

نقش کنترل منفی ژن شبه‌استریکتوسیدین سینتاز-۷ در مقاومت گیاه آرابیدوپسیس تالیانا به تنش شوری

پردیس قربانی سالکویه، محمدمهدی سوهانی* و امین عابدی

دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱ ویرایش: ۱۳۹۶/۴/۳ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۹ انتشار: ۱۳۹۷/۶/۲۹

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

مسئول مکاتبات: msohani@guilan.ac.ir

چکیده. ژن‌های شبه‌استریکتوسیدین سینتاز یک خانواده ژنی آرابیدوپسیس است که ژن‌های اورتولوگ آنها در بقیه گیاهان کدکننده آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتزی ایندول آلکالوئیدهای مونوترپن هستند. بیان ژن *SSL7* آرابیدوپسیس بلافاصله پس از تیمار با مولکول‌های پیام‌رسانی نظیر SA، متیل جازمونات و اتیلن القا می‌شود. در این آزمایش به منظور مطالعه کارکرد ژن شبه‌استریکتوسیدین سینتاز-۷ (*SSL7*) از ژنوتیپ وحشی گیاه آرابیدوپسیس تالیانا Col-0 (شاهد) و لاین سرکوب‌شده ژن *SSL7* (*ssl7*) از طریق درج T-DNA استفاده شد. تحلیل داده‌ها بر مبنای آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورها شامل دو ژنوتیپ و پنج سطح شوری شامل صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl بود. سرکوب ژن *SSL7* در جهش یافته *ssl7* با استفاده از qRT-PCR تأیید شد. بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش شوری شامل *NCED3*، *P5CS1*، *AAO3* و *RD29A* در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تیمار NaCl در غلظت ۱۵۰ mM نشان داد که چهار ژن مذکور در موتانت *ssl7* در هر دو زمان پس از تیمار میزان بیان بالاتری نسبت به مقدار بیان در ژنوتیپ Col-0 نشان دادند. میزان فعالیت تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های مختلف NaCl در هر دو ژنوتیپ اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در موتانت *ssl7* به طور معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بیشتر از Col-0 بوده است. برعکس، فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در موتانت کاهش یافت. بنابراین، نتایج نشان داد که ژن *SSL7* احتمالاً در مسیر مربوط به پاسخ به تنش شوری وابسته به سالیسیلیک اسید در گیاه آرابیدوپسیس نقش دارد و می‌تواند به طریق کنترل منفی عمل کند.

واژه‌های کلیدی. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، خاموشی ژن، ژنتیک معکوس، ژن‌های واکنش‌گر به تنش، لاین سرکوب شده T-DNA

Negative control of Strictosidine synthase-like 7 gene on salt stress resistance in *Arabidopsis thaliana* L.

Pardis Ghorbani Salkuyeh, Mohammad Mehdi Sohani* & Amin Abedi

Received 23.08.2016/ Revised 24.06.2017/ Accepted 21.10.2017/ Published 20.09.2018

Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

*Correspondent author: msohani@guilan.ac.ir

Abstract. Strictosidine synthase-like (*SSL*) is a group of gene families in the *Arabidopsis* genome, which whose orthologues in other plants are key enzymes in mono-terpenoid indole-alkaloid biosynthesis pathway. The *SSL7* is upregulated upon treatments of *Arabidopsis* plants with signaling molecules such as SA, methyl jasmonate and ethylene. To find the functional role of the gene, a T-DNA-mediated knockout mutant (*ssl7*) along with the wild type were treated with different concentrations of NaCl. The expression level of salt stress genes including *P5CS1*, *NCED3*, *AAO3* and *RD29A* at 150 mM NaCl demonstrated that the expression was significantly higher in *ssl7* compared with the expression in Col-0. The activities of Catalase (CAT), Ascorbate Peroxidase (APX), Peroxidase (POD) and Superoxide Dismutase (SOD) were measured in different concentrations of NaCl. The results suggested that the enzymes activities were significantly higher in *ssl7* compared with wild-type Col-0. In total, the results suggest that *SSL7* might have a salicylic acid-dependent negative regulatory role in plant resistance to salt stress.

Keywords. antioxidant enzymes, gene silencing, reverse genetics, stress-responsive gene, T-DNA knockout mutant

مقدمه

وجود تنش‌های زیستی و غیرزیستی عمل‌کرد گیاهان را کاهش می‌دهد و زیان‌های اقتصادی ایجاد می‌کند. از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی شامل خشکی، شوری، گرما، سرما و تنش‌های اکسیداتیو است (Shanker & Venkateswarlu, 2011). تنش شوری از طریق برهم‌زدن تعادل یونی، کاهش پتانسیل آب و سمیت یونی بر رشد گیاهان اثر می‌گذارد (Khan & Ungar, 2001).

آرابیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana* L.) متعلق به تیره کلمیان (Brassicaceae) دارای چندین صفت مهم است که آن را به یک ارگانسیم مدل مهم برای شناسایی ژن‌ها و تعیین عملکرد آنها تبدیل کرده است (Katam et al., 2011). ژنوم هسته‌ای آن کوچک و میزان DNA تکراری آن بسیار پایین است (The *Arabidopsis* genome initiative, 2000). علاوه بر این، انتشار توالی‌های کامل ژنوم، فرصتی برای انجام ژنتیک معکوس در مقیاس وسیع در این گیاه مدل ایجاد کرده است. روشی که در آن با انجام جهش در توالی یک ژن مشخص، نتیجه تغییرات در فنوتیپ ارگانسیم بررسی می‌شود (Krysan et al., 1999). در روش ژنتیک معکوس در صورت مشاهده فنوتیپ در یک جهش یافته می‌توان تغییر مذکور را مستقیم به عملکرد بیولوژیکی ژن تخریب شده مربوط دانست (Chalfun-Junior et al., 2003). در چند سال گذشته، چندین جمعیت موتانت آرابیدوپسیس با الحاق T-DNA (با استفاده از آگروباکتریوم) یا ترنسپوزون‌ها تولید شده‌اند. در این روش‌ها با تکیه بر واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) موتانت‌ها را برای تلفیق DNA خارجی در داخل ژن هدف غربال‌گری می‌کنند (Bouché & Bouchez, 2001).

