه کور:** برای طراحی و ساخت آغازگرهای مورد نیاز برای جداسازی ژن‌های *HSP* گیاه کور، برای دو ژن *HSP70* و *smHSP* از توالی‌های معرفی شده برای این دو ژن در NCBI استفاده شد و برای جداسازی ژن *HSP90* گیاه کور توالی بخش‌های حفاظت شده این ژن در گیاهان نهاندانه با استفاده از نتایج برنامه BLAST و سایت Integrated DNA Technologies/PrimerQuest Tool مطالعه و مقایسه گردید تا در نهایت از روی بخش‌های مشترک این ژن یک جفت آغازگر طراحی گردد. توالی این آغازگرها در جدول ۱ ارائه شده است. طول قطعه ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* به ترتیب bp ۹۹۰، ٤۷٤ و ۲۹٦ بود. سپس گیاه کور از حومه شهر کاشان در شرایط گرما و شوری بالا که احتمالاً سبب بیان بالای ژن‌های *HSP* می‌شد، جمع آوری گردید و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد تا از طریق پرایمرهای طراحی شده، mRNA ژن‌های *HSP* استخراج و cDNA مربوطه ساخته شده و در وکتور خاموش سازی pTRV2 که از مرکز منابع زیستی آرابیدوپسیس در دانشگاه ایالتی اوهایو در آمریکا خریداری شده بود، قرار گیرد و به منظور خاموش سازی ژن‌های مشابه آنها در گیاه مدل تنباکو که دارای سیستم بهینه جهت خاموش سازی ژن است و همچنین نسبت به تنش شوری نیز حساس هستند، مورد استفاده قرار گیرند.

**تأیید ورود وکتورهای نوترکیب به اگروباکتریوم:** تأیید ورود وکتورهای نوترکیب ساخته شده در این تحقیق به اگروباکتریوم با استفاده از روش غربالگری توسط PCR از کلونی‌ها و توسط آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌های *HSP* (جدول ۲) انجام شد. همچنین از این روش برای تأیید حضور وکتورهای pTRV1، pTRV2 و pTRV2-*NtPDS* در اگروباکتریوم توسط پرایمرهای جدول ۳ استفاده گردید.

**خاموش سازی ژن‌های *HSP* با القاء ویروسی در گیاهچه های تنباکو:** ۲/٥ تا ۳ هفته پس از کاشت بذرهای گیاه *N. benthamiana* زمانی که گیاهچه‌های آن به مرحله ۳-٤ برگی رسیدند، تلقیح باکتری به منظور انجام خاموش سازی صورت گرفت. تمام سوسپانسیون‌های آماده شده از آگروباکتریوم حاوی وکتور خاموش سازی نوترکیب pTRV2 (وکتور خالی یا وکتورهای دارای بخشی از ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP*) بودند با سوسپانسیون باکتریایی حاوی وکتور pTRV1 و استوسیرینگان (باغلظت ٤۰۰ میکرو مولار) مخلوط شدند. در جدول ٤ نحوه اختلاط باکتری‌ها و نوع کلون‌های باکتریایی در هر تیمار نشان داده شده است. همچنین به منظور تأیید اولیه خاموش سازی، ژن شاهدی بنام *PDS* (فیتوئن دسچوراز ) به عنوان کنترل مثبت وارد وکتور خاموش سازی گردید. ژن فیتوئن دسچوراز یک آنزیم مهم در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها را کد می‌کند، که در صورت خاموش‌سازی، محتوای کاروتنوئیدی سلول را کاهش داده و در نهایت منجر به فنوتیپ سفیدشدگی می‌شود (Bartley and Scolnik 1995) بنابراین بروز پدیده مورد نظر نشانگر موفقیت در خاموش سازی می‌باشد. پس از اختلاط، باکتری‌ها آماده تزریق به

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

**جدول ۲-آغازگرهای مورد استفاده برای تأیید حضور وکتورهای نوترکیب حاوی ژن های *HSP* کور در آگروباکتریوم**

| نام ژن | نام (آغازگر) | توالی | طول آغازگر | دما (سانتی گراد) |
|---|---|---|---|---|
| *HSP70* | FCS 70 | 5'-TTGACTTCTACACCACCATCAC-3' | ۲۲ | ٦۰ |
| | RCS 70 | 5'-GCGCTCTTTCACCTTCATAAAC-3' | ۲۲ | ٦۰ |
| *HSP90** | FCS 90 | 5'-TGGTAGCTCTACTCTGCTTACT-3' | ۲۲ | ٥۹ |
| | RCS 90 | 5'-CTCATCAACCTCCTCAACCTTAC-3' | ۲۲ | ٦٤ |
| *smHSP* | FSM | 5'-AGAAACAGAGGAGGAGGAGAA-3' | ۲۱ | ٥۹ |
| | RSM | 5'-GGAATGGAGATGAGAAGGACAC-3' | ۲۲ | ٦۲ |

* آغازگرهای مورد استفاده برای وکتور نوترکیب pTRV2-*CsHSP90* در این مرحله پس از تعیین توالی ژن *CsHSP90* کور طراحی شدند.

**جدول ۳- آغازگرهای مورد استفاده برای تأیید حضور وکتورهای pTRV1، pTRV2 و pTRV2-*NtPDS* در اگروباکتریوم**

| نام وکتور | توالی آغازگر | اندازه قطعه تکثیر قابل انتظار ( bp) |
|---|---|---|
| pTRV1 | 5'-CTTGAAGAAGAAGACTTTCGAAGTCTC-3' | ۹۳۸ |
| | 5'-GTAAAATCATTGATAACAACACAGACAAAC-3' | |
| pTRV2 | 5'-CGGGCTAACAGTGCTCTTG-3' | ۱۳٤ |
| | 5'-CTCCCTTGGTTCGTCGTAAC-3' | |
| pTRV2-*NtPDS* | 5'-TGGAGTGGCAAACACAAAAGCATCT-3' | ۱٦۰ |
| | 5'-TTGCATGCCGACTGTGGAACA-3' | |

**جدول ٤- تیمارهای مورد استفاده برای تزریق به گیاهچه‌های تنباکو، نسبت اختلاط کلون‌های اگروباکتریوم حاوی وکتورهای مختلف و اندازه و نوع قطعات ژنی وارد شده در هر وکتور.**

| تیمار | کلون‌های باکتریایی تزریق شده در تیمار/نسبت اختلاط | قطعه همسانه‌سازی شده در pTRV2 |
|---|---|---|
| T1 (شاهد) | شاهد، بافر تلقیح فاقد باکتری | - |
| T2 (کنترل منفی) | pTRV2+pTRV1 خالی/۱:۱ | وکتور فاقد قطعه ژن HSP |
| T3 (کنترل مثبت) | ۱:۱/ pTRV2-*NtPDS*+pTRV1 | یک بخش ٦۹۷ نوکلئوتیدی از *N. benthamiana PDS* |
| T4 | ۱:۱/ pTRV2-*CsHSP90*+pTRV1 | یک بخش ۳٥۱ نوکلئوتیدی از *C. spinosa HSP90* |
| T5 | ۱:۱/ pTRV2-*CsHSP70*+pTRV1 | یک بخش ٤۷٤ نوکلئوتیدی از *C. spinosa HSP70* |
| T6 | ۱:۱/ pTRV2-*CssmHSP*+pTRV1 | یک بخش ۲۹٦ نوکلئوتیدی از *C. spinosa smHSP* |

گیاهان *N. benthamiana* شدند. همان‌طور که در جدول ٤ نیز ملاحظه می‌شود در تیمار اول (T1) که به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت، تنها بافر تلقیح که فاقد هر گونه باکتری به گیاهان تنباکو تزریق شد. در تیمار دوم (T2) که به نوعی کنترل منفی محسوب می‌شد، تنها باکتری‌های حاوی وکتور خالی pTRV2 و pTRV1 به گیاهچه‌ها تزریق شدند. در تیمار سوم (T3) باکتری‌هایی به گیاهچه‌ها تزریق شدند که دارای وکتورهای خاموش سازی بودند که قطعه‌ای از ژن فیتوئن

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

دسچوراز (*PDS*) جدا سازی شده از تنباکو را حمل می‌کردند. در تیمارهای چهارم، پنجم و ششم (T4، T5 و T6) نیز گیاهچه های تنباکو با وکتورهای خاموش سازی حاوی قطعاتی از ژن‌های مختلف *HSP* (*HSP90*، *HSP70* و *smHSP*) حاصل از گیاه کور تزریق شدند. این وکتورها برای انجام آزمایش‌های VIGS مورد استفاده قرار گرفتند.

