

بررسی ارتباط فرایان ژن P5CS و تغییرات آنٹی اکسیدان های غیر آنزیمی در گیاه تراریخت تنباکو تحت تنش شوری در شرایط کشت درون شیشه

بهاره سادات خاتون آبادی^۱، علی اکبر احسان پور^{۲*}، امیرحسین فرقانی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۲. استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۳. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۰۳

چکیده

ژن P5CS (پرولین-۵- کربوکسیلات-سنتتاز) کد کننده آنزیم کلیدی در مسیر سنتز پرولین است و به عنوان یک اسمولیت باعث افزایش مقاومت گیاه به شوری می شود. ابتدا گیاهان تراریخت با فرا بیان ژن P5CS و غیر تراریخت انتخاب گردیدند. تأیید حضور ژن P5CS در گیاهان تراریخت شده با تکنیک PCR با آغازگر اختصاصی ژن NPTII:P5CS انجام شد. به منظور بررسی صفات فیزیولوژیکی، گیاهان تراریخت و غیر تراریخت به محیط کشت MS حاوی غلظت های صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک (NaCl) منتقل گردیدند. پس از چهار هفته نتایج نشان داد که مقادیر وزن تر، وزن خشک و کلروفیل در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت در پاسخ به شوری کمتر کاهش یافت. همچنین گیاهان تراریخت سدیم کمتری را نسبت به گیاهان غیر تراریخت در برگ تجمع دادند. سطح ترکیبات فنلی، آنتوسیانین و فلاونوئید در گیاهان تراریخت کمتر از گیاهان غیر تراریخت مشاهده شد. علاوه بر گیاهان تراریخت در تمام غلظت های نمک نسبت به غیر تراریخت افزایش معنی داری در میزان پرولین مشاهده شد. میزان آسکوربات در گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تغییر معنی داری نداشت ولی پراکسید هیدروژن در اثر تنش شوری در گیاهان تراریخت نسبت به غیر تراریخت کاهش معنی داری را نشان داد؛ بنابراین به نظر می رسد گیاهان تراریخت با افزایش پرولین و تغییر برخی از آنٹی اکسیدان های غیر آنزیمی مقاومت به شوری بیشتری نشان داد.

واژه های کلیدی: آسکوربات، تحمل به شوری، پرولین، فلاونوئید، فنل

مقدمه

غلظت های بالای نمک در خاک سبب تنش اسمزی شده و بنابراین جذب آب را از خاک کاهش می دهد. علاوه بر این مشخص شده است که بیشترین اثرات نامطلوب شوری مربوط به سدیم (Na^+) و کلر (Cl^-) است (Ahmad et al., 2013). تجمع و انباشتگی سدیم در سلول می تواند به سرعت منجر به تنش اسمزی و مرگ سلول شود. در واقع سمیت یونی نتیجه جایگزینی Na^+ با یون هایی همچون پتاسیم (K^+) است. K^+ به عنوان یک اسمولیت و همچنین به عنوان کوفاکتور در برخی از آنزیم ها عمل می کند

رشد و تولید محصول گیاهان به شدت تحت تأثیر تنش های محیطی مختلف قرار دارد. تنش شوری تقریباً بر تمام مراحل نمو و تکامل گیاه از جمله جوانه زدن، رشد جوانه، رشد رویشی، گلدهی و میوه دهی تأثیر گذار است (Sairam and Tyagi, 2004). افزایش یون های خاک، سمیت یونی، تنش اسمزی، کاهش یون های غذایی (Zn, Fe, P, K, Ca, Na) و تنش اکسیداتیو در گیاهان را به همراه دارد. شوری همچنین به طور غیر مستقیم تولیدات گیاهی را از طریق اثرات شدید بر روی رشد باکتری های همزیست و مفید محدود می کند.

ارتباط مثبت بین تجمع پرولین و تحمل و مقاومت به تنش شوری را تأیید می‌نمایند. باین وجود گزارش‌های متناقضی هم وجود دارد (Ehsanpour and Fatahian, 2003; Stewart and Lee, 1974).