بیش از ۲۰ درصد گیاهان گل‌دار دارای سطوح بالایی از آلکالوئیدها هستند. تاکنون بالغ بر دوهزار نوع آلکالوئید شناخته شده که فراوانی آن‌ها در بین گونه‌های گیاهی و حتی در درون بافت‌های گیاهی متنوع است. ایندول آلکالوئیدهای مونوترپن در درجه اول در تیره‌های خرزهره‌ایان (Apocynaceae)، لوگانیاسه (Loganiaceae) و روناسیان (Rubiaceae) و کمتر در تیره‌های دیگر متداول است. مونوترپن (MIAs) گروه متنوعی از متابولیت‌های ثانوی هستند که در محافظت گیاهی نقش دارند و به منزله دارو در درمان بیماری‌هایی مانند سرطان، مالاریا و آرتیمی استفاده

می‌شوند. متابولیت‌های ثانوی مانند آلکالوئیدها، امکان بقای گیاهان را در برابر طیف وسیعی از تنش‌ها فراهم می‌کنند. در میان آنزیم‌های مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای مونوترپن، تریپتوفان دی‌کربوکسیلاز و استریکتوسیدین سینتاز دو آنزیم کلیدی در تولید ایندول آلکالوئیدهای مونوترپن هستند. در آرابیدوپسیس تالیانا تولید ایندول آلکالوئیدهای مونوترپن شناخته شده نیست، اما ۱۵ ژن مشابه با ژن استریکتوسیدین سینتاز گل پریش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) در آن شناسایی شده است (Fabbri et al., 2000). تاکنون دومین‌های پروتئینی مشابه با توالی استریکتوسیدین سینتاز در ژنوم تقریباً در همه موجودات چندسلولی تعیین توالی شده، کشف شده است. نقش برخی از آنها مانند خانواده ژنی همومیوسین (*Hemomucin, HM*) در مگس سرکه در پاسخ‌های سیستم ایمنی حشرات و جانوران ثابت شده است. از میان چندین گروه مجزا از توالی‌های شبه‌استریکتوسیدین سینتاز (*Strictosidine Synthase Like, SSL*) در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا چهار ژن *SSL4-SSL7* شباهت بیشتری به ژن‌های همومیوسین مگس سرکه (*Drosophila melano-gaster*) و نماتد (*Caenorhabditis elegans*) نشان می‌دهند و به نام خانواده ژنی شبه‌همومیوسین (*Hemomucin Like, HML*) نامیده شده‌اند و به صورت پشت سر هم روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارند. همومیوسین مگس سرکه معرف یک پروتئین لنگرانداخته غشایی با یک دومین میوسین است، در حالی که ژن‌های گیاهی و جانوری دیگر پروتئین‌های محلول هستند (Sohani et al., 2009).

برای بررسی نقش احتمالی ژن‌های *SSL4-SSL7* در سیستم دفاعی گیاه آرابیدوپسیس الگوی بیانی این ژن‌ها هنگام زخم، تیمار با مولکول‌های پیام‌رسان دفاعی و پاتوژن بررسی شد (Sohani et al., 2009). مقدار بیان ژن *SSL7* در تمامی تیمارهای انجام شده شامل قارچ *Alternaria brassicicola* سالیسیلیک اسید و ویروس CMV تغییرات معنی‌داری داشته است و در میان چهار ژن تحت مطالعه بیشترین بوده است. بنابراین، به نظر می‌رسد این ژن در واکنش‌های دفاعی گیاه اهمیت بیشتری دارد. در این تحقیق، به منظور بررسی نقش کارکردی ژن *SSL7* در پاسخ گیاه آرابیدوپسیس به تنش شوری از جهش یافته T-DNA (*ssl7*) استفاده شد که ژن *SSL7* در آن سرکوب شده است. طی

گیاهان آرابیدوپسیس در گلدان کشت شدند و چهار هفته بعد جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تیمار شوری قرار گرفتند. تنش شوری با اضافه کردن محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف NaCl (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی-مولار) انجام شد. چهار روز پس از قرارگرفتن گیاهان آرابیدوپسیس در معرض تنش، نمونه‌های برگ‌ی تهیه و در ازت مایع منجمد و سپس به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد (Xin et al., 2014).

جهت بررسی بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش شوری، تیمار گیاهان ۱۰ روز پس از رشد در محیط ۱/۲MS انجام گرفت. کاغذهای واتمن در محیط کشت مایع ۱/۲MS حاوی یک درصد ساکارز و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl اشباع‌شده و در داخل پتری‌دیش قرار گرفتند. گیاهچه‌ها به آرامی بدون آسیب دیدن ریشه‌ها از محیط قبلی با کمک پنس جدا و به پتری‌های حاوی NaCl منتقل شدند (Xiong et al., 2001). در زمان‌های صفر، ۳ و ۶ ساعت پس از انتقال به وضعیت تنش، نمونه‌برداری صورت گرفت و پس از انجماد در ازت مایع به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. جهت بررسی بیان ژن *SSL7* در موتانت *ssl7* از گیاهچه‌های چهارهفته‌ای کشت‌شده در گلدان استفاده شد.

بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان تیپ وحشی و جهش یافته

به منظور استخراج عصاره آنزیمی، برگ‌های فریزشده در ازت مایع خرد، ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (بافر استخراج) به آن اضافه و ورتکس و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ساترنفیوژ شدند. عصاره روی شناور برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز (CAT، Catalase)، پراکسیداز (POD، Peroxidase)، پراکسیداز (APX، Ascorbate peroxidase) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD، Superoxide) استفاده و جمع‌آوری شد (Beauchamp & Fridovich, 1971).

جهت سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم POD مقدار ۴۵۰ میکرولیتر بافر H_2O_2 ۵ میلی‌مولار و ۴۵۰ میکرولیتر بافر گایاکول ۲۸ میلی‌مولار در دمای پایین (ظرف حاوی یخ) با هم مخلوط و به آن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. منحنی جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت

این تحقیق فعالیت تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و الگوی القای ژن‌های واکنشگر به شوری در گیاهان ژنوتیپ جهش‌یافته نسبت به گیاهان تیپ وحشی اندازه‌گیری شد. تاکنون هیچ مطالعه‌ای درخصوص ارتباط ژن *SSL7* و مقاومت به تنش شوری گزارش نشده است. این تحقیق اولین گزارش در باره تأثیر منفی ژن *SSL7* در پاسخ به تنش شوری و افزایش تحمل گیاه آرابیدوپسیس در مقابل این تنش در صورت سرکوب بیان ژن *SSL7* است.

مواد و روش‌ها

ژنوتیپ‌های گیاهی مورد استفاده

در این تحقیق از ژنوتیپ وحشی Col-0 گیاه آرابیدوپسیس و لاین سرکوب‌شده ژن *SSL7* (*ssl7*) از طریق درج T-DNA با زمینه‌ی اکوتایپ Col-0 با شماره دسترسی SALK-041885 اهدایی مؤسسه SALK استفاده شد. براساس اطلاعات به‌دست‌آمده از سایت مؤسسه SALK (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) تلفیق T-DNA در مجاورت نوکلئوتید شماره ۸۳۵ و به‌صورت Plus/Minus است (شکل ۱).

شرایط رشد گیاهان

جهت کشت گیاهان در محیط درون‌شیشه‌ای (*in vitro*) ابتدا بذرها با محلول هیپوکلریدسدم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرحله با آب استریل آب‌شویی شدند. بذرها ضدعفونی‌شده ابتدا در محیط کشت ۱/۲ MS حاوی یک درصد ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار کشت و سپس به مدت سه روز جهت شکستن خواب و جوانه‌زنی یک‌دست بذرها در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در مرحله بعد به اتاقک رشد انتقال یافتند.

جهت کشت گیاهان در گلدان (*in vivo*) ابتدا مقدار بذر لازم از هر ژنوتیپ را خیسانده و به مدت سه روز سرمادهی شد. ترکیب خاکی ورمی کمپوست، پیت‌ماس - پرلیت ترکیبی و ورمی‌کولیت با نسبت به ترتیب ۱:۲:۲ استفاده شد. آبیاری گیاهان هر چهار روز یکبار و از کف گلدان‌ها انجام گرفت. محیط رشد گیاهان در هر دو روش کشت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نوری $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ در داخل اتاقک رشد تنظیم شد.

