بررسی برخی ویژگیهای فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان تراریخت شده با ژن *TRR14* در تیمار شوری

مهناز اقدسی* و نوشین مقدم

گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۳

چکیده

TRR14، پروتئین کوچکی است که در کلروپلاست جای دارد. این پروتئین نخستین بار در غربالگری گیاهچه‌های آرابیدوپسیس مقاوم به ترهالوز (Trehalose Resistant) شناخته شده است. هدف از این تحقیق، بررسی فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان تراریخت‌شده با ژن *TRR14* در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی آرابیدوپسیس در تنش شوری است. بدین منظور، بذرهای گیاه وحشی آرابیدوپسیس و تراریخت شده با ژن *TRR14* در محیط کشت MS حاوی غلظتهای مختلف نمک (۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار) کشت داده شدند. نتایج نشان داد که در تیمار شوری درصد جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم ترهالاز در گیاهچه‌های تراریخت بالاتر از گیاهچه وحشی است. همچنین این نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک میزان آنتوسیانین در گیاهچه وحشی به طور قابل توجهی در مقایسه با گیاهچه تراریخت افزایش یافت. نتایج حاضر نشان داد که در تیمار ۷۵ میلی‌مولار نمک، غلظت سدیم در گیاهچه وحشی به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. سنجش پتاسیم نیز نشان داد که میزان آن در گیاهچه وحشی رشد یافته بر روی محیط MS ، تقریباً سه برابر گیاهچه تراریخت است. اما تیمار ۷۵ میلی‌مولار نمک، سبب کاهش میزان پتاسیم در هر دو نوع گیاهچه‌ها شد. همچنین با افزایش میزان نمک شکل و اندازه سلولهای اپیدرمی تغییر یافته و تعداد روزنه در واحد سطح در گیاهچه‌های وحشی افزایش یافت، در حالی که این فاکتور در گیاهچه تراریخت تغییری نشان نداد. بررسی الگوی بیان ژن نیز نشان داد که تیمار شوری، سبب افزایش بیان ژنهای ترهالاز و *TRR14* شد.

واژه های کلیدی: TRR14، تنش شوری، جوانه زنی ، بیان ژن، ترهالاز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۰۱۰۶۲۲۰۴ ، پست الکترونیکی: m.aghdasi@gu.ac.ir

مقدمه

شوری یکی از عوامل مهم محدودکننده در تولید محصولات کشاورزی و زراعی است. نزدیک به ۸۰۰ میلیون هکتار از خشکیهای سطح کره زمین در شرایط شوری قرار دارند (۲۲). تنش شوری روی گیاهان اثرات زیان باری را بر جای می‌گذارد. با شروع و توسعه تنش شوری در گیاه، همه فرآیندهای اصلی همانند فتوسنتز، ساخت پروتئینها، متابولیسم چربیها و تولید انرژی آسیب می‌بینند (۹). گیاهان در طی تکامل مکانیسمهای محافظتی مختلفی برای غلبه بر شرایط ناخواسته محیطی به کار گرفته‌اند. در پاسخ به تنشهای محیطی بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیک و متابولیسم گیاه در گیر شده و یک شبکه سیگنالینگ پیچیده برای سازگاری گیاهان با این شرایط پدید می‌آید (۳۵). در پاسخ به شوری، ژنهای زیادی تنظیم می‌شوند که محصول آنها به طور مستقیم یا غیرمستقیم در این پدیده دخالت دارند. این ژنها در سنتز اسمولیت‌ها، کانالهای یونی، گیرنده‌ها، سیگنالینگ کلسیم و سایر سیگنالهای تنظیمی نقش دارند (۱۷). بیشتر گیاهان اسمولیت‌هایی را در پاسخ به تنش خشکی و شوری سنتز و

Archive of SID

www.SID.ir

انباشته می‌کنند. برخی گیاهان با تولید اسمولیت‌هایی نظیر مانیتول، اونونیتول، ترهالوز، بتائین یا فروکتان بسیاری از تنشهای محیطی را تحمل می‌کنند (۳۳).

ترهالوز دی‌ساکاریدی است که از دو مولکول گلوکز با پیوند آلفا ۱ و ۱ ساخته شده است. این قند در طیف وسیعی از موجودات زنده اعم از باکتریها، قارچها، نماتودها، حشرات، سخت‌پوستان و گیاهان وجود دارد و می‌تواند به عنوان منبع کربن و انرژی، مورد استفاده موجودات زنده قرار گیرد. پیش ماده این قند ترهالوز-۶-فسفات (T6P) است که از اتصال گلوکز-۶-فسفات و UDP- گلوکز و با دخالت ترهالوز-۶-فسفات سینتاز (TPS) ساخته می شود. سپس T6P توسط آنزیم ترهالوز-۶-فسفات فسفاتاز (TPP) دفسفریله شده و ترهالوز تولید می شود. در مسیر متابولیسم ترهالوز در گیاهان، این قند توسط آنزیم ترهالاز شکسته شده و به دو مولکول گلوکز تجزیه می شود (۱۱). میزان قند ترهالوز در موجودات زنده بسیار اندک است و تا مدتها تصور بر آن بود که بسیاری از گیاهان فاقد این قند هستند (۲۰). ترهالوز در زندگی گیاهان نقشهای متعدد مهمی را ایفا می‌کند؛ که از آن جمله می‌توان تأثیر آن بر گلدهی، رشد گیاه، مصرف کربن، مقاومت به تنش و فتوسنتز را نام برد (۲۴، ۲۵، ۲۸، ۲۹، ۳۱ و ۳۲). اخیراً مشخص شده است که قند ترهالوز نقش مهمی در مقاومت به تنش در گیاهان دارد. تراریخت شدن گیاه تنباکو با ژن ترهالوز ۶- فسفات سنتاز مخمر (*ScTPS1*) تحت پروموتور روبیسکو یا CaMV 35S promotor سبب افزایش مقاومت آن به تنش خشکی شده است . همچنین ثابت شده است که برگهای گیاهان تراریخت شده با این ژن از توازن آبی بهتری برخوردار هستند (۱۳ و ۱۴). از طرفی دیگر تراریخت شدن گیاهان با ژن ترهالوز ۶- فسفات سنتاز سبب تولید گیاهان مقاوم به انواع تنشها مثل خشکی، سرما و شوری در تک‌لپه‌ایها و در دو لپه‌ایها شده است (۱۳ و ۲۰).