پرولین در تنش شوری در حفظ متابولیسم و سنتز پروتئین (Trotel-Aziz et al., 2000)، تعادل اسمزی داخل سلولی (Santos et al., 1996)، حفاظت آنزیم‌های سلولی و ساختار پروتئین‌ها (Poljakoff-Mayber et al., 1994; Thompson et al., 1986)، حفاظت ساختارهای داخل سلولی (Iyer and Caplan, 1998; Van Rensburg et al., 1993)، منبع ذخیره کربن و نیتروژن (Lutts et al., 1993)، تنظیم pH سلولی (Stewart and Lee, 1974; Santos et al., 1996; Venekamp, 1989) و به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند (Chinnusamy et al., 2006). مسیر سنتز پرولین با گلوتامیک اسید شروع می‌شود. گلوتامیک اسید دارای دو عامل کربوکسیل و یک عامل آمینی است که توسط آنزیم Δ -پرولین-5-کربوکسیلات سنتاز (P5CS) و با مصرف یک ATP و اکسید شدن NADPH، گروه کربوکسیل آن که دور از عامل آمینی قرار دارد، تبدیل به گروه آلدهیدی شده و گلوتامیک سمی آلدهید (GSA) را ایجاد می‌کند. عامل آلدهیدی این ترکیب به عامل آمینی چسبیده و به صورت خودبه‌خود و بدون واسطه یک حلقه پنج‌تایی را تشکیل می‌دهد. ماده جدید Δ -پرولین-5-کربوکسیلات (P5C) نام دارد. در ادامه فرایند، ماده اخیر به کمک آنزیم Δ -پرولین-5-کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR) و اکسید شدن NADPH، به L-پرولین تبدیل می‌گردد (Thompson, 1980). مشخص شده است که در اثر تنش شوری و کمبود آب، نسخه‌برداری از ژن‌های مربوط به آنزیم‌های P5CS و P5CR القا می‌شود (Delauney and Verma, 1993; Hu et al., 1992; Peng et al., 1996). اولین بار cDNA مربوط به P5CS از گیاه *Vigna aconitifolia* کلون و جداسازی شده است. cDNA مربوط به آنزیم P5CR نیز از سویا، نخود و آرابیدوپسیس کلون و جداسازی شده است (Yoshiba et al., 1997). ارتباط بین ژن‌های P5CS و P5CR و تجمع پرولین در آرابیدوپسیس بررسی و مشخص شده است که القای ژن P5CS تجمع پرولین را بالا می‌برد. این موضوع پیشنهاد می‌کند که P5CS یک نقش کلیدی در بیوسنتز پرولین تحت تنش اسمزی به عهده دارد (Nanjo et al., 1999; Per et al., 2017). بعلاوه

که تحت تنش شوری، توسط Na^+ جایگزین شده و آنزیم غیرفعال می‌گردد. غلظت بالای پتاسیم همچنین برای پیوند tRNA به ریبوزوم‌ها و در نهایت سنتز پروتئین ضروری است. سمیت یونی و تنش اسمزی سبب عدم تعادل متابولیکی شده که در نهایت منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. همه این عوامل در نهایت به توقف رشد، آسیب‌های مولکولی و مرگ گیاه ختم می‌شود (Chinnusamy et al., 2005).

برای ایجاد تحمل به شوری، ممانعت از ایجاد آسیب‌ها و یا کاهش تخریب‌ها و یا برقراری مجدد شرایط هموستازی در محیط جدید برای حفظ و ادامه رشد گیاه پیشنهاد شده است (Zhu, 2000). در طی چند سال گذشته گروهی از ژن‌های کد کننده پروتئین‌های مختلف ساختاری و تنظیمی مورد استفاده قرار گرفته‌اند تا بتوانند گیاهان نسبتاً متحمل به تنش‌های غیر زیستی تولید کنند. به نظر می‌رسد استفاده از ژن‌های تنظیم‌کننده همانند کولین اکسیداز، آرژنین دکربوکسیلاز و بتائین دهیدروژناز و غیره برای اصلاح و توسعه گیاهان متحمل به تنش، روش مؤثرتری است؛ بنابراین درک پایه و اساس مولکولی مکانیسم‌های مقاومت به تنش سبب توسعه راهکارهای گزینش در تحمل به تنش شوری شده و شناسایی نشانگرهای مولکولی مربوط به صفات تحمل به شوری و خشکی ابزار جدیدی برای تولید رقم‌های متحمل به شوری و خشکی در اختیار محققین اصلاح نباتات قرار می‌دهد (Sairam and Tyagi, 2004). در سال‌های اخیر دسته‌ای از ژن‌ها با عملکرد حفاظت اسمزی برای تحمل و مقاومت به تنش شوری مورد توجه واقع شده‌است. تحت شرایط تنش اسمزی، گیاهان اسمولیت‌های آلی از قبیل پرولین، گلاسیسین بتائین، پلی‌اول‌ها، قندهای الکلی (سوربیتول، مانیتول و گلیسرول) و قندهای محلول (گلوکز و سوکروز) را افزایش می‌دهند تا بتوانند تنش اسمزی را تعدیل نمایند (Iqbal et al., 2014). در بسیاری از گیاهان مقاومت به شوری با تجمع پرولین در برگ‌ها حاصل شده است. این قبیل آمینواسیدها می‌توانند غشاها و پروتئین‌ها را در مقابل اثرات زیان‌آور تجمع یون‌ها همچون سدیم و کلر محافظت کنند. تجمع پرولین در سیتوپلاسم با کاهش غلظت محلول‌های سازگار دیگر و افزایش حجم آب سیتوزولی همراه است (Iqbal et al., 2014). مشخص شده است که با قرار دادن جو زراعی در معرض تنش اسمزی، اختلافات فاحشی در ظرفیت تجمع پرولین، حتی با وجود مشابه بودن پتانسیل آب برگ مشاهده می‌شود (Stewart and Larher, 1980). برخی گزارش‌ها