**تزریق مخلوط اگروباکتریوم ها به گیاهان تنباکو:** مخلوط اگروباکتریوم‌های تهیه شده مطابق جدول ٤ با استفاده از یک سرنگ یک میلی لیتری بدون سوزن به گیاهان تنباکو ۲۱ روزه تزریق شدند. برای تزریق، روی سطح برگ با سوزن سرنگ زخمی شد و سپس سرنگ بدون سوزن بر روی سطح برگ مماس شده و در حالیکه طرف دیگر برگ با دست نگه داشته شده بود، تخلیه محتویات سرنگ به درون برگ از محل جراحت در سطح برگ انجام شد. برای تزریق حدود ۱۰۰ میکرو لیتر از بافر حاوی مخلوط اگروباکتریوم‌ها توسط سرنگ برداشته و به بخش زیرین هر برگ تزریق شد. این رویه تزریق برای همه برگ‌های گیاهان انجام شد. گیاهان تزریق شده به اتاق کشت منتقل شده و در دمای ۲۲ $^{o}$C و تحت یک دوره نوری ١٦ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در این مرحله نیز آبیاری مداوم گیاهچه‌ها از طریق اضافه نمودن آب و محیط اصلاح شده جانسون به تشتک زیر گلدان‌ها صورت گرفت.

**نحوه اعمال تنش شوری به گیاهان تنباکو آلوده سازی شده با اگروباکتریوم حامل وکتورهای خاموش سازی نوترکیب:** ۳ روز پس از انجام آزمایشات VIGS و تزریق آگروباکتریوم‌های حاوی وکتورهای خاموش سازی نوترکیب به گیاهان تنباکو، اعمال تنش شوری ۱۰۰ میلی مولار نمک و صفر به عنوان شاهد صورت گرفت آزمایشات انجام شده به صورت فاکتوریل دو عاملی، فاکتور اول خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* در گیاه تنباکو (*Nicotiana benthamiana*) در (۵ سطح) و فاکتور دوم تیمار شوری (در دو سطح کنترل و شوری ۱۰۰ میلی مولار نمک) در قالب یک طرح آماری بلوک‌های کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار زیستی و در هر تکرار حداقل ۱۰ گلدان جهت انجام تحقیقات در نظر گرفته شد.

**اندازه گیری کینتیک فلوئورسنس کلروفیل a:** جهت بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP* و تنش شوری بر فلوئورسنس کلروفیل a گیاه تنباکو از اطلاعات حاصل از مراحل مختلف القاء فلوئورسنس که از نوردهی به نمونه‌های سازگار شده به تاریکی منتشر می‌شود، استفاده گردید. اندازه گیری فلوئورسنس کلروفیل a با استفاده از دستگاه Handy PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, UK) انجام شد. به این منظور ۳ هفته پس از انجام خاموش سازی و اعمال تنش شوری، برگ‌های مشخصی از گیاهان شاهد و تحت تیمار در موقعیت‌های یکسان فیلوتاکسی انتخاب و گیره‌های مخصوصی که از طریق دریچه‌های خاص قادر به ایجاد فضای تاریک بر سطح مشخصی از برگ بودند به برگ‌های مورد نظر متصل شدند. گیاهان قبل از اندازه گیری به مدت ۲۰ دقیقه توسط گیره مخصوص در تاریکی قرار گرفتند. اطلاعات اولیه فلوئورسنس کلروفیل a (جدول ۵) توسط دستگاه ثبت گردیده و در مرحله بعد با استفاده از روشی موسوم به OJIP-test اطلاعات اولیه فلوئورسنس به پارامترهای بیوفیزیکی (جدول ٦) تبدیل و در نهایت با استفاده از نرم افزار Biolyzer HP4 پارامترهای ذکر شده جهت تعیین محل اثر خاموش سازی و تنش شوری در فتوسیستم II مورد بررسی قرار گرفت و نمودارهای مربوط به آنها رسم شد.

**آنالیز آماری:** برای آنالیز آماری نتایج مقایسه میانگین‌ها از طریق نرم افزار GraphPad Prism 6 و روش ANOVA و تست Duncan در سطح $P\leq0.05$ با استفاده از نرم افزارهای SPSS (Ver.19) و Excel صورت گرفت.

## نتایج

**تأیید انتقال وکتورهای نوترکیب pTRV2 به اگروباکتریوم:** به منظور انجام آزمایش‌های خاموش سازی، وکتورهای نوترکیب ساخته شده در این پژوهش به همراه سایر وکتورهای اصلی و نوترکیب (pTRV2، pTRV1 و pTRV2-*NtPDS*) به

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

**جدول ۵- پارامترهای اولیه فلوئورسنس کلروفیل a حاصل از ثبت توسط دستگاه Handy PEA**

| پارامترهای اولیه فلوئورسنس کلروفیل a | |
|---|---|
| $F_o$ | میزان فلوئورسنس ۲۰ میکروثانیه پس از نوردهی (حداقل نور فلوئورسنس) |
| $F_{50\ \mu s}$ | میزان فلوئورسنس ۵۰ میکروثانیه پس از نوردهی |
| $F_{100\ \mu s}$ | میزان فلوئورسنس ۱۰۰ میکروثانیه پس از نوردهی |
| $F_K$ | میزان فلوئورسنس ۳۰۰ میکروثانیه پس از نوردهی |
| $F_J$ | میزان فلوئورسنس ۲ میلی ثانیه پس از نوردهی |
| $F_I$ | میزان فلوئورسنس ۲۰ میلی ثانیه پس از نوردهی |
| $F_M=F_P$ | میزان فلوئورسنس ۱۰۰ میلی ثانیه پس از نوردهی (حداکثر نور فلوئورسنس) |