TRR14، پروتئین کوچکی به طول ۱۳۹ اسید آمینه است که توسط ژن At4g10300 کد می شود. این پروتئین نخستین بار در غربالگری گیاهچه‌های Arabidopsis مقاوم به قند ترهالوز (Trehalose Resistance) شناسایی شد و به همین جهت TRR14 نامیده شد. نقش پروتئین TRR14 در گیاه آرابیدوپسیس به درستی شناخته نشده است. اما نتایج حاصل از آنالیز ژنتیکی و بیان ژن نشان داد که بیان بالای ژن *TRR14* در گیاه Arabidopsis سبب مقاومت این گیاه به غلظت قند ترهالوز می شود. این نتایج نشان داد که پروتئین TRR14 در سیگنالینگ قند ترهالوز در گیاهان نقش دارد (۵). بررسیهای اولیه نشان داده که تراریخت‌شدن گیاه Arabidopsis با ژن *TRR14* سبب افزایش مقاومت این گیاهان به تنشهای شوری و خشکی شده است. در این تحقیق نشان داده شده که گیاهان تراریخت رشد یافته در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار نمک، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز بالاتر از گیاهچه های وحشی بود (۶). در حالی که گیاهچه‌های جهش یافته که فاقد بیان ژن *TRR14* بودند در تنش شوری و خشکی حساس‌تر بوده‌اند. به علاوه این نتایج به وضوح نشان می‌دهد که پروتئین TRR14 می تواند با اثر بر مکانیسمهای فیزیولوژیکی مهم گیاه نظیر تولید سیستم ریشه‌ای گسترده برای جذب آب و موادغذایی و میزان کلروفیل مناسب برای حفظ فتوسنتز در بقاء و افزایش ماندگاری گیاه در شرایط تنش نقش داشته باشد. (۷). با توجه به آنکه بالا رفتن میزان قند ترهالوز در گیاهان سبب افزایش مقاومت به تنش می شود (۱۳) و از طرفی چون پروتئین TRR14 در سیگنالینگ قند ترهالوز نقش دارد به نظر می‌رسد که TRR14 به نوعی در مقاوم نمودن گیاهان به تنش نقش داشته باشد. هدف از تحقیق حاضر، مقایسه برخی ویژگیهای فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه آرابیدوپسیس تراریخت *TRR14* در مقایسه با گیاه وحشی در تنش شوری است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روشها

شرایط رشد و کشت گیاه: در این آزمایش از بذر گیاه *Arabidopsis thaliana* رقم کلمبیا صفر (Col-0) و گیاه تراریخت شده با ژن *TRR14* (T17) استفاده شد (۶). بذرها ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۷۰ درصد اتانل و سپس۱۰ دقیقه در محلول ۲۰ درصد آب ژاول ضد عفونی شده و در آخرین مرحله ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس بذرها در محیط موراشیگ و اسکوگ(MS) حاوی غلظتهای مختلف ۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرور سدیم کشت شدند(۲۳). در هر پتری ۴۰-۵۰ بذر و هر تیمار با ۵ تکرار انجام شد. به منظور استریفیکاسیون، بذرها به مدت ۲-۳ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شده و بعد به اتاق کشت با دمای ۲ ±۲۴ درجه سانتی گراد تحت شرایط روز بلند (۱۶ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی) و شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه انتقال داده شدند. بعد از ۱۶ روز از کشت، سرعت جوانه زنی بذرها مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری شاخص روزنه‌ای: جهت تعیین شاخص روزنه‌ای، تعداد روزنه ها در واحد سطح برگ (یک سانتیمتر مربع) در زیر میکروسکوپ نوری معمولی و نورمارسکی (Jena, Germany) شمارش شد. سپس تعداد کل سلول اپیدرم، روزنه و تعداد کرک‌ها در واحد سطح شمارش شده و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{شاخص روزنه ای} = \frac{\text{تعداد روزنه در واحد سطح}}{\text{مجموع تعداد سلول اپیدرم+ کرک+ روزنه}}$$

اندازه گیری میزان آنتوسیانین: اندازه‌گیری آنتوسیانین به روش میتا و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد(۱۹). مقدار ۰/۰۲ گرم بافت تازه گیاه در ازت مایع خرد شده و سپس ۴ میلی لیتر محلول ۱ درصد اسید کلریدریک در متانول به آن افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. جذب نور در فاز رویی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موجهای ۵۳۰ و ۷۵۷ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر میزان نسبی آنتوسیانین تعیین شد:

$$A= A_{550}- (0.25\ A_{657})$$

A= میزان نسبی آنتوسیانین

A_{530}و A_{657} به ترتیب جذب نور نمونه در طول موجهای ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ترهالاز: بر مبنای میزان گلوکز آزاد شده در واحد زمان با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بر اساس تلفیقی از دو روش پرادو و همکاران (۱۹۹۸) و مولر و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد (۲۱ و۲۶). به این منظور ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاهی با ۵ میلی لیتر بافر استخراج (شامل محلول ۵۰ میلی مولار مورفولین اتان سولفونیک اسید (MES) با pH:6.8، محلول ۱ میلی مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید ، محلول ۱ درصد تریتون X100 و محلول ۱ درصد پلی ونیل پیرولیدون) در هاون چینی سرد هموژن شد. پس از ۲ ساعت قرارگرفتن در دمای صفر درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم ترهالاز ، ابتدا ۷۰۰ میکرولیتر از بافر۵۰ میلی‌مولار MES به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰۰ میلی مولار ترهالوز درون لوله آزمایش ریخته و به آن ۲۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی اضافه شد. سپس جهت تعیین بهترین زمان برای سنجش میزان گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت آنزیم ترهالاز نمونه ها در ۴ بازه زمانی ۰، ۱۵، ۳۵ و ۴۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در نهایت بازه زمانی ۰ و ۴۵ دقیقه انتخاب شد. به منظور توقف فعالیت آنزیم ترهالاز نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم ترهالاز بر اساس میکروگرم

Archive of SID

www.SID.ir

گلوکز آزاد شده بر گرم وزن تر گیاه در دقیقه محاسبه گردید.