و تغییرات آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت تحت تنش شوری است.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و رشد گیاه تنباکو در محیط MS

بذرهای گیاهان تنباکو *Nicotiana glauca* تراریخت [حاوی ژن P5CS:NPTII، این گیاه در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان به‌صورت تراریخته درآمده است و بذر T3 آن در آزمایش حاضر مورد استفاده قرار گرفت (Razavizadeh and Ehsanpour, 2009)] و غیرتراریخت از آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان تهیه شد. ابتدا بذرهای دو تا سه نوبت با آب مقطر شستشو سپس به مدت یک دقیقه در محلول اتانول ۷۰٪ و پس از آن به محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲۰ درصد حجمی به مدت ۱۵ دقیقه منتقل شدند. سپس بذرهای سه بار با آب مقطر استریل شستشو و بذرهای استریل در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت شدند. شیشه‌های حاوی بذرهای کشت شده در اتاق کشت با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی (۹۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵-۹۸٪ نگهداری شد. از گیاهان حاصل از کشت بذر (شکل ۱) برای تکثیر و تولید انبوه گیاه در شرایط استریل استفاده گردید. پس از تأیید حضور ژن P5CS در گیاهان تراریخت یکی از گیاهان تراریخت تأیید شده و همچنین گیاه غیر تراریخت از طریق کشت جوانه جانبی به تعداد زیادی به منظور یکسان سازی روی محیط کشت MS تکثیر و سپس از این گیاهان به منظور اعمال تیمار شوری استفاده شدند (شکل ۲). جهت اعمال تیمار شوری، جدا کشت‌های ساقه گیاهان تنباکو تراریخت و غیرتراریخت، به محیط کشت MS با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl با ۳ تکرار در هر تیمار منتقل شدند. چهار هفته پس از کشت گیاهان از محیط کشت خارج و شاخص‌های مورفو-فیزیولوژیک بررسی شدند.

تأیید تراریخت بودن گیاهان با کمک PCR

پس از تکثیر گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تنباکو برای تأیید حضور ژن P5CS در آنها، آزمایش‌های PCR صورت