**جدول ٦- پارامترهای بیوفیزیکی حاصل از OJIP-test استخراج شده از اطلاعات اولیه فلوئورسنس کلروفیل a**

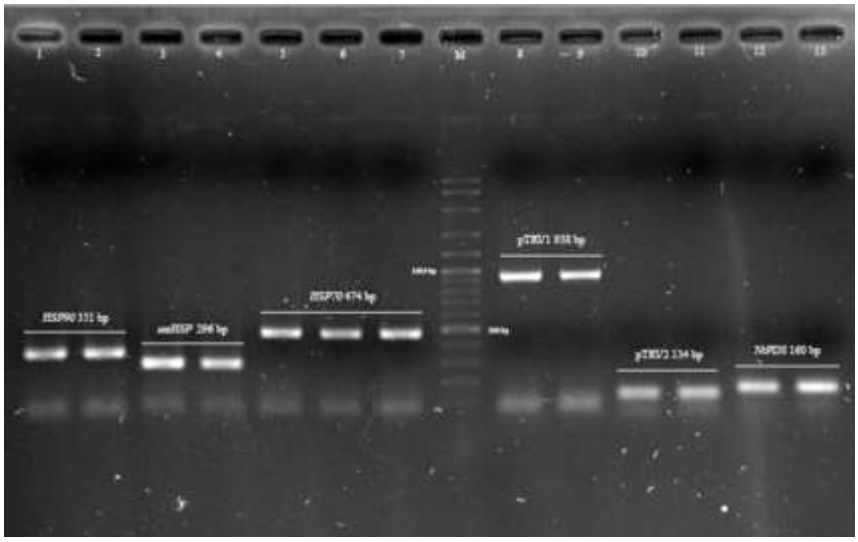
| پارامترهای بیوفیزیکی حاصل از OJIP-test | |
|---|---|
| $F_V/F_o$ (OEC Activity) | کارایی کمپلکس تجزیه آب در سمت دهنده فتوسیستمII |
| $F_V/F_M$ | حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II |
| $\psi_o$ | میزان انتقال الکترون از $Q_A$ به $Q_B$ در فتوسیستم II |
| $\varphi_{Eo}$ | میزان انتقال الکترون از $Q_B$ به زنجیره انتقال الکترون پس از $Q_B$ (میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II) |
| $\varphi_{Ro}$ | میزان احیای آخرین پذیرنده الکترون در سمت فتوسیستم I |
| $DI_O/RC$ | میزان اتلاف انرژی در کل مراکز واکنش نسبت به مراکز فعال واکنش |
| $Sm/t_{Fm}$ | میانگین فعالیت انتقال الکترون در فتوسیستم II |
| $\psi_o/(1-\psi_o)$ | کارایی واکنش‌های بیوشیمیایی در فتوسیستم II |
| $PI_{ABS}$ | شاخص کارایی فتوسنتزی از ابتدای فتوسیستم II تا ابتدای فتوسیستم I |

سویه LBA4404 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* انتقال داده شدند تا به گیاهان تنباکو تزریق شوند. تأیید حضور وکتورهای اصلی و نوترکیب در آگروباکتریوم با استفاده از نتایج غربالگری کلونی‌ها توسط PCR انجام شد. همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود انتقال وکتورها به آگروباکتریوم با موفقیت صورت گرفته است.

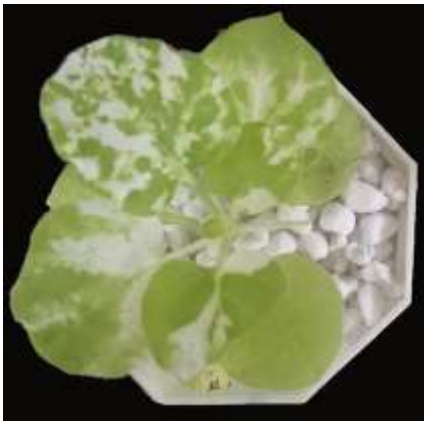
**تأیید خاموش سازی در گیاه *N.benthamiana*** : همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است پس از آلوده سازی گیاهان *N.benthamiana* با وکتور خاموش سازی مربوط به ژن *PDS*، در برگ گیاهان علائم سفید شدگی رخ داده است که تأیید کننده خاموش سازی می‌باشد.

**بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* پس از اعمال تنش شوری بر کارایی کمپلکس تجزیه آب در سمت دهنده فتوسیستم II ($F_V/F_o$) گیاه *N.benthamiana***: مقایسه روند تغییرات شاخص $F_V/F_o$ (کارایی کمپلکس تجزیه آب در سمت دهنده فتوسیستم II) در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl در گیاهان *N.benthamiana* (شکل ۳) که ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* متعلق به گیاه کور در آنها خاموش سازی شده است، نسبت به گیاه شاهد (محلول بافر به آنها تزریق شده) و گیاهی که وکتور ویروسی pTRV2 به آنها وارد شده است (کنترل منفی) نشان می‌دهد که تنها خاموش سازی ژن‌های *HSP70* در گیاه *N.benthamiana* باعث کاهش کارایی کمپلکس تجزیه آب به خصوص پس از تنش شوری شده است. این در حالی است که

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]



**شکل ۱- الکتروفورز ژل آگاروز از محصولات غربالگری کلونی های آگروباکتریوم با PCR پس از انتقال به روش شیمیایی. چاهک‌های ۱ تا ۷ به ترتیب حاوی محصولات PCR کلونی‌های دریافت کننده وکتورهای حاوی ژن های *HSP90*، *smHSP* و *HSP70* بودند. در چاهک های ۸ تا ۱۱ به ترتیب محصولات PCR کلونی های حاوی وکتورهای اصلی pTRV1 و pTRV2 بارگذاری شدند. محصولات PCR کلونی های حاوی وکتورهای نوترکیب pTRV2-*NtPDS* بارگذاری شد. M: مارکر 100bp DNA Ladder Plus (Fermentase).**



**شکل ۲- بروز علائم سفید شدگی در برگ گیاهان *N.benthamiana* پس از آلوده سازی با وکتور خاموش سازی مربوط به ژن *PDS*، که تأیید کننده خاموش سازی می‌باشد.**

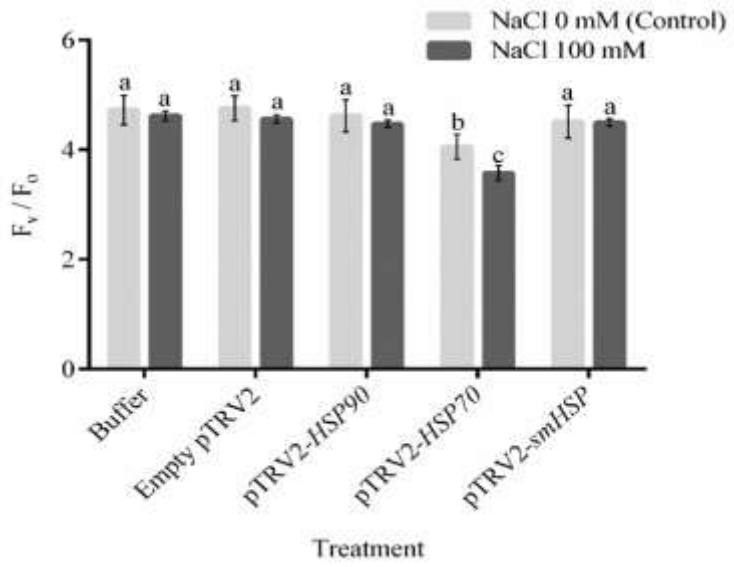
در گیاهان *N.benthamiana* تیمار شده با بافر، pTRV2، pTRV2-*HSP90* و pTRV2-*smHSP* تفاوتی مشاهده نشد.

**بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* پس از اعمال تنش شوری بر انتقال الکترون از QA به QB در فتوسیستم II ($\psi_o$) گیاه *N.benthamiana*:** مقایسه روند تغییرات شاخص $\psi_o$ (انتقال الکترون از $Q_A$ به $Q_B$ در فتوسیستم II) در شکل ٤ نشان می‌دهد که گیاهان آلوده شده با وکتورهای خاموش سازی pTRV2 و وکتور خاموش سازی حاوی ژن *smHSP* نسبت به گیاه شاهد (تیمار شده با محلول بافر) تفاوت معنی داری را در شاخص $\psi_o$ در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار نمک ایجاد نکرده است. در حالیکه خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* در غلظت صفر میلی مولار نمک به ترتیب ۱۷ و ۲۸ درصد کاهش و در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۲۰ و ٤۰ درصد کاهش را در شاخص $\psi_o$ نسبت به گیاه شاهد ایجاد کرده است.