تیمار شوری گیاهان

بررسی بیان ژن‌های واکنشگر به تنش شوری

استخراج RNA از نمونه‌های گیاهی مطابق دستورالعمل کیت RNX-plus™ انجام شد. کنترل کیفی و کمی نمونه‌های RNA به-ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه طیف‌سنج نوری انجام شد. نمونه‌های RNA استخراج‌شده با DNaseI (Thermo Fisher) تیمار شدند تا DNA ژنومی حذف شود. با استفاده از پرایمر Oligo dT و کیت سنتز cDNA (Thermo Fisher) از RNA رشته DNA مکمل (cDNA) ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی ژن‌های P5CS1 (-5-pyrroline-Δ1-Responsive to RD29A)، (carboxylate synthase abscisic-aldehyde) AAO3، (Desiccation 29A oxidase) NCED3، (-9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) ACT2 (actin 2) برای واکنش Real time PCR با استفاده از نرم‌افزار Primer3 ([http:// primer3.uw.edu](http://primer3.uw.edu)) طراحی شدند (جدول ۱). هر واکنش Real Time PCR شامل یک میکرولیتر cDNA رقیق‌شده (نسبت ۱ به ۱۰) ۰/۳ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۳ میکرومولار، ۶/۲۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher) و آب تا حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر اضافه شد. ژن مرجع ACT2 (AT3G18780) جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. از دستگاه Bio-Rad CFX96 جهت انجام واکنش Real Time PCR و از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای تحلیل داده‌ها استفاده شد (Livak & Schmittgen, 2001).

طرح آزمایشی و تحلیل آماری

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در اتاقک رشد PC2 آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای این آزمایش شامل ژنوتیپ‌های تیپ وحشی Col-0 و جهش‌یافته *ssl7* و تیمار شوری در پنج سطح غلظت NaCl (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) بود. تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS9.0 انجام شد و نتایج توسط آزمون مقایسه میانگین LSD ارزیابی و نمودارهای مربوط با استفاده از نرم‌افزار Excel2007 ترسیم شد.

نتایج و بحث

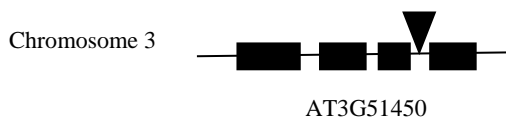
بررسی میزان بیان ژن *SSL7* در موتانت T-DNA سرکوب‌شده

شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی گایاکول پراکسیداز $26/6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه شد (Amako et al., 1994).

فعالیت کل آنزیم SOD با اندازه‌گیری توانایی جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (-Nitroblue; NBT; Beauchamp & Fridovich, 1971) تعیین شد. بافر یک شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ mM و نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۷۵ μM با pH برابر ۷ و سپس بافر دو شامل بافر ریوفلاوین ۰/۱۲ mM تهیه شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، نمونه بلائک به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و نمونه‌های کنترل و عصاره آنزیمی به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر نوری با دمای ۲۰ درجه سانتی-گراد و دارای دو عدد لامپ فلورسنت W ۴۰ با شدت ۱۰۰ دور در دقیقه به هم‌زده شدند. جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. یک واحد SOD به مقدار آنزیمی گفته می‌شود که سبب مهار ۵۰ درصد NBT به فورمازان (Formazan) شود.

جهت سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم APX از بافر اندازه‌گیری حاوی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار و H_2O_2 ۱۰ میلی‌مولار استفاده شد. در کووت نمونه ۹۸۰ میکرولیتر بافر اندازه‌گیری و ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی اضافه شد و پس از به هم‌زدن، سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب بر زمان (OD/min) در طول موج ۲۹۰ nm به مدت یک دقیقه ثبت شد. تغییرات جذب بر زمان به ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ تقسیم و فعالیت آنزیمی محاسبه شد (Nakano & Asada, 1987).

جهت سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم CAT از بافر اندازه‌گیری حاوی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و H_2O_2 ۱۵ میلی‌مولار استفاده شد. در کووت نمونه از ۶۵۰ میکرولیتر بافر فسفات، ۱۰۰ میکرولیتر بافر اندازه‌گیری و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. به منظور سنجش فعالیت این آنزیم از طریق اندازه‌گیری تجزیه آب‌اکسیژنه توسط اسپکترو-فتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای ۱ دقیقه انجام شد. فعالیت آنزیمی با ضریب خاموشی $40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه شد (Dhindsa & Matowe, 1981).



شکل ۱- ساختار ژن SSL7. جایگاه درج T-DNA در موتانت *ssI7* با مثلث نشان داده شده است. آگزون به صورت باکس‌های سیاه و اینترون به صورت خط نشان داده شده است.

Fig. 1. Structure of the SSL7 gene. The insertion of T-DNA in the *ssI7* mutant is shown as a triangle. Exons are shown as black boxes and introns as thin lines.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ژن‌های واکنشگر به تنش شوری در گیاه *Arabidopsis thaliana*

Table 1. List of specific primers used for amplification of some salt stress in *Arabidopsis thaliana*.

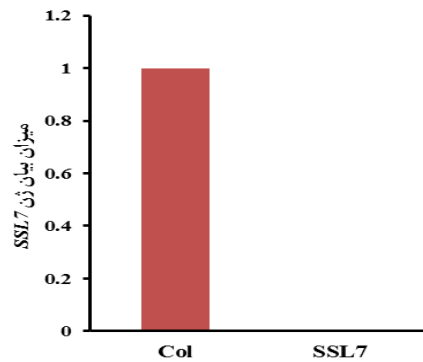
نماد ژن	شماره دسترسی بانک ژن	پرایمر رفتی	پرایمر معکوس	طول محصول (جفت باز)
<i>P5CSI</i>	AT2G39800	GCACACACAGACTGCATTGT	CGACTGGACCACGAGCAT	178
<i>RD29A</i>	AT5G52310	ACGACGACAAAGGAAGTGGGA	AATGTGGCGATTCTGGCTTC	163
<i>AAO3</i>	AT2G27150	GTTCTCTCCTCCAAAGCGTC	CCGCAAAGAGACTTCACCAC	185
<i>NCED3</i>	AT3G14440	CGGAGAAGGAGGAGAGGAAG	GCTCCGATGAATGTACCGTG	168
<i>ACT2</i>	AT3G18780	CTTGTTCCAGCCCTCGTTTG	CGATACCTGAGAACATAGTGG	149
<i>SSL7</i>	AT3G51450	ATCGCGTACTACCATGATCCAAA	TCAGGAGATCAAGTCGGAGGATA	115

