

## 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 زیست‌شناسی

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 تراریخت‌شده با ژن *TRR14* در محیط کشت *MS* حاوی غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) 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 به طور 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.

واژه‌های کلیدی: *TRR14*، تنش شوری، جوانه زنی، بیان ژن، ترهالاز

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

### مقدمه

گرفته‌اند. در پاسخ به تنش‌های محیطی بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیکی 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

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

TRR14، پروتئین کوچکی به طول ۱۳۹ اسید آمینه است که توسط ژن At4g10300 کد می‌شود. 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 می‌شود. این نتایج نشان داد که پروتئین TRR14 در سیگنالینگ قند ترهالوز در گیاهان نقش دارد (۵). بررسی‌های اولیه نشان داده که تراخت شدن 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 تراخت رشد یافته در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار نمک، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز بالاتر از گیاهچه‌های 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 می‌تواند با اثر بر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی مهم گیاه نظیر تولید سیستم ریشه‌ای گسترده برای جذب آب و مواد غذایی 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 می‌شود (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 تراخت *TRR14* در مقایسه با گیاه وحشی در تنش شوری است.

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 می‌شود. سپس T6P توسط آنزیم ترهالوز-۶-فسفات فسفاتاز (TPP) دفسفریله شده و ترهالوز تولید می‌شود. در مسیر متابولیسم ترهالوز در گیاهان، این قند توسط آنزیم ترهالاز شکسته شده و به دو مولکول گلوکز تجزیه می‌شود (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. تراخت شدن گیاه تنباکو با ژن ترهالوز-۶-فسفات سنتاز مخمر (*ScTPSI*) تحت پروموتور رویسکو یا CaMV 35S promotor سبب افزایش مقاومت آن به تنش خشکی شده است. همچنین ثابت شده است که برگهای گیاهان تراخت شده با این ژن از توازن آبی بهتری برخوردار هستند (۱۳ و ۱۴). از طرفی دیگر تراخت 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).

## 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 سپس ۱۰ 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 سانتی‌گراد نگهداری شده و بعد به اتاق کشت با دمای  $24 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد 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 روزنه‌ها 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:

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

اندازه‌گیری 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 میلی‌لیتر 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:

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

$$A = \text{میزان نسبی آنتوسیانین}$$

$A_{530}$  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 و ۲۶). به این منظور ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاهی با ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل محلول ۵۰ میلی‌مولار مورفولین اتان سولفونیک اسید (MES) با pH: 6.8، محلول ۱ میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید، محلول ۱ درصد تریتون X100 و محلول ۱ درصد پلی‌ونیل پیرولیدون) در هاون چینی سرد هموژن شد. پس از ۲ ساعت قرارگرفتن در دمای صفر درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. به منظور سنجش فعالیت آنزیم ترهالاز، ابتدا ۷۰۰ میکرولیتر از بافر ۵۰ میلی‌مولار MES به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰۰ میلی‌مولار 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 نمونه‌ها در ۴ بازه زمانی ۰، ۱۵، ۳۵ و ۴۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نهایت بازه زمانی ۰ و ۴۵ دقیقه انتخاب شد. به منظور توقف فعالیت آنزیم ترهالاز نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم ترهالاز بر اساس میکروگرم

(Actin: and tagatggggacggtggag و  
 gtatggggacggtggag and aactgatcgggatggagt)  
 کمک نرم افزار 3 Primer 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 غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار  
 نمک اصلاً بذرها قادر به جوانه‌زنی نبودند (شکل ۱-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. از طرفی بررسی جوانه‌زنی  
 بذرها 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 میلی‌مولار نیز  
 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 میلی‌مولار نمک ابتدا به رنگ سفید

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

**اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم:** مقدار ۵۰ میلی‌گرم از  
 نمونه‌های خشک آسیاب شده به مدت ۰/۵ ساعت در  
 دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد 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.

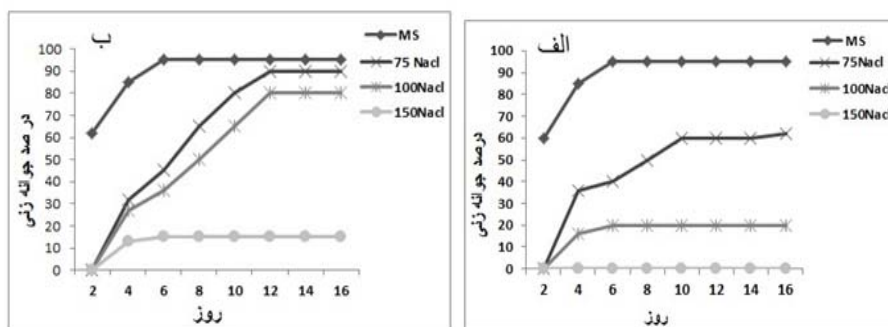
**استخراج RNA و RT-PCR:** استخراج RNA از گیاهچه-  
 های آراییدوپسیس طبق روش Sambrook و Russell  
 (۲۰۰۱) صورت گرفت (۲۷).