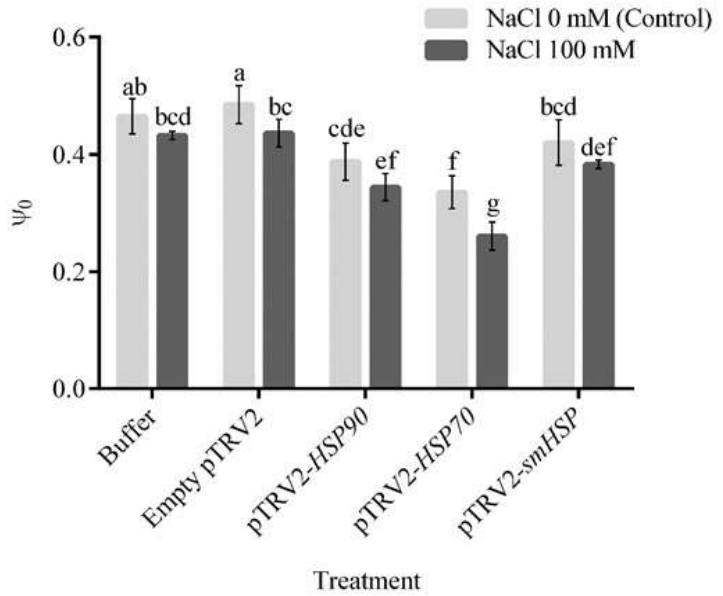
**بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* پس از اعمال تنش شوری بر میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستمII ($\varphi_{Eo}$) گیاه**

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]



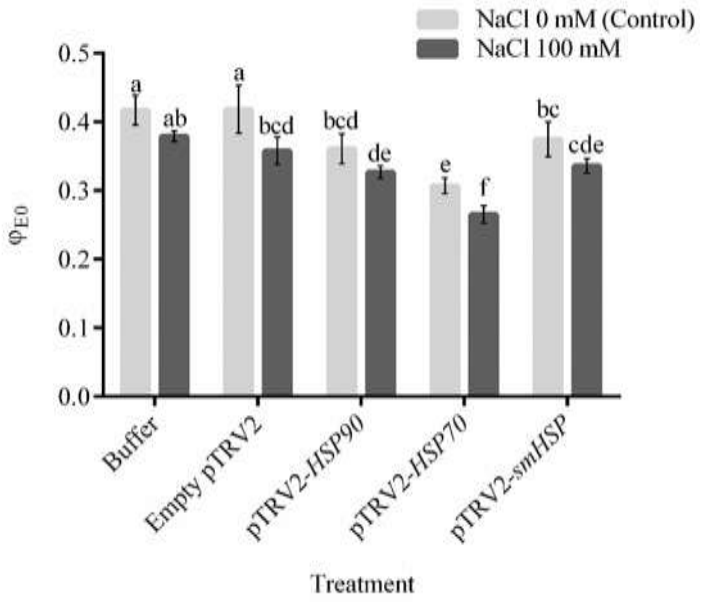

**شکل ۳- کارایی کمپلکس تجزیه آب در سمت دهنده فتوسیستم II ($F_V/F_0$) گیاه *N. benthamiana* پس از خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl. مقادیر میانگین سه تکرار است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار (P<0.05) می‌باشد.**




**شکل ٤- میزان انتقال الکترون از $Q_A$ به $Q_B$ در فتوسیستم II ($\psi_o$) گیاه *N. benthamiana* پس از خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl. مقادیر میانگین سه تکرار است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار (P<0.05) می‌باشد.**

**N. benthamiana**: بررسی میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II (شاخص $\varphi_{Eo}$) در حضور غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl در گیاهان *N.benthamiana* که ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها خاموش سازی شده است نسبت به گیاهان تیمار شده با محلول بافر و pTRV2 نشان می‌دهد (شکل ۵) که

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]



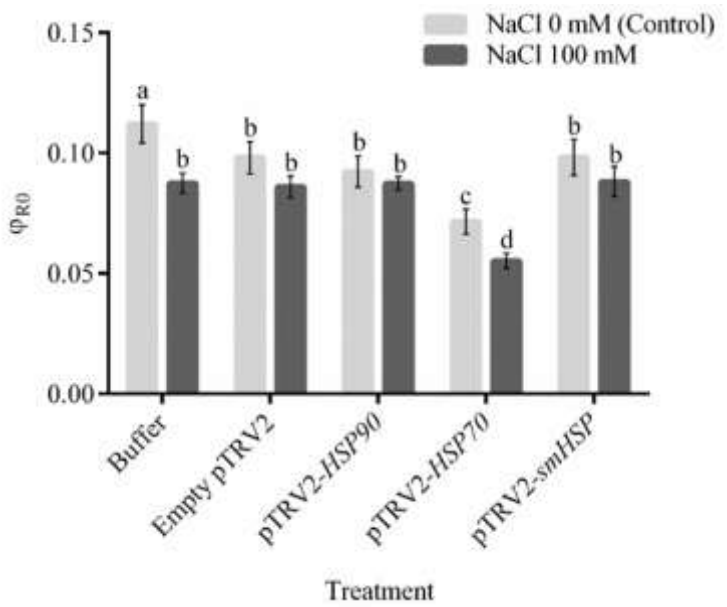

**شکل ۵- میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستمII ($\varphi_{E_0}$) گیاه *N. benthamiana* پس از خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl. مقادیر میانگین سه تکرار است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار ($P<0.05$) می‌باشد.**

خاموش سازی ژن‌های *HSP* سبب کاهش در میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II شده است به طوریکه در گیاه آلوده شده با وکتور pTRV2-*HSP70* کاهش ۲۶ درصدی مشاهده می‌شود. اعمال تنش شوری در محیط کشت نیز سبب تأثیر بیشتر خاموش سازی ژن‌ها بر میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II در این تیمارها شده به طوریکه در گیاه آلوده شده با وکتور pTRV2-*HSP70* پس از اعمال تنش شوری نسبت به سایر تیمارها کاهش بیشتری (کاهش ۳۰ درصدی) در میزان شاخص $\varphi_{E_0}$ مشاهده می‌شود.

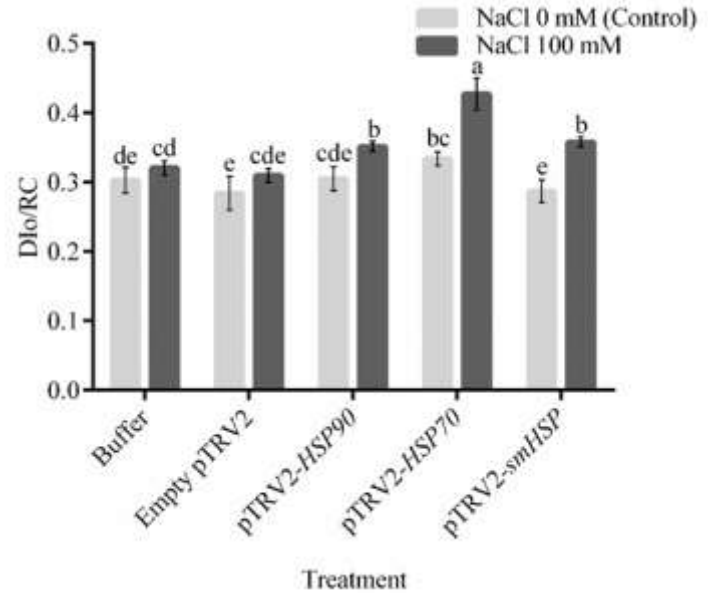
**بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* پس از اعمال تنش شوری بر میزان احیای پذیرنده‌های انتهایی در سمت پذیرنده الکترون فتوسیستم I ($\varphi_{R_0}$) گیاه *N.benthamiana*:** همانطور که در شکل ٦ مشاهده می‌شود، در گیاهان تنباکو که با وکتور خالی pTRV2 و وکتورهای نوترکیب pTRV2-*HSP90*، pTRV2-*HSP70* و pTRV2-*smHSP* آلوده شده‌اند، میزان شاخص $\varphi_{R_0}$ کاهش معنی داری نسبت به گیاه شاهد نشان می‌دهد و بیشترین کاهش در گیاهانی که ژن *HSP70* در آنها خاموش سازی شده است (۳٦ درصد کاهش نسبت به گیاه شاهد) مشاهده شد. با اعمال تنش شوری میزان این شاخص در تمامی تیمارها کمی کاهش نشان داد ولی تنها در گیاه خاموش سازی شده با pTRV2-*HSP70* این کاهش معنی دار بود.

**بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* پس از اعمال تنش شوری بر میزان اتلاف انرژی در کل مراکز واکنش نسبت به مراکز فعال واکنش ($DI_O/RC$) گیاه *N.benthamiana*:** بررسی میزان اتلاف انرژی در کل مراکز واکنش نسبت به مراکز فعال واکنش ($DI_O/RC$) در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl در گیاهان *N.benthamiana* که تحت تیمارهای مختلف خاموش سازی قرار گرفته‌اند، نسبت به گیاه شاهد (محلول بافر به آنها تزریق شده) و گیاهی که وکتور ویروسی pTRV2 به آنها وارد شده است (کنترل منفی) نشان می‌دهد (شکل ۷) که در وضعیت کنترل (بدون اعمال تنش شوری) گیاهان تیمار شده با

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]



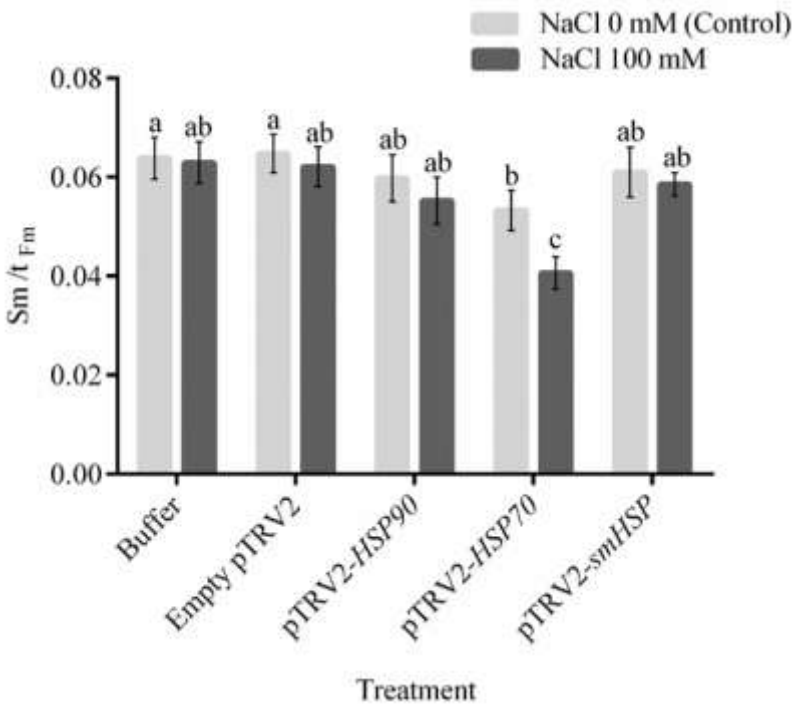

**شکل ٦- میزان احیای پذیرنده‌های انتهایی در سمت پذیرنده الکترون فتوسیستم I ($\varphi_{R_0}$) گیاه *N. benthamiana* پس از خاموش سازی ژن های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl. مقادیر میانگین سه تکرار است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار (P<0.05) می‌باشد.**




**شکل ۷- میزان اتلاف انرژی در کل مراکز واکنش نسبت به مراکز فعال واکنش ($DI_O/RC$) گیاه *N. benthamiana* پس از خاموش سازی ژن های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl. مقادیر میانگین سه تکرار است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار (P<0.05) می‌باشد.**

pTRV2، pTRV2-*HSP90* و pTRV2-*smHSP* تفاوت معنی داری را در میزان اتلاف انرژی در کل مراکز واکنش نسبت به مراکز فعال واکنش نسبت به گیاه شاهد نشان نداده و تنها گیاهانی که با وکتور خاموش سازی حاوی ژن *HSP70* آلوده شده بودند افزایش ۹ درصدی را در این شاخص نسبت به گیاه شاهد نشان می‌دهند. این در حالی است که پس از اعمال تنش شوری میزان اتلاف انرژی در کل مراکز واکنش در گیاهان تنباکو که در آنها ژن‌های *HSP* مورد خاموش سازی قرار

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]




**شکل ۸- میانگین فعالیت انتقال الکترون در فتوسیستم II ($Sm/t_{Fm}$) گیاه *N. benthamiana* پس از خاموش سازی ژن های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl. مقادیر میانگین سه تکرار است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار ($P<0.05$) می‌باشد.**

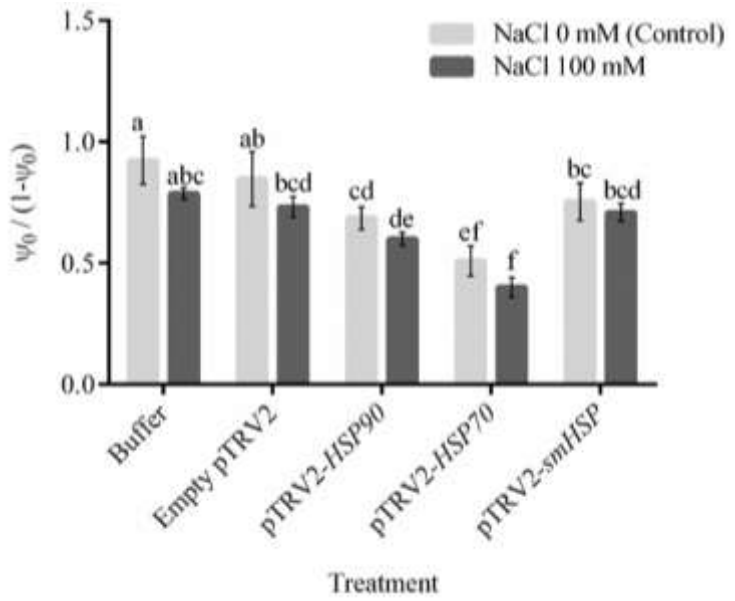
گرفته افزایش معنی داری را نسبت به گیاه شاهد نشان داده به طوریکه بیشترین افزایش متعلق به گیاهان تیمار شده با pTRV2-*HSP70* می‌باشد که افزایش ۲۵ درصدی را نسبت به گیاه شاهد نشان می‌دهند.

**بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* پس از اعمال تنش شوری بر میانگین فعالیت انتقال الکترون در فتوسیستم II ($Sm/t_{Fm}$) گیاه *N.benthamiana*:** مقایسه روند تغییرات شاخص $Sm/t_{Fm}$ نشان می‌دهد که خاموش سازی ژن *HSP70* در تنباکو بیشترین کاهش را در میانگین فعالیت انتقال الکترون در فتوسیستم II ($Sm/t_{Fm}$) نسبت به سایر تیمارها داشته و این کاهش ۱۶/۵ درصد در شرایط کنترل و ۳۵/۵ درصد پس از اعمال تنش شوری نسبت به گیاه شاهد می‌باشد. در سایر تیمارها تفاوت معنی داری در شاخص $Sm/t_{Fm}$ نسبت به گیاه شاهد در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار نمک مشاهده نشد (شکل ۸).