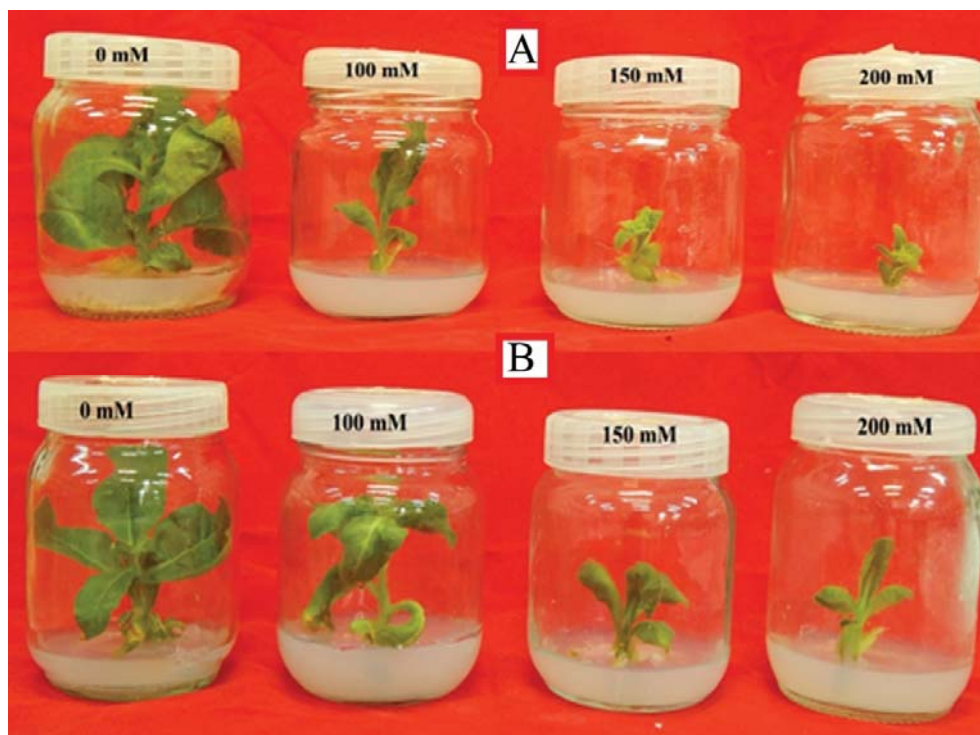
تحمل به تنش‌های غیر زیستی مخصوصاً تنش شوری و افزایش و بهبود رشد، در تعدادی از گیاهان تراریخت، مشاهده شده است (Maggio et al., 2002). دو ژن مربوط به P5CS در آرابیدوپسیس، یونجه و گوجه شناسایی شده است. گزارش شده است که At P5CS1 در بیشتر اندام‌ها و بافت‌های تمایز یافته آرابیدوپسیس، تحت تنش شوری و خشکی بالا و نیز تیمار ABA افزایش می‌یابد، ولی در کشت‌های سلولی در حال تقسیم و در غیاب تنش، فرا بیان ژن P5CS1 مشاهده نشده است (Armengaud et al., 2004; Hare et al., 1999; Kishor et al., 2005).

تولید سریع و انباشتگی گونه‌های اکسیژنی کنشگر (Reactive Oxygen Species)، پاسخی است که گیاه نسبت به تغییر شرایط و فاکتورهای محیطی می‌دهد (Hasanuzzaman et al., 2012). بافت‌های گیاهان دارای چندین آنزیم خنثی‌کننده ROS می‌باشند که قادر به حذف، خنثی‌سازی و یا پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و حد واسط‌های اکسیدان هستند (Khan et al., 2013; Hasanuzzaman et al., 2012). گیاهان علاوه بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی را نیز برای تصفیه و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد تحت تنش شوری به کار می‌برند. آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل مولکول‌هایی مانند اسید آسکوربیک، گلوکاتایون، α توکوفرول، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی و غیره است. اسید آسکوربیک و توکوفرول هابه‌وسيله انتقال اتم‌های هیدروژن به رادیکال‌های ROS آنها را احیا کرده و همین امر آنها را به آنتی‌اکسیدان‌های مؤثری تبدیل کرده است (Hasanuzzaman et al., 2012; Hasanuzzaman et al., 2013; Khan et al., 2012).

اگرچه مطالعات متعددی توسط محققین مختلف در زمینه افزایش مقاومت به شوری گیاهان با افزایش تولید پرولین در گیاهان تحت تنش صورت گرفته است، اما اطلاعات کمی در زمینه تغییرات فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی گیاهان تراریخت با فرا بیان ژن P5CS منتشر شده است. مطالعه قبلی ما در خصوص گیاه تنباکو با فرا بیان ژن P5CS بیانگر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شبیه کاتالاز و آسکوربات در پاسخ به تنش خشکی (Ehsanpour et al., 2011) و شوری (Riahi and Ehsanpour, 2013) است؛ بنابراین هدف این بررسی دامنه تحمل به شوری در گیاهان تنباکو با فرا بیان ژن P5CS و پاسخ‌های فیزیولوژیک



شکل ۱. بذره‌های گیاهان تراریخت T3 در محیط کشت MS حاوی کانامایسین
Fig. 1. Tobacco transgenic (T3) seeds cultured on MS medium containing kanamycin



شکل ۲. جدا کشت‌های ساقه گیاهان تنباکو غیر تراریخت (A) و تراریخت (B) در محیط کشت MS حاوی ۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک.