ژنوتیپ Col-0 ۰/۰۹۶ و در جهش یافته *ssI7* برابر ۰/۵۰۵ به دست آمد. بیشترین تفاوت فعالیت آنزیم POD بین دو ژنوتیپ در سطح غلظت ۱۵۰ mM و کمترین تفاوت فعالیت این آنزیم در دو ژنوتیپ در سطح غلظت ۱۰۰ mM بوده است (شکل ۳). در نتیجه فعالیت بالاتر POD در سطوح غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار احتمالاً به دلیل تولید ROS بالاتر در این سطح غلظت‌ها و فعالیت نکردن بقیه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با عمل تقریباً مشابه مانند CAT و APX است (Parida & Das, 2005). بررسی و تحلیل داده‌های حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) در گیاهچه‌های جهش یافته *ssI7* و تیپ وحشی Col-0 تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل ژنوتیپ‌ها در تنش شوری نشان دادند (جدول ۲). بیشترین فعالیت آنزیم SOD در ژنوتیپ جهش یافته *ssI7* و در سطح غلظت ۱۰۰ mM و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در سطح غلظت ۲۰۰ mM در ژنوتیپ Col-0 مشاهده شد. فعالیت SOD در سطح غلظت ۱۰۰ mM در ژنوتیپ تیپ وحشی Col-0 و جهش یافته *ssI7* به ترتیب برابر ۱۴/۳۱ و ۴۲/۳۷ شد. در غلظت ۱۵۰ mM در ژنوتیپ‌های تیپ وحشی و جهش

بر اساس نتایج واکنش Real Time-PCR، ورود T-DNA به داخل ژن *SSL7* موجب سرکوب بیان این ژن به میزان ۰/۰۰۵۲ در گیاه چهار هفته‌ای جهش یافته *ssI7* در مقایسه با بیان ژن مذکور در ژنوتیپ وحشی شده است. این نتیجه تأیید کرد که درج T-DNA در *SSL7* سبب خاموشی ژن و سرکوب بیان آن در ژنوتیپ جهش یافته شد (شکل ۲).

بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

در این تحقیق، تأثیر خاموشی ژن *SSL7* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان POD، SOD، APX و CAT بررسی شد. بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) نشان داد که ژنوتیپ‌ها و پیامدهای متقابل ژنوتیپ‌ها در تنش شوری تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد داشته‌اند (جدول ۲). بیشترین فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ جهش یافته *ssI7* در سطح غلظت ۱۵۰ mM و کمترین میزان فعالیت POD مجدداً در ژنوتیپ جهش یافته *ssI7* در سطح غلظت ۵۰ mM مشاهده شد. فعالیت آنزیم POD در سطح غلظت صفر در ژنوتیپ تیپ وحشی Col-0، ۰/۱۱۷ و در *ssI7*، ۰/۲۳۲ بوده است. در غلظت ۵۰ mM میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ‌های تیپ وحشی و جهش یافته به ترتیب برابر ۰/۱۷۹ و ۰/۰۵۲ بود. در غلظت ۱۵۰ mM فعالیت POD



شکل ۲- بیان نسبی ژن *SSL7* با استفاده از Real-Time PCR. در ژنوتیپ ناک اوت جهش یافته‌ی *ssl7* مقدار بیان ۰/۰۰۷۵ مقدار آن در ژنوتیپ تیپ وحشی Col-0 بوده است که خاموشی این ژن را در گیاهچه‌های جهش یافته را نشان می‌دهد.

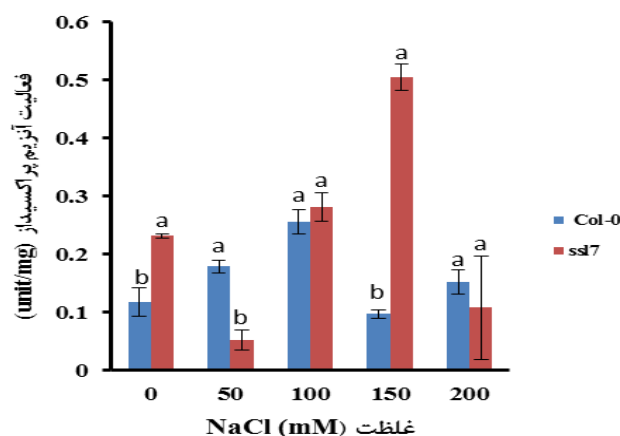
Fig. 2. Relative transcription level of *SSL7* using Real-Time PCR. The transcription level in *ssl7* mutant was 0.0075 times less than the transcription of the gene in wild-type Col-0. The result confirms down-regulation of *SSL7* in the mutant.

جدول ۲- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ژنوتیپ‌های جهش یافته *ssl7* و تیپ وحشی Col-0 تحت تنش شوری.

Table 2. Analysis of variance of antioxidant enzymes activity in *ssl7* mutant and wild-type Col-0 under salt stress.

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییرات
CAT	APX	SOD	POD		
۰/۰۰۲۷ ^{ns}	۰/۰۰۶۱ ^{**}	۱۲۹۸/۸۰۴ ^{**}	۰/۰۴۲۵ ^{**}	۱	ژنوتیپ
۰/۰۰۶۴۱ ^{**}	۰/۰۰۳۰۷ ^{**}	۵۶۸/۳۹ ^{**}	۰/۰۴۱ ^{**}	۴	تیمار
۰/۰۰۲۷ [*]	۰/۰۰۲۹۶ ^{**}	۲۵۸/۰۱۲ ^{**}	۰/۰۶۳۸ ^{**}	۴	ژنوتیپ × تیمار
۰/۰۰۸۹	۰/۰۰۰۵۲	۵۵/۱۱	۰/۰۰۳۳	۲۰	خطای آزمایش
				۲۹	کل

** معنی‌داری در سطح ۱٪، * معنی‌داری در سطح ۵٪، ^{ns} عدم معنی‌داری
** Significant in 1%; * Significant in 5%; ns: Not significant



شکل ۳- فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در پاسخ به تنش شوری. گیاهان با طول عمر ۴ هفته که به مدت ۴ روز در معرض غلظت‌های مختلف NaCl (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار) قرار گرفتند و سپس فعالیت آنزیم POD در گیاهان جهش یافته *ssl7* و تیپ وحشی Col-0 اندازه‌گیری شد.

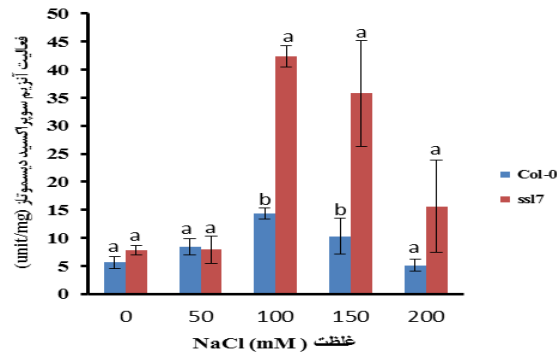
Fig. 3. Peroxidase enzyme activity (POD) in response to salt stress. Four-week old plants were subjected to different NaCl concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mM) for 4 days and POD enzyme activities were measured in the wild-type (Col-0) and *ssl7* mutant.