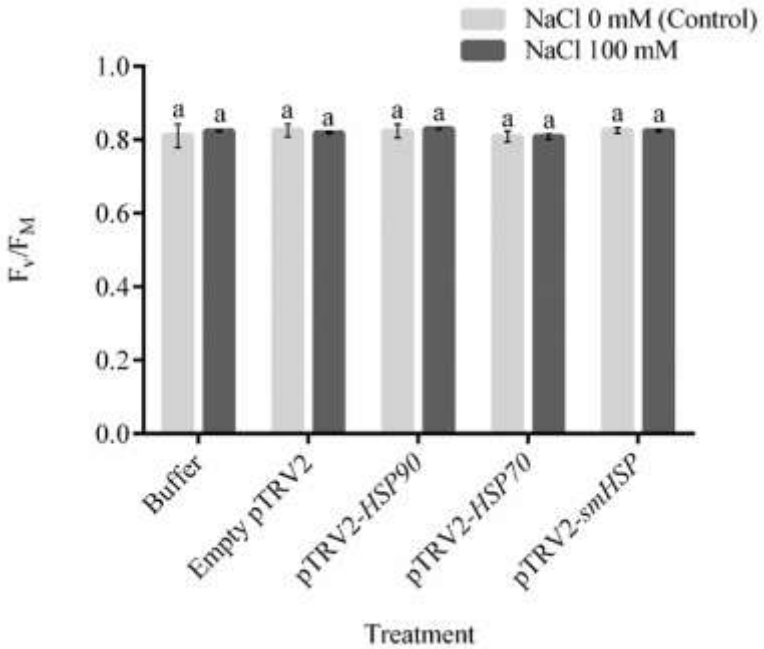
**بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* پس از اعمال تنش شوری بر کارایی واکنش‌های بیوشیمیایی در فتوسیستم II ($\psi_o/(1-\psi_o)$) گیاه *N.benthamiana*:** نمودار مربوط به بررسی روند تغییرات شاخص $\psi_o/(1-\psi_o)$ (کارایی واکنش‌های بیوشیمیایی در فتوسیستم II) در گیاهان *N.benthamiana* که ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها خاموش سازی شده است، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl نشان می‌دهد که خاموش سازی ژن‌های *HSP* سبب کاهش در میزان کارایی واکنش‌های بیوشیمیایی در فتوسیستم II شده است (شکل ۹)، در حالی که در گیاه آلوده شده با pTRV2-*HSP70* کمترین کاهش نسبت به گیاه شاهد در وضعیت کنترل و پس از اعمال تنش شوری (به ترتیب ٤٥ و ٥٠ درصد کاهش) در میزان این شاخص نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد.

**بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* پس از اعمال تنش شوری بر حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II ($F_V/F_M$) گیاه *N.benthamiana*:**

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]




**شکل ۹- کارایی واکنش‌های بیوشیمیایی در فتوسیستم II ($\psi_0/(1-\psi_0)$) گیاه *N. benthamiana* پس از خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl. مقادیر میانگین سه تکرار است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار (P<0.05) می‌باشد.**

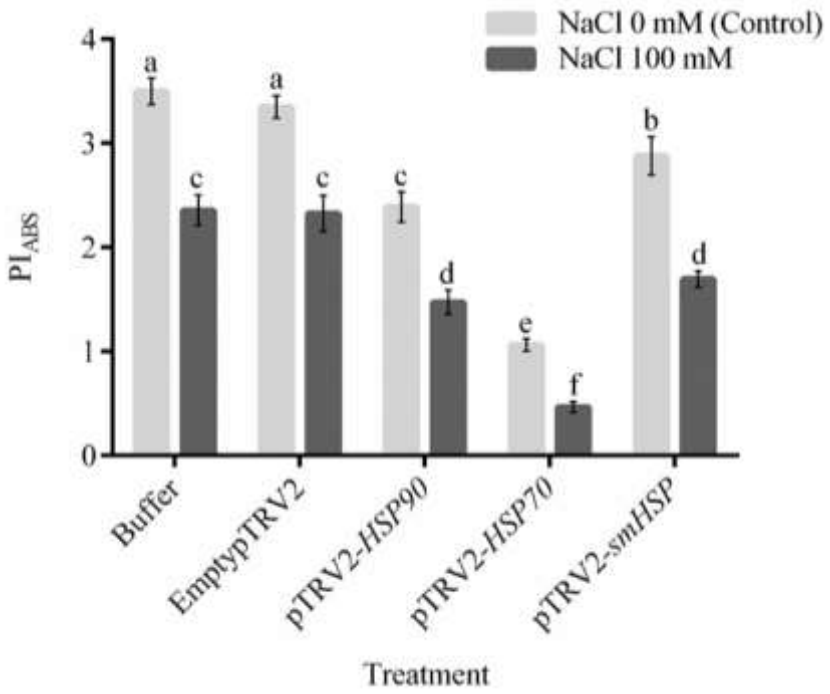



**شکل ۱۰- حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II ($F_V/F_M$) گیاه *N. benthamiana* پس از خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl. مقادیر میانگین سه تکرار است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار (P<0.05) می‌باشد.**

مقایسه روند تغییرات شاخص $F_V/F_M$ (حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II) در شکل ۱۰ نشان می‌دهد که پس از آلوده سازی گیاهان تنباکو با وکتور ویروسی pTRV2 و وکتور های نوترکیب pTRV2-*HSP90*، pTRV2-*HSP70* و pTRV2-*smHSP* هیچ تفاوتی در شاخص $F_V/F_M$ نسبت به گیاه شاهد مشاهده نشد.

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]




**شکل ۱۱- شاخص کارایی فتوسنتزی از ابتدای فتوسیستم II تا ابتدای فتوسیستم I ($PI_{ABS}$) گیاه *N. benthamiana* پس از خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در آنها، در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl. مقادیر میانگین سه تکرار است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار ($P<0.05$) می‌باشد.**

**بررسی اثر خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* پس از اعمال تنش شوری بر شاخص کارایی فتوسنتزی از ابتدای فتوسیستم II تا ابتدای فتوسیستم I ($PI_{ABS}$) گیاه *N.benthamiana*:** بررسی تأثیرات خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه کور در گیاهان *N.benthamiana* و در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl بر روند تغییرات شاخص $PI_{ABS}$ در شکل ۱۱ نشان داده شده است. همانطور که در نمودار مشاهده می‌شود، خاموش سازی ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* به ترتیب سبب کاهش ۳۲، ۷۰ و ۱۸ درصدی در شرایط کنترل و کاهش ۳۷/۵، ۸۰ و ۲۸ درصدی پس از اعمال تنش شوری نسبت به گیاه شاهد شده است.

## بحث

تنش‌های محیطی به روش‌های مختلفی می‌توانند رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند که یکی از مهمترین موارد آن تأثیر بر دستگاه فتوسنتزی است. که در این سیستم فتوسیستم II در گیاهان یکی از مکان‌های عمده‌ی آسیب پذیر در تنش‌ها به خصوص تنش شوری می‌باشد. از طرفی تنش‌های غیر زیستی سبب افزایش ساخت پروتئین‌های ناکارامد می‌شوند. چپرون‌های مولکولی پروتئین‌های تنشی هستند که بسیاری از آنها در ابتدا به عنوان Heat Shock Proteins (HSPs) شناخته می‌شدند. تحقیقات نشان می‌دهد که HSPs تنظیم کننده فولدینگ، تجمع، جایگیری و تجزیه پروتئین‌ها در تمامی گونه‌های گیاهی و جانوری است (Feder and Hofmann 1999). در میان انواع مختلف HSPs، HSP70 عملکرد مهمی را در ممانعت کردن از انباشتگی و کمک به فولد کردن مجدد پروتئین‌های غیر بومی تحت شرایط تنش زا دارد. در حالیکه smHSP ها به تنهایی قادر به فولد کردن مجدد پروتئین‌های غیر بومی نیستند بلکه کمپلکس‌هایی را با پروتئین‌های غیر فولد شده و دیگر HSP ها تشکیل می‌دهند. از طرفی HSP90 نیز در مدیریت کردن فولدینگ پروتئین‌ها نقش مهمی داشته و