واکنش RT-PCR با استفاده از کیت Prime Script One  
 (TAKARA BIO) Step RT-PCR (INC Japanese) انجام  
 شد. این واکنش در حجم کلی ۲۵ 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 ,  
 TRR14: attgtgagcaactgggatg .ttcttcttccacgttga)

درآمده و پس از مدتی از بین رفتند؛ اما گیاهچه‌های

تراریخت در همین محیط قادر به ادامه حیات بودند.



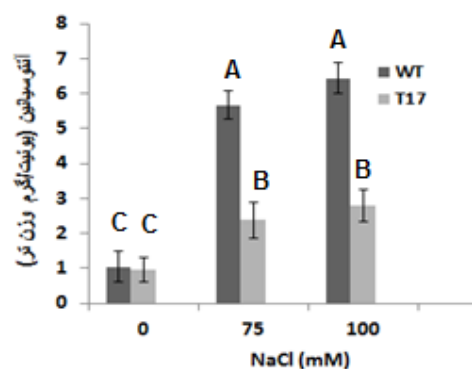
شکل ۱- درصد جوانه‌زنی الف) گیاهچه‌های وحشی (WT) و ب) گیاهان تراریخت شده با ژن *TRR14(T17)* بر روی محیط کشت MS حاوی غلظتهای مختلف NaCl در طی یک دوره ۱۶ روزه.

اندازه‌گیری 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 معنی‌داری افزایش یافت؛ اما میزان سدیم در گیاهچه‌های تراریخت به طور معنی‌داری کمتر از گیاهچه‌های وحشی است. میزان سدیم در گیاهچه‌های 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 داد در حالی که در همین محیط میزان پتاسیم در گیاهچه‌های تراریخت افزایش ۱۲ برابری را نشان داد (شکل ۳-ب).

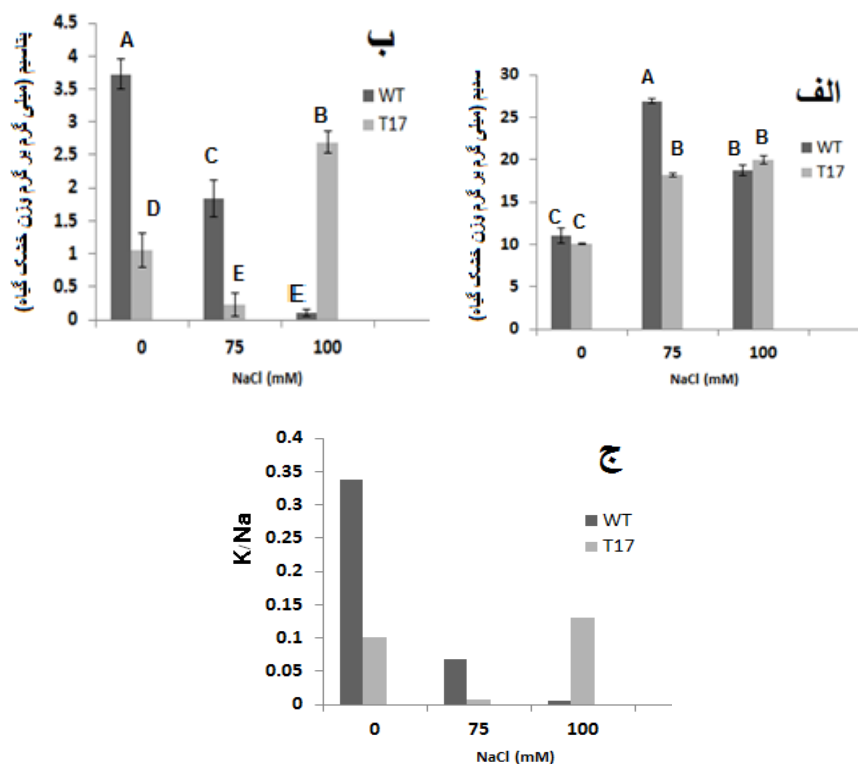
بررسی نسبت پتاسیم به سدیم نیز نشان داد که در محیط فاقد نمک و محیط حاوی ۷۵ میلی مولار نمک، این نسبت در گیاهچه‌های وحشی بالاتر از گیاهچه‌های تراریخت است؛ اما با افزایش میزان نمک تا ۱۰۰ میلی مولار، این

اندازه‌گیری 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 میلی مولار 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 رشد یافته 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. داده‌ها، حاصل میانگین چهار تکرار است.