را غیرفعال و به اجزای سلولی آسیب‌های جدی وارد می‌کنند. افزایش تولید مشتقات سمی اکسیژن یکی از ویژگی‌های کلی و مشترک در تنش به‌خصوص تنش شوری است. در گیاهان و دیگر موجودات طیف گسترده‌ای از سازوکارها در مقابله با تنش‌ها تکامل یافته است (Arora et al., 2002). گیاهان دارای دو نوع از سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، با آنزیم‌های بسیار کارآمد (سوپراکسیددیسموتاز SOD، کاتالاز CAT، آسکوربات-پراکسیداز APX، پراکسیداز POD، گلوکاتایون ردوکتاز GR، مونودی‌هیدروآسکوربات‌ردوکتاز MDHAR، دهیدرو-آسکوربات‌ردوکتاز DHAR، گلوکاتایون‌پراکسیداز GPX، گایاکول‌پراکسیداز GOX و گلوکاتایون-S-ترنسفرز GST) و غیر آنزیمی (آسکوربیک اسید ASH، گلوکاتایون GSH، ترکیبات فنولی، آلکالوئیدها، آمینواسیدهای غیرپروتئینی و یک-توکوفرول) هستند که هماهنگ با کنترل آبخاری اکسید و احیای بی‌رویه عمل می‌کنند و از سلول‌های گیاهی در برابر صدمات اکسیداتیو با مهار ROS محافظت می‌کنند (Gill & Tuteja, 2010). بنابراین، ممکن است تحمل تنش گیاهی، با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بهبود یابد. گیاهان جهش‌یافته ایزاری برای درک کامل نقش آنزیم‌های دخیل در حفاظت در برابر انواع بسیاری از تنش‌های زیست‌محیطی و القایی هستند. مطالعه گیاهان تراریخت بیان‌کننده افزایش فعالیت آنزیم‌های واحد سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان نشان می‌دهد که یک درجه‌ای از تحمل به تنش کسب می‌شود (Arora et al., 2002).

بررسی میزان بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش

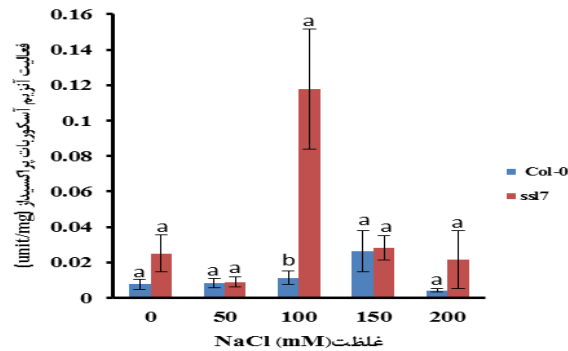
میزان نسبی بیان ژن *P5CS1* به مدت ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری در ۱۵۰ mM NaCl، در ژنوتیپ تیپ وحشی Col-0 به ترتیب ۸/۱۳۸ و ۹/۱۹۵ برابر شده است اما، در جهش یافته‌ی *ssl7* میزان بیان این ژن ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تیمار به ترتیب ۲۹/۲۰۶ و ۱۱/۸۴۳ برابر بوده است (شکل ۷). بسیاری از گیاهان سنتر و تجمع پرولین را در پاسخ به تنش اسمری انجام می‌دهند. یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز پرولین، آنزیم دو عمل کردی ۱- پرولین-۵-کربوکسیلات سینتاز (*P5CS*) است که شامل دو دومین کاتالیتیک عمل کردی، γ - گلوتامیک کیناز و گلوتامیک- γ - سمی آلدهید دهیدروژناز است. این آنزیم در مرحله اول مسیر بیوسنتز پرولین را کاتالیز می‌کند و نقش مرکزی را در تنظیم این

یافته میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب برابر ۱۰/۲۸ و ۳۵/۷۹ به دست آمد. بیشترین تفاوت در فعالیت این آنزیم در دو ژنوتیپ در سطح غلظت ۱۵۰ mM و کمترین تفاوت در سطح غلظت ۵۰ میکرومولار وجود داشت (شکل ۴). تجزیه داده‌های به دست آمده با بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در گیاهچه‌های جهش‌یافته *ssl7* و تیپ وحشی Col-0 تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و در اثر متقابل ژنوتیپ‌ها در تنش شوری در سطح احتمال ۱ درصد نشان دادند (جدول ۲). حداکثر میزان فعالیت آنزیم APX در ژنوتیپ جهش‌یافته *ssl7* در سطح غلظت ۱۰۰ mM NaCl و کمترین فعالیت این آنزیم در سطح غلظت ۲۰۰ mM NaCl در ژنوتیپ تیپ وحشی Col-0 وجود داشت. در سطح غلظت ۱۰۰ mM فعالیت APX در ژنوتیپ‌های تیپ وحشی و جهش‌یافته به ترتیب برابر ۰/۱۱۷ و ۰/۱۱۲ شد. بیشترین و کمترین تفاوت میزان فعالیت آنزیم APX بین دو ژنوتیپ به ترتیب در سطح غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌مولار تیمار شوری مشاهده شد (شکل ۵). فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در غلظت‌های مختلف NaCl در گیاهچه‌های جهش‌یافته *ssl7* و تیپ وحشی Col-0 نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد، اما اثر متقابل ژنوتیپ‌ها در تنش شوری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شدند (جدول ۲). با توجه به بیشترین میزان فعالیت آنزیم CAT در سطح غلظت mM ۱۰۰ تیمار شوری در ژنوتیپ جهش‌یافته *ssl7* و کمترین میزان فعالیت این آنزیم مجدداً در ژنوتیپ جهش‌یافته *ssl7* در سطح غلظت mM ۵۰ تیمار شوری مشاهده شد. در سطح غلظت mM ۱۰۰ فعالیت CAT در ژنوتیپ‌های تیپ وحشی و جهش‌یافته به ترتیب برابر ۰/۲۷۷ و ۰/۵۰۴ بود. بیشترین میزان تفاوت فعالیت این آنزیم بین دو ژنوتیپ در سطح غلظت ۵۰ mM و کمترین تفاوت در میزان فعالیت این آنزیم بین دو ژنوتیپ در غلظت صفر مشاهده شد (شکل ۶). در حالت کلی، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان POD، SOD، APX و CAT در دو ژنوتیپ‌های جهش‌یافته و تیپ وحشی، تأثیر مثبت سرکوب ژن *SSL7* در افزایش فعالیت آنزیم‌های جمع‌آوری‌کننده ROS حاصل از تنش شوری را در گیاه آراییدوپسیس نشان می‌دهد. رادیکال‌های آزاد و دیگر مشتقات فعال اکسیژن، ناگزیر، طی واکنش‌های اکسید و احیای بیولوژیکی تولید می‌شوند. گونه‌های اکسیژن فعال آنزیم‌ها



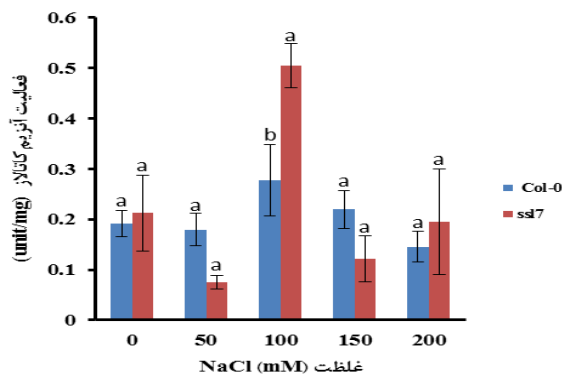
شکل ۴- فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در پاسخ به تنش شوری. گیاهان با طول عمر ۴ هفته به مدت ۴ روز در معرض غلظت‌های مختلف NaCl (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار) قرار گرفتند و سپس فعالیت آنزیم SOD در گیاهان جهش یافته *ssl7* و تیپ وحشی Col-0 اندازه گیری شد.