اندازه گیری میزان سدیم و پتاسیم: مقدار ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های خشک آسیاب شده به مدت ۰/۵ ساعت در دمای ۳۰۰ درجه سانتی گراد و سپس ۴ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه در کوره الکتریکی قرار گرفتند. پس از سرد شدن به هر کدام از ظروف حاوی خاکستر گیاهی، ۱ میلی-لیتر اسید کلریدریک ۶ نرمال اضافه شد. سپس حجم محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم از دستگاه فلیم فلومتر استفاده شد. غلظت یونهای سدیم و پتاسیم در نمونه‌های گیاهی با استفاده از منحنی استاندارد و بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک بافت محاسبه شد.

استخراج RNA و RT-PCR: استخراج RNA از گیاهچه-های آرابیدوپسیس طبق روشSambrok و Russell (۲۰۰۱) صورت گرفت (۲۷).

واکنش RT-PCR با استفاده ازکیت Prime Script One Step RT-PCR (TAKARA BIO INC Japanese) انجام شد. این واکنش در حجم کلی۲۵ میکرولیتر با محتوی ۲ میکروگرم RNA، ۱ واحد آنزیم Prime Script، ۱۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم Prime Script، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت در دستگاه PCR با برنامه حرارتی واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه برای چرخه اول و برای چرخه دوم به بعد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه درجه انجام شد. محصول PCR با استفاده از دستگاه الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد جداسازی شد. در پایان ژلهای به دست آمده با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.

طراحی پرایمر: پرایمرهای رفت و برگشت ژنهای مورد بررسی (*TRE*: gctgcaccacgaaccagtaga , ttcttcgttctccacgttgga، *TRR14*: attgtgagcaactgggatg) و (*Actin*: tagatggggacggtggag and aacttgatcgggatatggagtg) ّgtagatggggacggtggag به کمک نرم افزار Primer 3 طراحی و از شرکت امینسان تهیه گردیدند.

آنالیز آماری: کلیه آزمایشات با ۴ تکرار در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام شد و در تمام اندازه‌گیریها رسم نمودار با نرم افزار Excel و آنالیز داده‌ها با نرم افزار SAS و آزمون دانکن محاسبه شد.

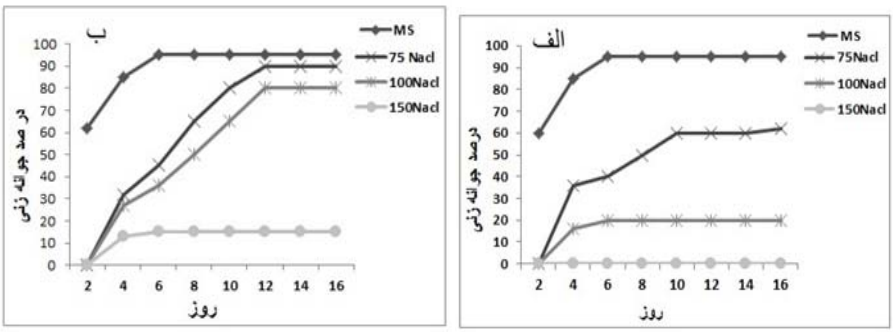
نتایج

اثر تیمار شوری بر جوانه‌زنی: بررسی درصد جوانه‌زنی بذر گیاه وحشی (WT) و گیاهان تراریخت (T17) در محیط حاوی غلظتهای مختلف نمک نشان داد که جوانه-زنی بذور گیاهچه های وحشی از روز دوم شروع شده و تا روز هشتم تقریباً ۹۲ درصد بذرها جوانه زدند. اما در محیط حاوی ۷۵ میلی‌مولار نمک جوانه زنی از روز دوم شروع شده و تا روز دهم تنها ۶۰ درصد از بذرها جوانه زدند. در حالی که در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک تنها ۲۰ درصد از بذرها جوانه زده و در غلظت۱۵۰ میلی‌مولار نمک اصلاً بذرها قادر به جوانه‌زنی نبودند (شکل ا–الف). بررسی درصد جوانه‌زنی بذور گیاهان تراریخت نیز نشان داد که جوانه‌زنی از روز دوم شروع شده و تا روز چهارم ۹۸ درصد بذرها جوانه زدند. ازطرفی بررسی جوانه‌زنی بذرهای گیاهان تراریخت در محیط کشت حاوی ۷۵ میلی-مولار نمک، نشان داد که جوانه‌زنی از روز دوم شروع شده و تا روز چهارم ۹۰ درصد از بذرها جوانه زدند. اما جوانه زنی این بذور در محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار نمک از روز دوم شروع شده و تا روز دهم تنها ۷۸ درصد بذرها جوانه زدند. با افزایش غلظت نمک تا ۱۵۰ میلی مولارنیز تنها ۱۵ درصد بذرها قابلیت جوانه زنی از خود نشان دادند (شکل ۱–ب). همچنین این نتایج نشان داد که گیاهچه‌های وحشی در تنش ۱۰۰ میلی مولار نمک ابتدا به رنگ سفید

Archive of SID

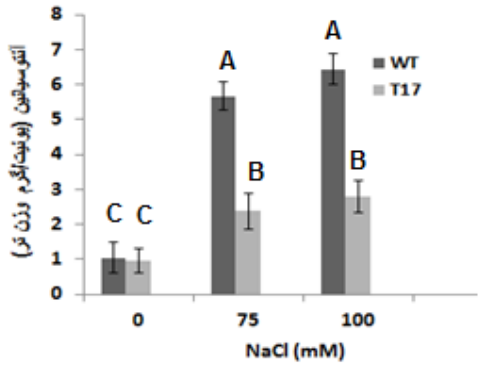
www.SID.ir

درآمده و پس از مدتی از بین رفتند؛ اما گیاهچه‌های تراریخت در همین محیط قادر به ادامه حیات بودند.