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) پنتاسیم و ج) نسبت پنتاسیم به سدیم (K/Na) در گیاهچه‌های وحشی (WT) و تراریخت شده با ژن *TRR14(T17)* پس از ۱۶ روز. داده‌ها، حاصل میانگین چهار تکرار می‌باشد.

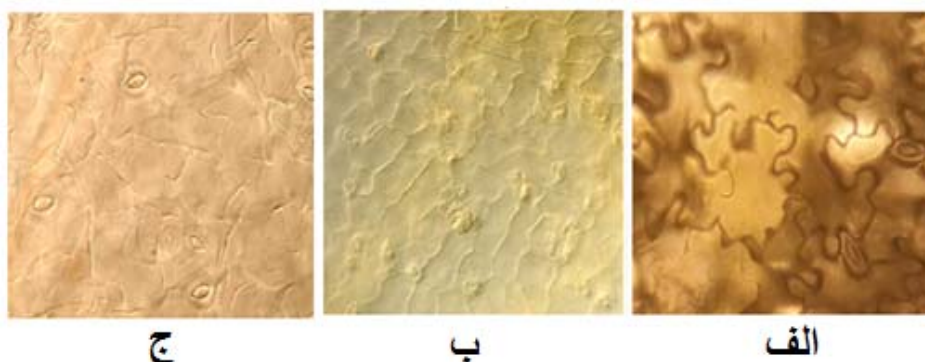
کوچک‌تر شده اما تعداد روزنه‌ها در واحد سطح افزایش یافته است (شکل ۴-ب). تعداد روزنه‌ها در واحد سطح اپیدرم گیاهچه‌های وحشی رشدیافته بر روی محیط MS، برابر با  $9 \pm 1/3$  است؛ در حالی که در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار نمک تعداد روزنه به  $20 \pm 2/1$  افزایش یافته است. در مقابل در گیاهچه‌های تراریخت رشدیافته در محیط فاقد نمک تعداد روزنه در واحد سطح  $11 \pm 1/3$  می‌باشد که تفاوت معنی‌داری را با تعداد روزنه‌ها 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

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 معنی‌داری 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

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. داده‌ها، حاصل میانگین ۴ تکرار است.

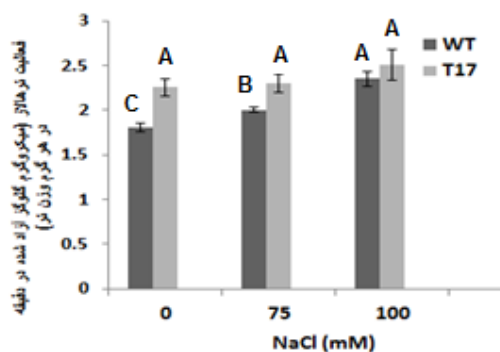
Plant	MS	MS+NaCl
WT	۰/۲۳	۰/۳۱
T17	۰/۲۲	۰/۱۹

روزنه‌ها در واحد سطح اندکی کاهش نشان داد ( $1/2 \pm 0.8$ ). 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).



شکل ۴- اپیدرم و روزنه برگ‌های وحشی آرابیدوپسیس (WT) و تراریخت شده 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 میلی مولار نمک با بزرگنمایی ۱۰ (ج) تصویر میکروسکوپ نورمارسکی از اپیدرم گیاهچه‌های T17 بر روی محیط MS حاوی غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک با بزرگنمایی ۱۰.

همچنین در گیاهچه‌های تراریخت نیز تغییر اندکی در الگوی بیان ژن ترهالاز مشاهده می‌شود (شکل ۶- الف).



شکل ۵- اثر تیمار غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت آنزیم ترهالاز در گیاهچه‌های وحشی (WT) و تراریخت شده با ژن *TRR14(T17)* پس از ۱۶ روز. داده‌ها، حاصل میانگین ۴ تکرار می‌باشد.