Fig. 2. Tobacco explants non-transgenic (A) and transgenic (B) cultured on MS medium containing 0, 100, 150 and 200 mM salt

استفاده از دانه‌های کوچک شیشه در یک سانتریفیوژ تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر خرد گردید. سپس به هر یک از تیوب‌ها ۲۵۰ میکرو لیتر بافر استخراج شامل CTAB (1.4 M NaCl, ۱۰۰ mM Tris pH 8.0, 3% CTAB) اضافه گردید.

گرفت. ابتدا DNA بر اساس روش استفاده‌شده توسط احسان‌پور و توئل در سال ۲۰۰۵ استخراج شد (Ehsanpour and Twell, 2005). به‌طور خلاصه، برای استخراج DNA حدود ۰/۱ گرم از برگ‌های گیاه تنباکو تراریخت و شاهد با

بخش هوایی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵°C درون آون قرار داده شد و در پایان وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

سدیم و پتاسیم

ابتدا تمام بخش‌های هوایی گیاهان تراریخت و غیر تراریخت به‌طور جداگانه به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و سپس نمونه‌ها پودر ۰/۰۱ گرم پودر خشک حاصل با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال انکوبه شد. سپس نمونه‌ها با کاغذ صافی، صاف گردیده و مقدار سدیم و پتاسیم با دستگاه شعله سنج یا Flame photometer (Halstead Essex-corning) با استفاده از محلول‌های استاندارد تعیین گردید (Shi et al., 2012).

رنگیزه‌های فتوسنتزی

ابتدا ۰/۱ گرم بافت تازه برگ گیاهان وزن گردید و با کمک استون ۸۰٪ روی یخ و در تاریکی سائیده شدند. مخلوط به‌دست‌آمده با کمک کاغذ صافی درون بالن ژوژه صاف گردید و حجم عصاره به‌دست‌آمده با استون ۸۰٪ به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160, Japan) در طول موج‌های ۶۴۷، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. از استون ۸۰٪ به‌عنوان نمونه بلانک استفاده گردید. در نهایت مقدار کلروفیل a، b و کل و کاروتنوئید برحسب میلی‌گرم در گرم بافت گیاهی محاسبه گردید (Arnon, 1949).

پرویلین

برای اندازه‌گیری پرویلین ۴۰ میلی‌گرم از بافت برگ گیاهان تراریخت و غیرتراریخت وزن و هر نمونه با ۱/۷ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ به‌خوبی سائیده شد تا به‌طور کامل یکنواخت گردد. عصاره‌های حاصل درون اپندورف منتقل و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۴۰۰ rpm (Eppendorf AG 5415D) سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی برداشت و به داخل لوله‌های آزمایش منتقل گردید و به آن ۱ ml اسیداستیک گلاسیال و ۱ ml معرف نین‌هیدرین به هر لوله اضافه شد. سپس نمونه‌ها به بن ماری با دمای ۱۰۰°C به مدت یک ساعت انتقال داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها، به‌طور دقیق به هر لوله ۲ ml تولوئن اضافه شد. سپس ۱ ml از فاز بالایی برداشته و جذب ترکیب رنگی هر نمونه در دو

تیوب‌ها به‌آرامی ورتکس و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داشته شدند. سپس به مقدار هم‌حجم نمونه (۲۵۰ میکرولیتر) از محلول ایزوآمیل الکل/کلروفرم (IAA) به نسبت ۱:۲۴ اضافه و به‌خوبی مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از انتقال محلول رو شناور (۲۰۰ میکرولیتر) به تیوب جدید، حدود ۱۴۰ میکرولیتر از محلول ایزوپروپانول سرد به آن افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس به‌خوبی مخلوط گردیده و به مدت ۷ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و سپس محلول رو شناور دور ریخته شد. رسوب حاصل با یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ گردید. اتانول دور ریخته شد و رسوب DNA خشک گردید. سپس حدود ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه و DNA به‌صورت شناور درآمد سپس تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. DNA استخراج‌شده برای انجام آزمایش‌های PCR استفاده گردید. آنالیزهای PCR برای تأیید گیاهان تراریخت با پرایمر Ehsanpour and Twell, NPTII+ P5CS صورت گرفت (2005).