شکل ۱- درصد جوانه‌زنی الف)گیاهچه‌های وحشی(WT) و ب) گیاهان تراریخت شده با ژن *TRR14*(T17) بر روی محیط کشت MS حاوی غلظتهای مختلف NaCl در طی یک دوره ۱۶ روزه.

انداره گیری میزان آنتوسیانین: در گیاهچه‌های وحشی و تراریخت در غلظتهای مختلف نمک، نشان داد که در محیط فاقد نمک بین این دو نوع گیاه تفاوتی از نظر میزان آنتوسیانین وجود ندارد. اما در غلظت ۷۵ میلی‌مولار نمک، میزان آنتوسیانین در گیاهچه‌های وحشی بیش از پنج برابر افزایش نشان داد. گیاهچه‌های تراریخت نیز با تیمار شوری افزایش دو برابری در میزان آنتوسیانین خود نشان دادند. میزان آنتوسیانین در گیاهچه‌های وحشی و تراریخت رشدیافته در محیط حاوی ۱۰۰ میلی مولار نمک تفاوت معنی‌داری را با گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی ۷۵ میلی مولار نمک نشان نداد (شکل-۲).



شکل ۲- اثر تیمار غلظتهای مختلف NaCl بر میزان آنتوسیانین در گیاهچه‌های وحشی (WT) و تراریخت شده با ژن *TRR17*(T17)پس از ۱۶ روز. داده ها، حاصل میانگین چهار تکرار است.

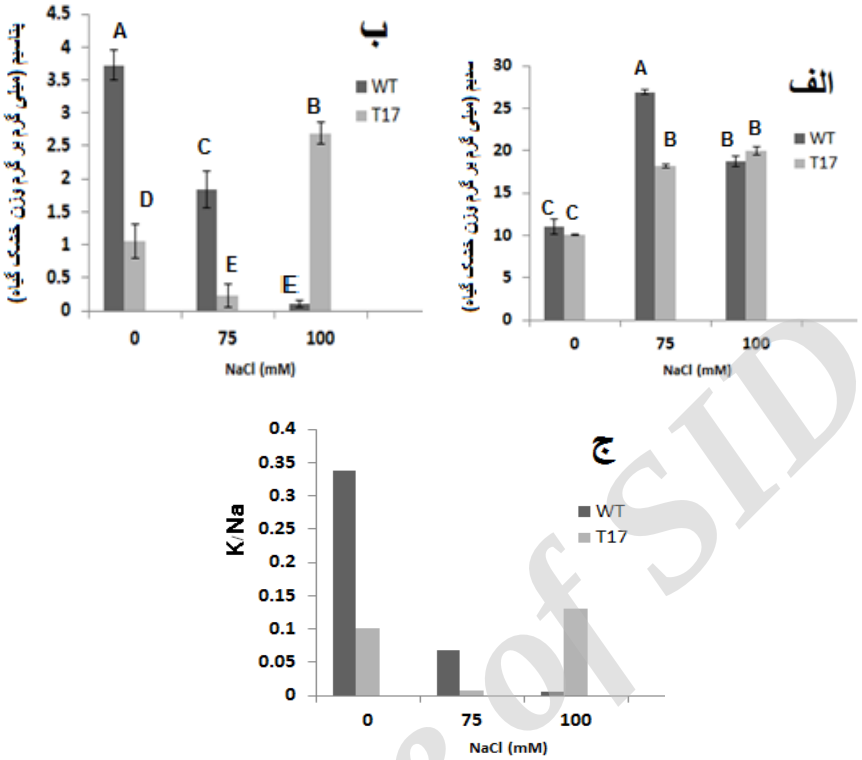
اندازه گیری سدیم، پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم: نتایج حاصل نشان داد که در محیط فاقد نمک، میزان سدیم در گیاهچه‌های وحشی و تراریخت با یکدیگر برابر است. با تیمار شوری میزان سدیم در گیاهچه‌های وحشی به طور معنی داری افزایش یافت؛ اما میزان سدیم در گیاهچه‌های تراریخت به طور معنی‌داری کمتر از گیاهچه‌های وحشی است. میزان سدیم در گیاهچه های وحشی و تراریخت رشد یافته در محیط حاوی ۱۰۰ میلی مولار نمک تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند (شکل ۳-الف)

اندازه‌گیری میزان پتاسیم نیز نشان داد که در محیط فاقد نمک، میزان پتاسیم در گیاهچه‌های وحشی سه برابر بیشتر از گیاهچه‌های تراریخت رشد یافته در همین محیط است. با تیمار شوری میزان پتاسیم در گیاهچه‌های وحشی و تراریخت کاهش یافت. از طرفی دیگر میزان پتاسیم در گیاهچه‌های وحشی رشد یافته در محیط حاوی ۱۰۰ میلی مولار کاهش چشمگیری را نشان داده در حالی که در همین محیط میزان پتاسیم در گیاهچه‌های تراریخت افزایش ۱۲ برابری را نشان داد (شکل ۳-ب).

بررسی نسبت پتاسیم به سدیم نیز نشان داد که در محیط فاقد نمک و محیط حاوی ۷۵ میلی‌مولار نمک، این نسبت در گیاهچه‌های وحشی بالاتر از گیاهچه‌های تراریخت است؛ اما با افزایش میزان نمک تا ۱۰۰ میلی مولار، این

Archive of SID
www.SID.ir

نسبت در گیاهچه‌های تراریخت بالاتر از گیاهچه‌های وحشی بوده است (شکل ۳–ج).



شکل ۳– اثر تیمار غلظتهای مختلف NaCl بر میزان الف) سدیم، ب) پتاسیم و ج) نسبت پتاسیم به سدیم (K/Na) در گیاهچه‌های وحشی (WT) و تراریخت شده با ژن *TRR14*(T17) پس از ۱۶ روز. داده ها، حاصل میانگین چهار تکرار می باشد.