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

در مسیرهای هدایت سیگنال، تجزیه پروتئین‌ها و کنترل تردد آنها نیز نقش دارد و در بسیاری از کمپلکس‌های چپرونی به HSP70 متصل شده و نقش خود را ایفا می‌کنند. بنابراین همانطور که بررسی‌ها نیز نشان می‌دهد کلاس‌های مختلفی از چپرون‌ها در همکاری با هم در حفاظت از سلول عمل کرده و نقش مکمل را برای یکدیگر بازی می‌کنند و گاهی اوقات در حفاظت از پروتئین‌ها در برابر تنش‌ها نقش پوشاننده را دارند (Wang *et al.*, 2004; Al-Whaibi 2011). در این پژوهش با کمک تکنیک خاموش سازی ژن با القاء ویروس (VIGS) تأثیر خاموش سازی موقت ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* جداسازی شده از گیاه کور که به طور هترولوگ در گیاه تنباکو خاموش گردیدند در طی تنش شوری بر روی فعالیت فتوسیستم II از طریق ارزیابی فلوئورسنس کلروفیل a مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که خاموش سازی ژن‌های *HSP90* و *smHSP* بر روی پارامترهای $F_V/F_o$، $DI_O/RC$، $Sm/t_{Fm}$ و $F_V/F_M$ تأثیری نداشته ولی از طرفی باعث کاهش معنی داری در پارامترهای $\psi_o$، $\varphi_{Eo}$، $\varphi_{Ro}$، $\psi_o/(1-\psi_o)$ و $PI_{ABS}$ شده است. بنابراین این نتایج اینگونه نشان می‌دهد که خاموش سازی این دو ژن *HSP90* و *smHSP* بر روی کمپلکس تجزیه آب و انتقال الکترون به فئوفایتین و $Q_A$ در فتوسیستم II اثری نداشته در حالیکه حساسیت گیاه به عدم فعالیت این پروتئین‌ها پس از این زمان یعنی در میزان انتقال الکترون از $Q_A$ به $Q_B$ و انتقال به زنجیره انتقال الکترون در فتوسیستم II و در نهایت میزان احیای آخرین پذیرنده الکترون در سمت پذیرنده‌های نهایی در فتوسیستم I صورت گرفته است. از طرفی نتایج نشان می‌دهد که خاموش سازی این دو ژن سبب افزایش اتلاف انرژی در سیستم نشده و میزان کارایی واکنش‌های نوری و میانگین فعالیت انتقال الکترون را تغییر نداده در حالیکه میزان کارایی واکنش‌های بیوشیمیایی و در نهایت میزان کارایی کل سیستم فتوسنتزی کاهش معنی داری را نشان داده است.

از طرفی نتایج حاصل از خاموش سازی ژن *HSP70* در گیاه تنباکو نشان می‌دهد که گیاه با کاهش معنی دار میزان کارایی کمپلکس تجزیه آب، میزان انتقال الکترون از $Q_A$ به $Q_B$، میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون در فتوسیستم II و میزان احیای آخرین پذیرنده الکترون در سمت فتوسیستم I واکنش شدیدی را نسبت به عدم فعالیت پروتئین HSP70 در گیاه نشان داده است. از طرفی با خاموش سازی ژن *HSP70* میانگین فعالیت انتقال الکترون و همچنین کارایی واکنش‌های بیوشیمیایی، نوری و در نهایت میزان کارایی فتوسنتزی از ابتدای فتوسیستم II تا ابتدای فتوسیستم I ($PI_{ABS}$) کاهش معنی داری را نشان داده است، در حالی که حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II ($F_V/F_M$) تفاوت معنی داری را با گیاه شاهد نشان نداده است. فاکتور $F_V/F_M$ همانطور که در نتایج نیز مشاهده می‌شود شاخص مناسبی جهت بررسی میزان کارایی سیستم فتوسنتزی در فتوسیستم II نیست. در این شاخص میزان کارایی فتوشیمیایی سیستم در نقطه پایانی نسبت به نقطه ابتدایی سنجیده می‌شود و نحوه فعالیت سیستم انتقال الکترون در حدفاصل این دو نقطه بررسی نمی‌گردد، بنابراین در بسیاری از پژوهش‌ها کمتر مورد توجه قرار می‌گیرد. از طرفی بررسی میزان اتلاف انرژی در کل مراکز واکنش نسبت به مراکز فعال واکنش (DIO/RC) در این گیاه افزایش مشخصی را نسبت به گیاه شاهد نشان داده است.

از طرفی بررسی میزان تأثیر تنش شوری بر گیاهانی که در آنها ژن‌های *HSP* خاموش سازی شده است، نشان می‌دهد که تنش شوری در گیاهان تنباکو که ژن‌های *HSP90* و *smHSP* در آنها خاموش گردیده است در هیچ یک از مراحل انتقال الکترون و همچنین میزان کارایی واکنش‌های بیوشیمیایی و نوری در فتوسیستم II تفاوت معنی داری را نسبت به وضعیت کنترل (بدون اعمال شوری) ایجاد نکرده است و تنها در میزان اتلاف انرژی در سیستم ($DI_O/RC$) و میزان شاخص کارایی کل فتوسنتزی ($PI_{ABS}$) تفاوت معنی داری را نسبت به وضعیت کنترل نشان می‌دهد. این در حالی است که در گیاهانی که در آنها ژن *HSP70* خاموش سازی شده است تنش شوری سبب کاهش معنی داری در کل مراحل انتقال الکترون در فتوسیستم II و میزان کارایی واکنش‌های نوری، بیوشیمیایی و در نهایت

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

$PI_{ABS}$ و از طرفی افزایش در میزان اتلاف انرژی نسبت به وضعیت کنترل شده است.

شاخص کارایی $PI_{ABS}$ (Performance index) یکی از مهمترین پارامترهای فلوئورسنس کلروفیل a می‌باشد، زیرا مجموعه‌ای از میزان جریان انرژی وارد شده به مراکز فتوسیستم II، بازده انتقال الکترون و تعداد مراکز واکنش فعال را نشان می‌دهد (Mereu *et al.*, 2011; Mehta *et al.*, 2010). بنابراین به عنوان یکی از حساس‌ترین پارامترهای فلوئورسنس به شرایط نامساعد محیطی مناسب جهت بررسی وضعیت گیاه تحت تنش‌های مختلف معرفی گردیده است (Oukarroum *et al.*, 2007; Zushi *et al.*, 2012; Živčák *et al.*, 2008). همانطور که نتایج نشان می‌دهد تنش شوری سبب کاهش میزان شاخص کارایی در تمامی تیمارها شده است لذا به نظر می‌رسد که میزان جریان انرژی و انتقال الکترون در مراکز فتوسیستم II و همچنین تعداد مراکز فعال واکنش در طی تنش شوری کاهش یافته است.

تا کنون مطالعه کمی در ارتباط با نقش ژن‌های *HSP* در ارتباط با هر یک از شاخص‌های فلوئورسنس کلروفیل a صورت گرفته است ولی با توجه به اثر پروتئین‌های HSP در حفاظت از سلول‌ها در برابر تنش‌های غیر زیستی از طریق حفاظت از پروتئین‌ها، غشاءها و دیگر ترکیبات سلولی و تسهیل تغییر یا تجزیه پروتئین‌های آسیب دیده به دنبال تنش‌های محیطی (Parsell and Lindquist 1994; Wang *et al.*, 2004)، کاهش هر یک از شاخص‌ها به دنبال خاموش سازی ژن‌های *HSP* می‌تواند قابل توجیه باشد.