FW: 5'-CGT TGG CTA CCC CTG ATA TT-3'

RV: 3'-CTT CTT TCT TCG CGA GTG AC-5'

واکنش PCR در دستگاه Master Cycler ساخت

کارخانه Eppendorf انگلستان با شرایط زیر انجام شد.

Denaturation ۵ دقیقه ۹۴°C

Denaturation ۳۰ ثانیه ۹۴°C

Annealing ۳۰ ثانیه ۵۲°C

Extension ۳۰ ثانیه ۷۲°C

تعداد سیکل ۳۹

و محصول PCR با ژل ۱٪ آگارز با ۱۰۰-۸۰ ولت الکتروفورز (به مدت یک ساعت) گردید. در پایان الکتروفورز، ژل با اتیدیوم برمایید رنگ‌آمیزی و باندهای DNA با استفاده از نور UV در دستگاه Gel documentation مشاهده شد و از آن عکس تهیه گردید.

وزن خشک

پس از ۴ هفته گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در غلظت‌های مختلف NaCl، از محیط کشت خارج و وزن‌تر و خشک بخش هوایی آن‌ها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک،

پراکسید هیدروژن

۰/۵ گرم بافت برگ تازه در هر تیمار توزین شد و با ۲ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA-0.1%) درون هاون چینی بر روییخ کاملاً ساییده شدند. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور 10000 rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱ میلی‌لیتریدید پتاسیم ۱ مولار اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $280 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و رابطه $A = \epsilon bc$ = جذب خوانده‌شده و ϵ = ضریب خاموشی) محاسبه شد (Velikova et al., 2000).

آسکوربیک/اسید

اندازه‌گیری میزان آسکوربیک اسید با استفاده از روش بور و همکاران انجام شد (Bor et al., 2006). در این روش ابتدا ۰/۱ گرم از بافت برگ هر نمونه توزین و توسط ۱۰ میلی‌لیتر اسید متافسفربیک ۱٪ در هاون چینی ساییده شد. سپس عصاره با استفاده از کاغذ صافی فیلتر و به ۱ میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده ۹ میلی‌لیتر معرف ۲ و ۶ دی کلروفل ایلندوفل ۵۰ میکرو مولار اضافه شد و درنهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد.

آنالیز آماری

نتایج حاصله بر اساس یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار برای هر آنالیز انجام گرفت. بعلاوه در مواردی درصد تغییرات با مقایسه با گروه شاهد و هدف محاسبه شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از One-way ANOVA و آزمون دانکن از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید.

نتایج

به‌منظور تأیید قطعی حضور ژن P5CS در گیاهان تراریخت آزمایش‌های PCR با پرایمر اختصاصی انجام گرفت. با استفاده از پرایمرهایی که برای ترادف ژن NPTII:P5CS طراحی شده بود، باند حدود ۲۷۰ bp به‌عنوان محصول PCR تولید نمود. شکل ۳ نتایج حاصل از این آزمایش‌ها و وجود قطعی ژن NPTII:P5CS در گیاهان تراریخت و عدم وجود ژن NPTII:P5CS در گیاهان غیرتراریخت را نشان می‌دهد.

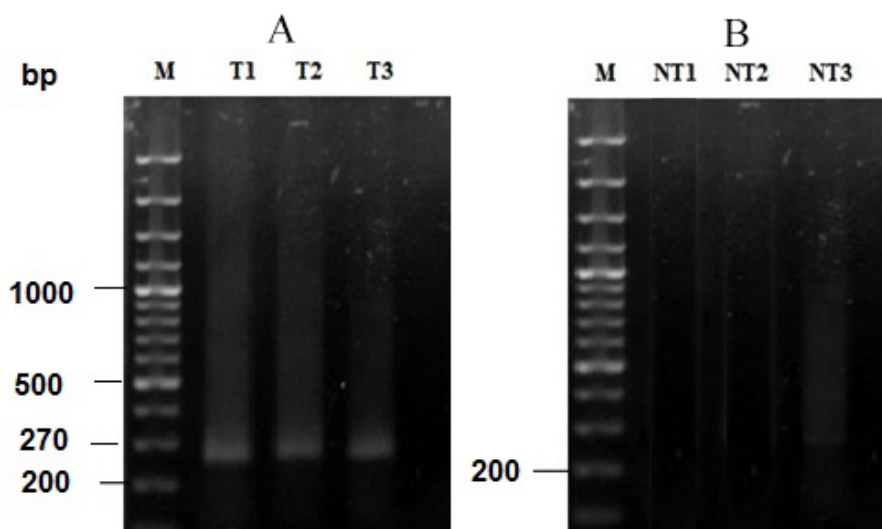
طول موج ۵۲۰ و ۴۹۰ نانومتر قرائت شد (Bates et al., 1973).