اثر تیمار شوری بر تعداد روزنه‌های سطح برگ: بررسی وضعیت سلولهای اپیدرم برگ گیاهچه‌های وحشی و تراریخت شده که در محیط فاقد نمک رشد یافته‌اند، نشان داد شکل سلولها مشابه یکدیگر است. سلولهای اپیدرمی در گیاه وحشی و تراریخت شکل مشخصی نداشته و حاشیه سینوسی دارند (شکل ۴– الف). بررسیهای انجام شده نشان داد که بین تیمار صفر و ۷۵ میلی‌مولار نمک، تفاوت معنی-داری در شکل و وضعیت سلولهای اپیدرم و روزنه گیاهچه وحشی و تراریخت وجود ندارد؛ اما در گیاهچه‌های وحشی رشد یافته در محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار نمک، شکل سلولهای اپیدرم تغییر یافته و حاشیه سلولها صاف شده‌اند. از طرفی دیگر در این شرایط اندازه سلولها نیز کوچک شده است. همچنین روزنه‌ها نیز از نظر اندازه کوچک‌تر شده اما تعداد روزنه‌ها در واحد سطح افزایش یافته است (شکل ۴–ب). تعداد روزنه‌ها در واحد سطح اپیدرم گیاهچه‌های وحشی رشدیافته بر روی محیط MS، برابر با ۹±۱/۳ است؛ در حالی که در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار نمک تعداد روزنه به ۲۰ ±۲/۱ افزایش یافته است. در مقابل در گیاهچه‌های تراریخت رشدیافته در محیط فاقد نمک تعداد روزنه در واحد سطح ۱۱±۱/۳ می‌باشد که تفاوت معنی‌داری را با تعدادروزنه‌ها در واحد سطح گیاهچه‌های وحشی نشان نمی‌دهد. همچنین این نتایج نشان داد که در گیاهچه‌های T17 رشد یافته در محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار نمک، اندازه سلولها ثابت باقی مانده اما جداره‌های سلولی اندکی تغییر یافته و صاف شده‌اند (شکل ۴– ج). در این گیاهچه‌ها با تیمار نمک، تعداد

Archive of SID
www.SID.ir

روزنه‌ها در واحد سطح اندکی کاهش نشان داد (۱/۲±۸). نگاهی به داده‌های جدول ۱ نشان می‌دهد که شاخص روزنه‌ای در دو گیاهچه وحشی و تراریخت رشد یافته بر محیط MS تقریباً مشابه است. اما با تیمار نمک، این فاکتور در گیاهچه‌های وحشی افزایش چشمگیری یافته در حالی که در گیاهچه‌های تراریخت شاخص روزنه‌ای اندکی کاهش یافته است (جدول ۱).

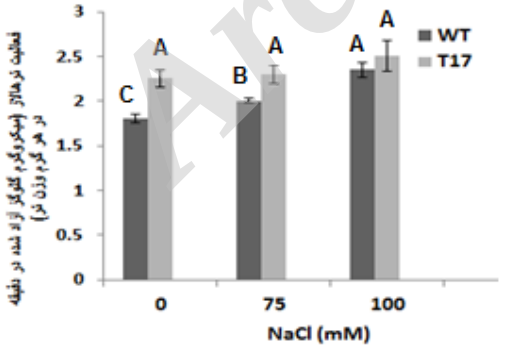
جدول ۱- شاخص روزنه‌ای در گیاهچه‌های وحشی (WT) و تراریخت شده با ژن *TRR17*(T17) پس از ۱۶ روز رشد بر روی محیط MS و یا محیط MS حاوی ۱۰۰ میلی مولار نمک. داده ها، حاصل میانگین ۴ تکرار است.

Plant	MS	MS+NaCl
WT	۰/۲۳	۰/۳۱
T17	۰/۲۲	۰/۱۹

شکل ۴- اپیدرم و روزنه برگیاهچه‌های وحشی آرابیدوپسیس (WT) وتراریخت‌شده با ژن *TRR14*(T17)الف) تصویر میکروسکوپ نوری معمولی از اپیدرم گیاهچه‌های وحشی بر روی محیط MS با بزرگنمایی ۴۰، ب)تصویر میکروسکوپ نورمارسکی از اپیدرم گیاهچه‌های وحشی بر روی محیط MS حاوی غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک با بزرگنمایی ۱۰ و ج) تصویر میکروسکوپ نورمارسکی از اپیدرم گیاهچه‌های T17 بر روی محیط MS حاوی غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک با بزرگنمایی ۱۰.

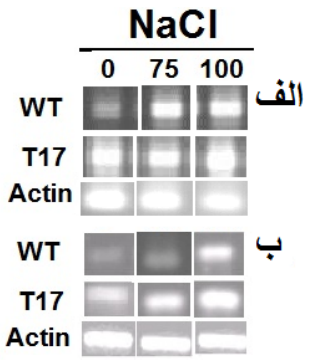
بررسی فعالیت آنزیم ترهالاز: بررسی میزان فعالیت آنزیم ترهالاز در گیاهچه‌های وحشی و تراریخت، نشان داد که در محیط فاقد نمک، فعالیت این آنزیم در گیاهچه‌های تراریخت به طور معنی‌داری بالاتر از گیاهچه‌های وحشی است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک در محیط کشت فعالیت این آنزیم در گیاهچه‌های وحشی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. اما فعالیت آنزیم ترهالاز در گیاهچه‌های تراریخت با تیمار شوری تغییر معنی‌داری را نشان نداد (شکل- ۵).

بررسی الگوی بیان ژن ترهالاز: بررسی وضعیت الگوی بیان ژن گیاهچه‌های رشدیافته در محیط MS، نشان داد که بیان ژن ترهالاز (*TRE*) در گیاهچه‌های تراریخت بالاتر از گیاهچه‌های وحشی است؛ اما با تیمار نمک بیان این ژن در گیاهچه‌های وحشی به طور چشمگیری افزایش می یابد. همچنین در گیاهچه‌های تراریخت نیز تغییر اندکی درالگوی بیان ژن ترهالاز مشاهده می شود (شکل ۶- الف).