Fig. 4. Superoxide dismutase enzyme activity (SOD) in response to salt stress. Four-week old plants were subjected to different NaCl concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mM) for 4 days and SOD enzyme activities were measured in the wild-type (Col-0) and *ssl7* mutant.



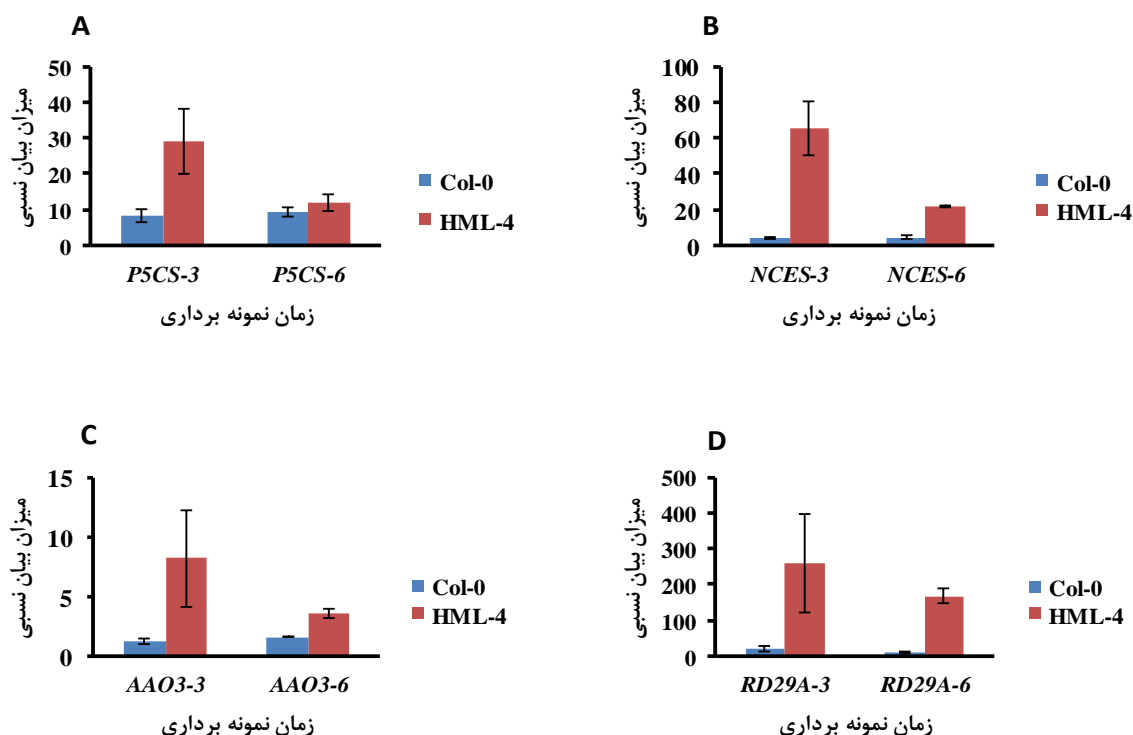
شکل ۵- فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) در پاسخ به تنش شوری. گیاهان با طول عمر ۴ هفته به مدت ۴ روز در معرض غلظت‌های مختلف NaCl (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار) قرار گرفتند و سپس فعالیت آنزیم APX در گیاهان جهش یافته *ssl7* و تیپ وحشی Col-0 اندازه گیری شد.

Fig. 5. Ascorbate peroxidase enzyme activity (APX) in response to salt stress. Four-week old plants were subjected to different NaCl concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mM) for 4 days and APX enzyme activities were measured in the wild-type (Col-0) and *ssl7* mutant.



شکل ۶- فعالیت کاتالاز (CAT) در پاسخ به تنش شوری. گیاهان با طول عمر ۴ هفته به مدت ۴ روز در معرض غلظت‌های مختلف NaCl (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار) قرار گرفتند و سپس فعالیت آنزیم CAT در گیاهان جهش یافته *ssl7* و تیپ وحشی Col-0 اندازه گیری شد.

Fig. 6. Catalase enzyme activity (CAT) in response to salt stress. Four-week old plants were subjected to different NaCl concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mM) for 4 days and CAT enzyme activities were measured in the wild-type (Col-0) and *ssl7* mutant.



شکل ۷ - الگوی بیانی ژن‌های پاسخ به تنش‌های غیر زیستی. **A: P5CS**, **B: NCES**, **C: AAO3** و **D: RD29A**. میزان بیان این ژن‌ها در پاسخ به تنش شوری با استفاده از qRT-PCR تحلیل شد. RNA تام از گیاهان جهش‌یافته *ss17* و تیپ وحشی Col-0 تیمار شده با ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl به مدت ۳ و ۶ استخراج شد.

Fig. 7. Expression pattern of abiotic stresses responsive genes after salt stress. **A: P5CS**, **B: NCES**, **C: AAO3** and **D: RD29A**. The expression level of these genes in response to salt stress was analysed by qRT-PCR. Total RNA was isolated from WT Col-0 and *ss17* seedlings -3 and 6 hours after NaCl treatment.

گیاهان در ارتباط است. پرولین نقش‌هایی در مهار رادیکال‌های آزاد، ثبات ساختار درون سلولی و پتانسیل اکسایش بافر سلولی تحت تنش را نیز بر عهده دارد. ژن‌های پاسخگوی تنش شوری که پروموتراهای آنها شامل اجزای پاسخگوی پرولین هستند، برای القای پرولین هم شناخته شده‌اند. پرولین می‌تواند اعضای سلولی را از تنش اکسیداتیو القاشده با شوری با تنظیم بالای فعالیت انواع آنتی‌اکسیدان‌ها حفاظت کند (Tuteja, 2007). در گیاه آرابیدوپسیس رونویسی از ژن *P5CS1* با تیمارهای شوری، خشکی، گلوکز و ساکارز در یک روش وابسته به ABA و نور القا می‌شود (Turchetto-Zolet et al., 2009). الگوی بیان نسبی ژن *NCED3* در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری در غلظت ۱۵۰ mM NaCl در ژنوتیپ جهش‌یافته *ss17* به ترتیب ۶۵/۸۸۴ و ۲۱/۹۸۱ برابر و در ژنوتیپ تیپ وحشی Col-0 در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تیمار میزان بیان این ژن به

فرایند در گیاهان برعهده دارد. ژن *P5CS* از چندین گیاه جداسازی شده است و در بعضی از گونه‌ها دو نسخه از ژن توصیف شده است. در آرابیدوپسیس تالیانا ژن‌های *AtP5CS1* و *AtP5CS2* الگوهای زمانی و بیانی مختلفی را نشان می‌دهد. در حالی که ژن *P5CS1* به‌نظر می‌رسد که تقریباً در همهٔ اندام‌ها بیان و به‌سرعت با تنش تحریک می‌شود. *P5CS2* در سلول‌های در حال تقسیم و در پاسخ به تعاملات ناسازگار بیان می‌شود (Turchetto-Zolet et al., 2009). گیاهان بعضی از سازوکار-های دفاعی را در مقابله با تنش‌ها آغاز می‌کنند. پرولین اسمولیت محافظ اسمزی است که در بسیاری از گیاهان (نه همه) در پاسخ به تنش از جمله تنش شوری سنتز می‌شود و در نتیجه در حفظ وضعیت اسمزی سلول در بهبود اثر تنش‌های غیرزیستی کمک می‌کند. اسیدآمینو پرولین به‌طور معمول در سیتوزول تحت تنش تجمع می‌یابد و با تنظیم اسمزی برای بهبود تحمل در برابر شوری