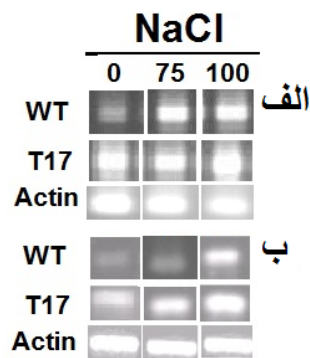
بررسی فعالیت آنزیم ترهالاز: بررسی میزان فعالیت آنزیم ترهالاز در گیاهچه‌های وحشی و تراریخت، نشان داد که در محیط فاقد نمک، فعالیت این آنزیم در گیاهچه‌های تراریخت به طور معنی‌داری بالاتر از گیاهچه‌های وحشی است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک در محیط کشت فعالیت این آنزیم در گیاهچه‌های وحشی به طور معنی‌داری 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 رشد یافته 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 می‌یابد.

دارای دومین کیوپین منفرد با ساختار سوم است (۱۰) گزارش‌ها نشان داده که پروتئین‌های با ساختار کیوپین مانند ژرمین و پروتئین‌های 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 می‌شود. همان‌گونه که پیش از این نیز نشان داده شد؛ تنش شوری سبب کاهش جوانه‌زنی و میزان ماندگاری در این گیاه می‌شود (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 تراریخت‌شدن گیاهان با ژن *TRR14* می‌تواند سبب افزایش میزان جوانه زنی در محیط حاوی نمک شود.

تنش شوری سبب افزایش جذب سدیم توسط گیاه می‌شود (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 می‌شود (۳). نتایج حاضر نیز نشان داده که تنش شوری سبب افزایش میزان سدیم در گیاهچه‌های وحشی و تراریخت‌شده 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 شرایط 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



شکل ۶- اثر تیمار غلظت‌های مختلف NaCl بر الگوی بیان ژن الف) تره‌لاز 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 تراریخت‌شدن 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 گیاهچه‌های رشد یافته در محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار 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* در غلظت‌های مختلف نمک افزایش یافته است (شکل ۶-ب).

## بحث

*TRR14* پروتئین ناشناخته کوچکی به طول ۱۳۹ اسیدآمینو است. آنالیز فیلوژنی آشکار کرد که *TRR14* یک عضو کوچک و منشعب از خانواده ژنی در آرکیدوپسیس است. پروتئین *TRR14* در کلروپلاست جای داشته و در تمام بافتها بیان می‌شود (۶). این پروتئین دارای ۶ همولوگ در گیاه آرکیدوپسیس است و پارالوگ‌های این پروتئین در برنج و یونجه نیز شناسایی شده است (۱۵ و ۱۸). این پروتئین



شوری سبب افزایش بیان ژن ترهالاز در گیاهچه وحشی شده است که به موازات آن افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم ترهالاز نیز دیده می‌شود. 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 می‌شود. اگرچه باید در نظر داشت که در گزارش وان هوت و همکاران فعالیت آنزیم ترهالاز در گیاهچه‌های 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 می‌شود 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 می‌دهد که تراریخت شدن گیاهان با ژن *TRR14* می‌تواند 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 می‌باشد، بنابراین کارهای بیشتری در این زمینه به ویژه بر روی کانالهای پتاسیم و یا بیان ژنهای مرتبط لازم است

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 گیاهچه‌های 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 همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده‌اند که در گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس مقاوم به خشکی، تعداد روزنه‌های برگ در واحد سطح گیاه در شرایط تنش کمتر شده 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

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): ۲۳-۳۳.
- ۲- اقدسی، م.، ۱۳۸۰. تغییرات ریختی و تشریحی پنبه در تنش شوری ناشی از کلرور سدیم. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۸: ۷۹-۸۸.
- ۳- بندانی، م.، و عبدالزاده، ا.، ۱۳۸۶. اثر تغذیه سیلیکون در تحمل به شوری در گیاه پوکسینلیا دیستنس (*Puccinellia distans*). 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 پژوهش های 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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<sub>3</sub> non-halophytes. *Plant Physiol*, 95:628-635.
- 10- Dunwell JM, Culham A, Carter CE, Sosa-Aguirve CR and Goodenough PW, 2001. Evolution of function diversity 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, Lunde D, Holmstro 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-Bauer A 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 accumulation of anthocyanin that is 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.

- 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, Schluemann 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, Schluemann 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 Sampietro A 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: Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 28- Schluemann H, Pellny T, Van Dijken A, Smeekens 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- Schluemann H, Van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M and Smeekens S, 2004. Trehalose mediated growth inhibition 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, Schluemann 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 Dijk 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus litoralis*. *Plant Physiol Biochem*, 46: 117-126.
- 35- Zhu JK 2002. Salt and drought signal transduction in plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 136: 2621-2632.

## 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