شکل ۵- اثر تیمارغلظتهای مختلف NaCl بر فعالیت آنزیم ترهالاز در گیاهچه‌های وحشی (WT) و تراریخت شده با ژن *TRR14*(T17) پس از ۱۶ روز. داده ها، حاصل میانگین ۴ تکرار می باشد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۶- اثر تیمارغلظتهای مختلف NaCl بر الگوی بیان ژن الف) ترهالاز و ب) *TRR14* در گیاهچه‌های وحشی (WT) و تراریخت شده با ژن *TRR14*(T17) پس از ۱۶ روز.

بررسی الگوی بیان ژن : *TRR14*: نتایج حاصل از بررسی بیان ژن در دو گروه گیاهچه‌های وحشی و تراریخت شده با همین ژن، نشان داد که در گیاهچه‌های تراریخت میزان بیان این ژن بالاتر از گیاهچه‌های وحشی است؛ که این امر تأییدی بر تراریخت شدن این گیاه است. بررسی الگوی بیان ژن *TRR14*، نشان داد که بیان این ژن در گیاهچه‌های وحشی تیمار شده با غلظتهای مختلف نمک نسبت به گیاهچه‌های وحشی رشد یافته در محیط فاقد نمک افزایش اندکی نشان می‌دهد؛ اما در گیاهچه های رشد یافته در محیط حاوی ۱۰۰ میلی مولار نمک میزان بیان این ژن نسبت به گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت فاقد نمک، افزایش بیشتری نشان می‌دهد. در گیاهچه‌های تراریخت نیز بیان ژن *TRR14*، درغلظتهای مختلف نمک افزایش یافته است (شکل ۶- ب).

بحث

TRR14 پروتئین ناشناخته کوچکی به طول ۱۳۹ اسیدآمینه است. آنالیز فیلوژنی آشکار کرد که TRR14 یک عضو کوچک و منشعب از خانواده ژنی درآرابیدوپسیس است. پروتئین TRR14 در کلروپلاست جای داشته و در تمام بافتها بیان می شود (۶). این پروتئین دارای ۶ همولوگ در گیاه آرابیدوبسیس است و پارالوگهای این پروتئین در برنج و یونجه نیز شناسایی شده است (۱۵ و ۱۸). این پروتیین دارای دومین کیوپین منفرد با ساختار سوم است (۱۰) گزارشها نشان داده که پروتئینهای با ساختار کیوپین مانند ژرمین و پروتئین های مشابه ژرمین در پاسخ به تنشها نقش دارند (۸ و ۱۰).

نتایج تحقیقات حاضر نشان داد که تراریخت‌شدن گیاه *Arabidopsis thaliana* با ژن *TRR14*، سبب افزایش درصد جوانه‌زنی و میزان ماندگاری گیاهچه‌ها در تنش شوری می شود. همان‌گونه که پیش از این نیز نشان داده شد؛ تنش شوری سبب کاهش جوانه‌زنی و میزان ماندگاری در این گیاه می شود (۱۶). اثر شوری بر جوانه‌زنی تعدادی از گیاهان زراعی نظیر گندم و بادام زمینی مورد بررسی قرار گرفته است. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری درصد جوانه زنی کاهش می‌یابد (۱ و ۴). پیش از این نیز بررسیهای انجام شده بر روی گیاهان فاقد ژن *TRR14* نشان داده که این گیاهان قادر به جوانه زنی در محیط کشت حاوی نمک نبوده و در مقایسه با گیاهان وحشی حساسیت بیشتری به نمک دارند (۶). نتایج حاضر نشان داده که تراریخت شدن گیاهان با ژن *TRR14* می تواند سبب افزایش میزان جوانه زنی در محیط حاوی نمک شود.

تنش شوری سبب افزایش جذب سدیم توسط گیاه می شود (۱۲) که نتیجه آن افزایش میزان سدیم در دو بخش هوایی و ریشه گیاه است. از طرفی شوری سبب کاهش میزان پتاسیم بخش هوایی و ریشه می شود (۳). نتایج حاضر نیز نشان داده که تنش شوری سبب افزایش میزان سدیم در گیاهچه‌های وحشی و تراریخت شده است؛ اما میزان جذب سدیم در گیاهچه‌های وحشی به مراتب بالاتر از گیاهچه تراریخت بوده است. نکته مهم و قابل توجه در ارتباط با گیاهچه‌های تراریخت آن است که میزان پتاسیم داخلی این گیاهچه‌ها در شریط عاری از تنش، ۳ برابر کمتر از گیاهچه وحشی است. اما با تیمار ۷۵ میلی‌مولار نمک، میزان پتاسیم در هر دو نوع گیاهچه کاهش یافته است. علاوه بر این، گیاهچه‌های تراریخت در تیمار ۱۰۰

Archive of SID
www.SID.ir

میلی‌مولار نمک توانسته‌اند نسبت پتاسیم به سدیم را در خود بالا نگه دارند. بررسیها نیز نشان داده که چنانچه گیاه بتواند در تنش شوری توانایی جذب پتاسیم را نسبت به سدیم(K^+/Na^+) بالا نگه دارد قادر به مقاومت به تنش شوری خواهد بود (۳۴).

یکی از نشانه‌های تنش بر روی گیاهان تجمع آنتوسیانین می‌باشد (۳۰). نتایج حاضر نیز نشان داد که گیاهچه های تراریخت نسبت به گیاهچه‌های وحشی در تنش شوری میزان آنتوسیانین کمتری انباشته کرده‌اند که تأییدی بر مقاومت نسبی گیاهان تراریخت نسبت به تنش شوری است. گزارشهای پیشین نیز نشان داد که در تیمار شوری میزان فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان در گیاهان تراریخت بالاتر از گیاهچه‌های وحشی بوده که نشان دهنده فعال شدن سیستمهای آنتی اکسیدان جهت مقابله با تنش شوری بوده است (۷).