و ممکن است تحمل تنش شوری را در این گیاهان افزایش دهد. حساسیت و تحمل تنش در گیاهان اقدامی هماهنگ از ژن‌های متعدد پاسخ‌دهنده به تنش است که اثر متقابلی با دیگر اجزای مسیرهای انتقال سیگنال تنش دارد (Tuteja, 2007). تنش اسمزی و شوری بالا بسیاری از ژن‌ها از جمله ژن‌های مسئول در بیوسنتز ABA مانند *ZEP* (zeaxanthin epoxidase) یا *NCED* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) را در گیاه آرابیدوپسیس القاء می‌کند. در تنش اسمزی آبسیزیک‌اسید اکسیداز (*AAO3*) یک کوفاکتور مولیدنوم شامل آلدهید اکسیداز (*AO*; EC 1.2.3.1) هم بیان می‌شود که مرحله اکسیداسیون نهایی در بیوسنتز ABA را کاتالیز می‌کند. در اندام‌های رویشی، سطح ABA داخلی در پاسخ به انواع تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری بالا افزایش می‌یابد. ABA نقش‌های مهمی در پاسخ به این تنش‌ها با بستن روزه‌ها و بیان ژن‌های مقاومت به تنش برعهده دارد. نقش ABA در تنظیم توسعه و رشد اولیه گیاهچه در پاسخ به تنش‌های اسمزی، شوری و قند نیز گزارش شده است (Seo *et al.*, 2004). الگوی بیانی ژن RD29A در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری در ژنوتیپ جهش‌یافته *ssl7*، به ترتیب ۲۵۹/۶۶۷ و ۱۶۷/۹۰۷ برابر در مقایسه با زمان صفر است و در ژنوتیپ تیپ وحشی Col-0 در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تیمار میزان بیان این ژن به ترتیب ۲۱/۹۱۳ و ۹/۰۱۷ برابر به دست آمد (شکل ۷). بیان بالاتر ژن‌های واکنش‌دهنده به تنش شوری در موتانت *ssl7* احتمالاً به معنی تأثیر کنترل منفی *SSL7* بر رونوشت برداری ژن‌های ذکر شده است. تأثیر کنترل منفی قبلاً نیز در برخی ژن‌های سازنده دیواره سلولی مشاهده شده است. آنزیم کالوز سینتاز *PMR4* وظیفه سنتز کالوز در سلول‌های گیاهی را پس از دریافت سیگنال حمله پاتوژن به عهده دارد که تولید کالوز به دفاع ضدباکتریایی و ضدقارچی مرتبط است (Ham *et al.*, 2007). اما، مشاهده شد مقاومت موتانت‌های *PMR4*، که فاقد توانایی سنتز کالوز هستند، در برابر بیماری سفیدک پودری افزایش یافت. موتانت‌های دوگانه که به طور هم‌زمان فاقد توانایی سنتز کالوز و سالیسیلیک‌اسید (*SA*) بوده‌اند به بیماری حساسیت نشان دادند. نتایج پیش‌گفته این نظریه را مطرح کرد که *PMR4* دارای تأثیر کنترل منفی بر مسیر *SA* است. از دیدگاه تکاملی احتمالاً فقدان *PMR4* در سیستم

ترتیب ۳/۹۵۴ و ۴/۳۵ برابر بوده است (شکل ۷). تنش اسمزی می‌تواند چندین مسیر ترانس‌سایانی علامت را فعال کند که به تغییراتی در بیان ژن‌ها و متابولیسم منجر می‌شود. یک تنظیم‌کننده مهم از این مسیرهای سیگنالیینگ فیتوهورمون آبسیزیک‌اسید (*ABA*) است که در پاسخ به تنش اسمزی تجمع پیدا می‌کند. *ABA* بسیاری از فرایندهای حیاتی مانند خواب بذر، حرکت روزه‌ها و سازگاری با تنش‌های محیطی را تنظیم می‌کند (Wang *et al.*, 2015). وجود *ABA* همچنین برای پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی مانند حمله پاتوژن و تنش‌های غیرزیستی مانند کم‌آبی و شوری هم لازم است. به‌تازگی در گیاهان ژن‌های زیادی در بیوسنتز *ABA* مشخص شده است. یکی از این ژن‌ها، ژن *NCED* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) است که اولین بار در ذرت شناسایی شده بود (Zhao, 2011). در آرابیدوپسیس تالیانا پنج عضو از خانواده *NCED* (*NCED2*، *NCED6*، *NCED5*)، *Wang et al.* (2015) مشخص شده است (*NECD9*، *NCED3*، *xanthoxin* تبدیل 9-cis-xanthophyll به *xanthoxin*). کاتالیز می‌کند که مرحله محدودکننده میزان سرعت بیوسنتز *ABA* است (Zhao, 2011). *NCED3* با داشتن نقش مهمی در بیوسنتز *ABA* با تحریک تنش‌های اسمزی و کم‌آبی بیان می‌شود (Wang *et al.*, 2015). افزایش بیان بیشتر ژن *NCED3* در جهش‌یافته *ssl7* نسبت به تیپ وحشی، احتمالاً به دلیل نقش این ژن در مسیر سنتز اسیدآبسیزیک است که در گیاهچه‌های جهش‌یافته ممکن است میزان سنتز *ABA* بیشتر شود و سبب افزایش تحمل این گیاهچه‌ها به تنش‌های غیرزیستی شود. تضعیف ممانعت‌کننده‌ها و سرکوب‌کننده‌های مسیر سنتز *ABA* می‌تواند به طریق مشابه سبب افزایش تولید *ABA* شود. بیان نسبی ژن *AAO3* در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری در ژنوتیپ جهش‌یافته *ssl7* به ترتیب ۸/۲۱۱ و ۳/۵۶۸ برابر و در تیپ وحشی Col-0 در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تیمار به ترتیب ۱/۲۳ و ۱/۵۸۵ برابر بوده است (شکل ۷). افزایش بیان ژن *AAO3* در ژنوتیپ جهش‌یافته *ssl7* در ساعت‌های اولیه اعمال تنش شوری، احتمالاً به دلیل نقش کنترل منفی *SSL7* در مسیر بیوسنتز *ABA* باشد که یک هورمون گیاهی مهم در مسیر سیگنالیینگ پاسخ به تنش‌ها از جمله تنش شوری است. احتمالاً جهش در ژن *SSL7* سبب افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز *ABA* هم می‌شود