در مطالعه‌ای بر روی میزان عملکرد فتوسیستم II در گیاه *Solidago altissima* به دنبال افزایش همزمان میزان نور و حرارت در محیط مشخص گردید که عملکرد فتوسیستم II به شدت کاهش یافته، از طرفی بیان ژن‌های *HSP70* و *smHSP* افزایش یافته است (Barua and Heckathorn 2006). در مطالعه دیگر بر روی پروتئین‌های DnaJ کلروپلاستی در گیاه *Lycopersicon esculentum* مشخص شده است که این پروتئین‌ها به عنوان چپرون‌های مولکولی به تنهایی و یا در ارتباط با پروتئین‌های HSP70 سبب ایجاد هومئوستازی پروتئینی و حفظ ثبات عملکردهای پروتئینی تحت شرایط تنش زا می‌شوند، نقش مهمی در حفظ فتوسیستم II، افزایش $F_V/F_M$ و افزایش میزان پروتئین D1 تحت تنش سرما دارند (Kong *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای دیگر بر روی مکانیسم‌های مؤثر در تعمیر فتوسیستم II تحت تنش‌های اکسیداتیو نوری در ارگانیسم‌های فتوسنتز کننده مثل *Dunaliella salina* مشخص شده است که HSP70 سبب استحکام کمپلکس‌های مجزا شده فتوسیستم II گردیده و در حذف و جایگزینی پروتئین D1 آسیب دیده مؤثر است (Yokthongwattana *et al.*, 2001; Schroda *et al.*, 2001; Schroda *et al.*, 1999; Theis and Schroda 2016). لذا با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان جمع بندی نمود که خاموش سازی موقت ژن‌های *HSP90*، *HSP70* و *smHSP* گیاه *Capparis spinosa* L در گیاه *N. benthamiana* تأثیرات متفاوتی را در میزان فلوئورسنس کلروفیل a در شرایط کنترل و شوری ۱۰۰ میلی مولار نمک ایجاد کرده است. در بین ژن‌های *HSP* مورد مطالعه، ژن *HSP70* نسبت به دو ژن دیگر اهمیت بیشتری داشته بطوریکه خاموش سازی آن در پاسخ به تنش شوری نسبت به دو ژن *HSP90*، و *smHSP* سبب کاهش بیشتری در کارایی سیستم فتوسیستم II در گیاه *N. benthamiana* گردید که نشان دهنده نقش مهم آن در حفظ کارایی فتوسیستم II در گیاهان درپاسخ به تنش شوری می‌باشد.

## منابع


Al-Whaibi, M. H. (2011) Plant heat-shock proteins: a mini review. Journal of King Saud University-Science 23:139-150.

Baker, N. R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. Annual Review of Plant Biology 59:89-113.

Bartley, G. E. and Scolnik, P. A. (1995) Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. The Plant Cell 7:1027.


[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

Barua, D. and Heckathorn, S. A. (2006) The interactive effects of light and temperature on heat-shock protein accumulation in *Solidago altissima* (Asteraceae) in the field and laboratory. American Journal of Botany 93:102-109.

De Maio, A. (1999) Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. Shock 11:1-12.

Downs, C. A., Ryan, S. L. and Heckathorn, S. A. (1999) The chloroplast small heat-shock protein: evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidative stress and photoinhibition. Journal of Plant Physiology 155:488-496.

Epstein, E. (1972) Mineral nutrition of plants; principles and perspective. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 132:158-159.

Feder, M. E. and Hofmann, G. E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology 61:243-282.

Gupta, B. and Huang, B. (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. International Journal of Genomics 2014:1-18.

Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K. and Chowdhuri, D. K. (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? Life sciences 86:377-384.

Heckathorn, S. A., Downs, C. A., Sharkey, T. D. and Coleman, J. S. (1998) The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. Plant Physiology 116:439-444.

Kalaji, H. M., Bosa, K., Kościelniak, J. and Żuk-Gołaszewska, K. (2011) Effects of salt stress on photosystem II efficiency and $CO_2$ assimilation of two Syrian barley landraces. Environmental and Experimental Botany 73:64-72.

Kong, F., Deng, Y., Zhou, B., Wang, G., Wang, Y. and Meng, Q. (2014) A chloroplast-targeted DnaJ protein contributes to maintenance of photosystem II under chilling stress. Journal of Experimental Botany 65 :143-158.

Lazár, D. (2009) Modelling of light-induced chlorophyll a fluorescence rise (OJIP transient) and changes in 820 nm-transmittance signal of photosynthesis. Photosynthetica 47:483-498.

Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S. and Bharti, S. (2010) Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves. Plant Physiology and Biochemistry 48:16-20.

Mereu, S., Gerosa, G., Marzuoli, R., Fusaro, L., Salvatori, E., Finco, A. Spano, D. and Manes, F. (2011) Gas exchange and JIP-test parameters of two Mediterranean maquis species are affected by sea spray and ozone interaction. Environmental and Experimental Botany 73:80-88.

Morimoto, R. I. and Santoro, M. G. (1998) Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. Nature Biotechnology 16:833-838.

Neta-Sharir, I. Isaacson, T. Lurie, S. and Weiss, D. (2005) Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. The Plant Cell 17:1829-1838.

Orcutt, D. M. (2000) The physiology of plants under stress: soil and biotic factors, vol 2. John Wiley & Sons. New York.

Oukarroum, A., El Madidi, S., Schansker, G and Strasser, R. J, (2007) Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. Environmental and Experimental Botany 60:438-446.

Parida, A. K. and Das, A. B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60:324-349.

Parsell, D. A and Lindquist, S. (1994) 18 heat shock proteins and stress tolerance. Cold Spring Harbor Monograph Archive 26:457-494.

Schroda, M., Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W., Vallon, O., Wollman, F. A. and Beck, C. (2001) Possible role for molecular chaperones in assembly and repair of photosystem II. Biochemical Society Transactions 29:413-418.

Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F. A. and Beck, C. F. (1999) A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. The Plant Cell 11:1165-1178.

Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. and Srivastava, A. (2004) Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Chlorophyll a Fluorescence. Springer, pp 321-362.

Strauss, A., Kruger, G., Strasser, R. and Van Heerden, P. (2006) Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient OJIP. Environmental and Experimental Botany 56:147-157.

Sugino, M., Hibino, T., Tanaka, Y., Nii, N. and Takabe, T. (1999) Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium Aphanothece halophytica acquires resistance to salt stress in transgenic tobacco plants. Plant Science 146:81-88.

Swindell, W. R., Huebner, M. and Weber, A. P. (2007) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. BMC genomics 8: 1-12

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]

Theis, J. and Schroda, M. (2016) Revisiting the photosystem II repair cycle. Plant Signaling and Behavior 11:e1218587

Usman, M. G., Rafii, M., Ismail, M., Malek, M., Latif, M. A., Oladosu, Y. (2014) Heat shock proteins: functions and response against heat stress in plants. Internationl Journal of Science and Technology Research 3:204-218.

Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. Annual Review of Plant Biology 42:579-620.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends in Plant Science 9:244-252.

Ye, S., Yu, S., Shu, L., Wu, J., Wu, A. and Luo, L. (2012) Expression profile analysis of 9 heat shock protein genes throughout the life cycle and under abiotic stress in rice. Chinese Science Bulletin 57:336-343.

Yokthongwattana, K., Chrost, B., Behrman, S., Casper-Lindley, C. and Melis, A. (2001) Photosystem II damage and repair cycle in the green alga *Dunaliella salina*: involvement of a chloroplast-localized HSP70. Plant and Cell Physiology 42:1389-1397.

Zivcak, M., Brestic, M., Olsovska, K. and Slamka, P. (2008) Performance index as a sensitive indicator of water stress in T*riticum aestivum* L. Plant, Soil and Environment 54:133-139.

Zushi, K., Kajiwara, S. and Matsuzoe, N. (2012) Chlorophyll a fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit. Scientia Horticulturae 148:39-46.

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.15.6 ]