از جمله اثرات تنش بر گیاهان، تغییر تعداد و اندازه سلولهای اپیدرمی و روزنه است (۲). در نتایج حاضر، گیاهچه‌های تراریخت استراتژی کاهش تعداد روزنه در واحد سطح را به کار بسته‌اند تا در این شرایط از به هدر رفتن آب جلوگیری کنند. وان هوت و همکارن در سال ۲۰۱۳ نشان داده‌اند که در گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس مقاوم به خشکی، تعداد روزنه‌های برگ در واحد سطح گیاه در شرایط تنش کمترشده که نتیجه آن کاهش کمتر آب گیاه و مقاومت بهتر گیاهچه‌های تراریخت در تنش خشکی بوده است (۳۲).

بررسی الگوی بیان ژن نیز نشان داده که بیان ژن ترهالاز در گیاهچه‌های تراریخت بالاتر از گیاهچه وحشی است؛ که این امر باید در بررسیهای آتی مورد بحث بیشتری قرار گیرد تا رابطه بین بیش بیانی *TRR14* و ترهالاز مشخص شود. پیش از این نیز نشان داده شده که TRR14 در سیگنالینگ قند ترهالوز نقش دارد و ممکن است افزایش بیان ترهالاز در گیاهان تراریخت همین امر باشد. تیمار شوری سبب افزایش بیان ژن ترهالاز در گیاهچه وحشی شده است که به موازات آن افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم ترهالاز نیز دیده می شود. در مقابل تغییر اندکی در میزان بیان ژن ترهالاز در گیاه تراریخت دیده شده است. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ترهالاز نیز نشان داده که تنش شوری تغییر معنی‌داری را در فعالیت این آنزیم در گیاهان تراریخت ایجاد نکرد. نتایج تحقیقات وان هوت و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که تراریخت‌شدن گیاه *Arabidopsis thaliana* با ژن ترهالاز سبب افزایش مقاومت گیاهچه‌ها به تنش خشکی می شود. اگرچه باید در نظر داشت که در گزارش وان‌هوت و همکاران فعالیت آنزیم ترهالاز در گیاهچه های تراریخت ۱۰۰ برابر بالاتر از گیاهچه‌های وحشی بود (۳۲). در حالی که در تحقیق حاضر میزان افزایش فعالیت این آنزیم چندان بالا نبوده است. بنابراین به نظر نمی‌رسد که در این تحقیق علت مقاومت گیاهان تراریخت به تنش شوری ناشی از افزایش فعالیت آنزیم ترهالاز باشد.

بررسی الگوی بیان *TRR14* نیز نشان داده که شوری سبب افزایش بیان این ژن می شود و همین امر نشان‌دهنده نقش این ژن در مقاومت به شوری در گیاه Arabidopsis است. پیش از این نیز بررسیهای انجام شده بر روی گیاهان جهش یافته در ژن *TRR14* نشان داده که این گیاهان در مقایسه با گیاهان وحشی آرابیدوپسیس نسبت به تنش شوری حساسیت بیشتری دارند (۶). این نتایج نشان می دهد که تراریخت شدن گیاهان با ژن TRR14 می تواند سبب افزایش مقاومت آنها به تنش شوری شود.

در مجموع به نظر می‌رسد که گیاه Arabidopsis تراریخت شده با ژن *TRR14* با کاهش تعداد روزنه در واحد سطح توانسته با شوری مقابله نماید. با توجه به آنکه در گیاه تراریخت میزان پتاسیم سه برابر کمتر از گیاه وحشی می باشد، بنابراین کارهای بیشتری در این زمینه به ویژه بر روی کانالهای پتاسیم و یا بیان ژنهای مرتبط لازم است

Archive of SID

www.SID.ir

صورت گیرد تا نقش واقعی ژن *TRR14* در مقاومت به تنش روشن شود.

منابع

۱- افشارمحمدیان، م.، ابراهیمی نوکنده، س.، دمسی، ب.، و جمال امیدی، م.، ۱۳۹۴. بررسی تاثیر سطوح مختلف شوری بر جوانه زنی و شاخص های رشد چهار رقم بادام زمینی. مجله پژوهش های گیاهی. ۲۸(۱): ۳۳-۲۳.

۲- اقدسی، م.، ۱۳۸۰. تغییرات ریختی و تشریحی پنبه در تنش شوری ناشی از کلرور سدیم. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۸: ۸۸-۷۹.

۳- بندانی، م.، و عبدلزاده، ا.، ۱۳۸۶. اثر تغذیه سیلیکون در تحمل به شوری در گیاه پوکسینلیا دیستنس (*Puccinelliadistans*). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۴: ۱۱۹-۱۱۴.

۴- قلی نژاد، م.، .۱۳۹۳ تاثیر سطوح مختلف شوری بر جوانه زنی و رشد گیاهچه ژنوتیپ های مختلف گندم. مجله پژوهش‌های گیاهی. ۲۷ (۲): ۲۸۷-۲۷۶.

5- Aghdasi, M. 2007. Analysis of trehalose-6-phosphate control over carbon allocation and growth in plants. PhD Thesis, Utrecht University.

6- Aghdasi M,Fazli F and Bagherieh-Najar B, 2012. Analyses of *Arabidopsis* trr14 T-DNA insertion Mutants Reveal an Essential Role in Seed Germination. Plant Mol Biol Reporter, 30: 319-329.

7- Aghdasi M, Fazli F and Bagherieh-Najar B, 2012. Cloning and expression analysis of Arabidopsis *TRR14* gene under salt and drought stress. J Cell Mol Res, 4: 1-10.

8- Berna A and Bernier F. 1999. Regulation by biotic and abiotic stress of the wheatgermin gene encoding oxalate oxidase, an H2O2-producing enzyme. Plant Mol Biol, 39:539-459.

9- Brugnoli E and Lauter M, 1991. Effects of salinity conductance, photosynthesis capacity and carbon isotope discrimination of salt tolerant and salt –sensitive C_3 non-halophytes. Plant Physiol, 95:628-635.

10- Dunwell JM, Culham A, Carter CE, Sosa-Aguirve CR and Goodenough PW, 2001. Evolution of function divercity in the Cupin superfamily. Trends Biochem Sci. 26:740-745.