REFERENCES

- Amako, K., Chen, G.X. and Asada, K.** 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. – *Plant Cell Physiol.* 35: 497-504.
- Arora, A., Sairam, R. and Srivastava, G.** 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. – *Curr. Sci.* 82: 1227-1238.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. – *Anal. Biochem.* 44: 276.
- Bouché, N. and Bouchez, D.** 2001. *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. – *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 111-117.
- Chalfun-Junior, A., Mes, J.J., Mlynárová, L., Aarts, M. G. and Angenent, G.C.** 2003. Low frequency of T-DNA based activation tagging in *Arabidopsis* is correlated with methylation of CaMV 35S enhancer sequences. – *FEBS Letters.* 555: 459-463.
- Denness, L., Mckenna, J.F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M., Mansfield J., Zipfel C. and Hamann T.** 2011. Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. – *Plant Physiol.* 156: 1364-1374.
- Dhindsa, R.S. and Matowe, W.** 1981. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. – *J. Exp. Bot.* 32: 79-91.
- Fabbri, M., Delp, G., Schmidt, O. and Theopold, U.** 2000. Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid-synthesizing enzymes. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 191-196.
- Fahad, S. and Bano, A.** 2012. Effect of salicylic acid on physiological and biochemical characterization of maize grown in saline area. – *Pak. J. Bot.* 44: 1433-1438.
- Gill, S.S. and Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. – *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.
- Ham, J.H., Kim, M.G., Lee, S.Y. and Mackey, D.** 2007. Layered basal defenses underlie non-host resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. – *Plant J.* 51: 604-616.
- Hamann, T.** 2012. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. – *Front. Plant Sci.* 3: 77-83.
- Katam, R., Panthee, D.R., Bhattacharya, A., Basha, S. M. and Kole, C.** 2011. *Arabidopsis*. In: Cole C. (ed). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* 1: 1-16.
- Khan, M.A. and Ungar, I.A.** 2001. Seed germination of triglochin maritime as influenced by salinity and dormancy relieving compounds. – *Biol. Plant.* 44: 301-303.
- Krysan, P.J., Young, J.C. and Sussman, M.R.** 1999. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 11: 2283-2290.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time
- دفاعی گیاه نقص تلقی شده و باعث فعال شدن سیستم ایمنی از طریق SA می‌شود. به عبارتی، یک سازوکار تکمیلی تکامل یافته است، تا نقص در تولید یا تجمع مولکول‌های دیواره سلولی جبران شود (Malinovsky *et al.*, 2014). سلولز از گروه میکروفیبرهای دیواره سلولی است که از کمپلکس‌های مولتی-مریک بزرگ سنتز می‌شوند و از زیرواحدهای سلولز سینتازها (CESAs) تشکیل شده‌اند. گیاهان موتانت فاقد توانایی در تولید هریک از سلولزها علاوه بر افزایش تولید لیگنین و اکنش‌های دفاعی قوی‌تری را بروز می‌دهد. در همین زمینه، موتاسیون در ژن کدکننده CES3 افزایش مقاومت به سفیدک پودری در گیاه آراییدوبسیس را نشان داد (Hamann, 2012). ایزوزابن که ممانعت کننده بیوسنتز سلولز است از طریق یک سازوکار وابسته به RbohD القاء می‌شود. این سازوکار از طریق feed-back loop وابسته به اسیدجاسمونیک تنظیم می‌شود (Denness *et al.*, 2011). تیمار SA در گیاهان تحت تنش شوری سبب افزایش IAA و کاهش ABA می‌شود (Fahad & Ban, 2012). به طریق مشابه، تحت تنش شوری تیمار SA سبب افزایش رشد ریشه‌ها، افزایش فعالیت SOD، POD و APX در مقایسه با قبل از تیمار SA و کاهش فعالیت کاتالاز (CAT) شد.
- با توجه به نتایج آزمایش‌های مربوط به مطالعات بیان ژن SSL7 با استفاده از qRT-PCR و افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و APX، که مشابه گیاهان تحت تیمار شوری بوده است، شاید بتوان استنباط کرد که SSL7 با مسیر SA مرتبط باشد. گرچه، این ژن در بالادست مسیر SA قرار ندارد؛ زیرا، گیاهان ssl7 تیمار شده با SA همچنان توانایی بیان ژن‌های نشانگر مسیر SA را داشته‌اند (Sohani, 2005).

سپاسگزاری

از "صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور" به جهت پشتیبانی مالی از نویسنده‌ی مسئول قدردانی می‌شود.

- quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. – *Methods* 25: 402-408.
- Malinovsky, F.G., Fangel, J.U. and Willats, W.G.** 2014. The role of the cell wall in plant immunity. – *Front. Plant Sci.* 5: 178-196.
- Nakano, Y. and Asada, K.** 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate- depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. – *Plant Cell Physiol.* 28: 131-140.
- Parida, A.K. and Das, A.B.** 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. – *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 324-349.
- Seo, M., Aoki, H., Koiwai, H., Kamiya, Y., Nambara, E. and Koshiba, T.** 2004. Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. – *Plant Cell Physiol.* 45: 1694-1703.
- Shanker, A.K. and Venkateswarlu, B.** 2011. Abiotic stress response in plants- physiological, biochemical and genetic perspectives. – *InTech*, pp, 5-10.
- Sohani, M.M.** 2005. Role of hemomucin like genes in *Arabidopsis thaliana*. – Ph.D dissertation, Adelaide University, Adelaide, Australia.
- Sohani, M.M, Schenk, P., Schultz, C.J. and Schmidt, O.** 2009. Phylogenetic and transcriptional analysis of a strictosidine synthase-like gene family in *Arabidopsis thaliana* reveals involvement in plant defence responses. – *Plant Biol.* 11: 105-117.
- The Arabidopsis Genome Initiative.** 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Turchetto-Zolet, A.C., Margis-Pinheiro, M. and Margis, R.** 2009. The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. – *Mol. Genet. Genomics* 281: 87-97.
- Tuteja, N.** 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. – *Methods in Enzymol.* 428: 419-438.
- Wang, Z.Y., Gehring, C., Zhu, J., Li, F.M., Zhu, J.K., and Xiong, L.** 2015. The *Arabidopsis* vacuolar sorting receptor1 is required for osmotic stress-induced abscisic acid biosynthesis. – *Plant Physiol.* 167: 137-152.
- Xin, S., Yu, G., Sun, L., Qiang, X., Xu, N. and Cheng, X.** 2014. Expression of tomato interacts with target proteins. – *J. Plant Res.* 127: 695-708.
- Xiong, L., Lee, B.H., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C. and Zhu, J.K.** 2001. FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. – *Genes Dev.* 15: 1971-1984.
- Zhao, J.** 2011. The Mechanism of the silencing of a transgene, NCED3-LUC, in *Arabidopsis thaliana*. – Ph.D dissertation, King Abdullah University of Science and Technology. 51 pp.

How to cite this article:

Ghorbani Salkuyeh, P., Sohani, M.M. and Abedi, A. 2018. Negative control of Strictosidine synthase-like 7 gene on salt stress resistance in *Arabidopsis thaliana*. – *Nova Biologica Rep.* 2018: 106-117.

قربانی سالکویه، پ.، سوهانی، م.م. و عابدی، ا. ۱۳۹۶. نقش کنترل منفی ژن شبه استریکتوسیدین سینتاز-۷ در مقاومت گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* به تنش شوری. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۳۹۷: ۱۱۷-۱۰۶.