11- Elbin AD, Pan YT, Pastuszak I and Carroll D, 2003. New insights on trehalose: a mollification molecule. Glycobiology, 13: 17R-27R.

12- Garcia-Lidon JM, Ortiz JM, Garcia-Leqaz M and Creda A, 1998. Role of root Stock and scion on root and leaf ion accumulation in lemon trees grown under saline condition, Fruits, 53: 89-97.

13- Holmstrom KO, Mantyla E Welenin B, Mandal A and Palva ET, 1996. Drought tolerance in tobacco. Nature, 379: 683-684.

14- Karim S, Lundeh D, Holmostro M, Mandal A and Pirhonen M, 2005. Structural and functional characterization of AtPTR3, a stress induced peptide transporter of *Arabidopsis*. J Mol Model, 11: 226-236.

15- Kim JY, Park SG, Jung B, Jung C, Ann S, Gho K, Han O and Kung H, 2007. Functional characterization of a glycin-rich RNA-binding proein 2 in*Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. Plant J, 50: 439-451.

16- Kuak KJ, Kim YO and Kang H, 2005. Characterization of transgenic Arabidopsis plant overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration or cold stress. J Exp Bot, 56: 3007-3016.

17- Mahajan S, Pandey GK and Tuteja N, 2008. Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. Archives of Biochemistry and Biophysics, 471: 146–158.

18- Marcher-BauerA and Bryant SH, 2004. CD-Search: protein domain annotation on the fly. Nucleic Acids Res, 32:W327–W33.

19- Mita S, Murano N, Akaike M and Nakamura K, 1997. Mutants of Arabidopsis thaliana with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulationof anthocyanin thatis inducible by sugars. Plant J, 11: 841-851.

20- Muller, J., Boller, T., and Wiemken, A. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. Plant Sci, 8: 112-119.

21- Muller, J., Aeschbacher, R.A., Wingler, A., Boller, T. and Wiemken, A, 2001.Trehalose and trehalase in Arabidopsis. Plant Physiol, 125: 1086-1093.

22- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Ann Rev Plant Biol, 59: 651–681.

Archive of SID

www.SID.ir

23- Murashige T and Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol, 15: 473-479.

24- Nunes C, Scluepmann H, Delatte T, Wingler A, Silva AB, Feverio PS, Jansen M, Fiorani F, Wiese A, Paul M, 2013. Regulation of growth by trehalose pathway. Plant Signal Path, 8:1-3.

25- Pellny TK, Ghannoum O, Conroy JP, Schluepmann H, Smeekens S, Andralojc J, Krause KP, Goddijn O and Paul MJ, 2004. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. Plant Biotech J, 2: 71–82.

26- Prado FE, Gonzalez JA, Boero C and SampietroA R, 1998. A simple and sensitive method for determining reducing sugars in plant tissues. Application to quantify the sugar content in quinoa seedlings. Phytochem Analysis, 9: 58-63.

27- Sambrook J and Russell DW, 2001. Molecular Cloning: Lalaboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

28- Schluepmann H, Pellny T, Van Dijken A, Smeeekens S and Paul M, 2003. Trehalose- 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. Proc Nat Acad Sci USA, 100: 6849–6854.

29- Schluepmanne H, Van Dijken A, Aghdasi M,Wobbes B, Pual M and Smeekens S, 2004. Trehalose mediated growth inhabitation of Arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. Plant Physiol, 135: 879-890.

30- Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M and Smeekens S, 2005. Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis* Requires the MYB75/PAP1 Gene. Plant Physiol, 139: 1840-1852.

31- Van Dijken AJ, Schluepmann H and Smeekens SC, 2004. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. Plant Physiol, 135: 969-977.

32- Van Houtte H, Vandesteene L, Lopez-Galvis L, Lemmens L, Kissel E, Carpentier S, Feil R, Avonce N, Beeckman T, Lunn JE and Van Dijck P, 2013. Overexpression of the trehalase gene AtTRE1 leads to increased drought stress tolerance in *Arabidopsis* and involved in abscisic acid-induced stomatal closure. Plant Physiol, 161: 1158-1171.

33- Yashida R, Hobo T and Ichimura K, 2002. ABA –activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis.* Plant Cell Physiol, 43: 1473-1483.

34- Zhang Q, Su LL and Wu S, 2008. Characterization and expression of a vacuolar Na^+/H^+antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropuslittoralis*. Plant Physiol Biochem, 46: 117-126.

35- Zhu JK 2002. Salt and drought signal transduction in plants. Ann Rev Plant Physiol, 136: 2621-2632.

Archive of SID

www.SID.ir

An investigation on some physiological and molecular characterization of *TRR14* Re-transformed Arabidopsis plant under salt stress

Aghdasi M. and Moghadam N.

Biology Dept., Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, I.R. of Iran

Abstract

TRR14 is a small protein which is located in chloroplast. This protein was first identified in screening of trehalose resistant (TRR14) *Arabidopsis* seedlings. The aim of present study was physiological and molecular investigation of *TRR14* re-transformed (T17) seedlings under salt stress, compared to wild type *Arabidopsis* seedlings (WT). For this purpose, WT and T17 seeds were grown on MS medium complemented with 0, 75, 100 and 150 mM NaCl. The results showed that under salt stress, the germination rate and trehalase activity in T17 seedlings were higher than WT. Meanwhile the results showed that anthocyanin level in WT seedlings was higher than T17 under salt stress. The Na level was highly increased in WT seedlings under 75 mM NaCl treatment, compared to T17 seedlings. The K measurements revealed that the K level in T17 seedling was 3 times more than WT seedling when grown on MS medium. But K level was decreased under 75 mM NaCl treatment in both WT and T17 seedlings. On the other hand, by adding NaCl to medium culture, the shape and size of epidermal cells were changed in both WT and T17 seedlings. While stomata numbers increased in WT leaves under NaCl treatment, it remained unchanged in T17 seedlings. The gene expression pattern showed that trehalase and *TRR14* expression were increased under salt stress.

Key words: TRR14, Salt stress, Germination rate, Gene expression, trehalase

Archive of SID

www.SID.ir