فنل کل و فلاونوئیدها

به‌منظور عصاره‌گیری و تعیین سطح فنل کل و فلاونوئیدها، ۰/۱ گرم از هر یک از تیمارها در هاون چینی کاملاً سائیده و به آن ۱۰ ml استون ۷۰٪ اضافه شد. سپس نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰ g در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد و محلول رویی برای آنالیزهای فنل کل و فلاونوئیدها در یخچال نگهداری شد. تعیین مقدار ترکیبات فنلی با استفاده از روش فولین-سیوکالتو (folin-ciocalteu) ساخت شرکت بازرگانی مرک آلمان انجام شد (Makkar et al., 2007). ابتدا ۵۰ میکرولیتر از عصاره تهیه‌شده را برداشت و به لوله‌های آزمایش انتقال و ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس به هر کدام از نمونه‌ها ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتو (۱N) اضافه گردید. در ادامه ۱/۲۵ ml محلول سدیم بی‌کربنات ۲۰٪ به هر نمونه افزوده شد و برای مخلوط شدن کامل ترکیبات آن‌ها را ورتکس کرده و درنهایت محتوای به‌دست‌آمده به مدت ۴۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد (Makkar et al., 2007). برای تعیین سطح فلاونوئیدها از آلومینیوم کلراید استفاده شد (Abdel-Hameed, 2009). به این منظور مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه‌شده را به لوله‌های آزمایش منتقل و سپس ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۲۰٪ و ۲ قطره گلاسیال استیک اسید به آن اضافه گردید و با استفاده از متانول به حجم ۲cc رسانده شد و بعد از ۴۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد.

آنتوسیانین

۰/۱ گرم برگ نمونه‌ها را توزین و در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسیدکلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً هموژن شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ g سانتریفیوژ و جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محاسبه غلظت با استفاده از ضریب خاموشی $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ انجام و نتایج برحسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردید (Wagner, 1979).



شکل ۳. حضور ژن NPTII:P5CS در گیاهان تراریخت (A) و عدم تأیید حضور آن در گیاهان غیرتراریخت (B). T1: لاین ۱، T2: لاین ۲، T3: لاین ۳، M: مارکر

Fig. 3. Presence of P5CS gene in transgenic plants (A) and absence of P5CS gene in non-transgenic plants (B). T1: Line 1, T2: Line 2, T3: Line 3, M: Marker

همچنین میزان کاروتنوئید در تنش شوری مشابه کلروفیل روند کاهشی داشت (شکل ۴-F). سطح کاروتنوئید در گیاهان غیرتراریخت در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به ترتیب ۲۶، ۳۵ و ۴۰ درصد نمک نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است. اگرچه روند کاهشی کاروتنوئیدها در گیاهان تراریخت نیز در غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک مشاهده شد. با این وجود همانند کلروفیل میزان کاروتنوئیدها در این گیاهان ۳۵، ۴۶ و ۲۲ درصد به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl بیشتر از گیاهان غیرتراریخت بود.

میزان سدیم و پتاسیم

همان‌طور که از شکل ۵ مشخص است میزان سدیم در اندام هوایی گیاهان تراریخت و غیرتراریخت با افزایش غلظت نمک در محیط افزایش یافت. با این وجود گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیرتراریخت سدیم کمتری را در بخش هوایی تجمع دادند. به گونه‌ای که با افزودن ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به محیط کشت، سطح سدیم در گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیرتراریخت به ترتیب ۵۰، ۱۷ و ۱۸ درصد به صورت معنی‌داری کم‌تر بود. بعلاوه شوری سبب کاهش سطح پتاسیم در هر دو نوع گیاه شد و همچنین نسبت پتاسیم به سدیم در گیاهان تراریخت و غیر تراریخت با افزایش نمک

وزن تر و خشک

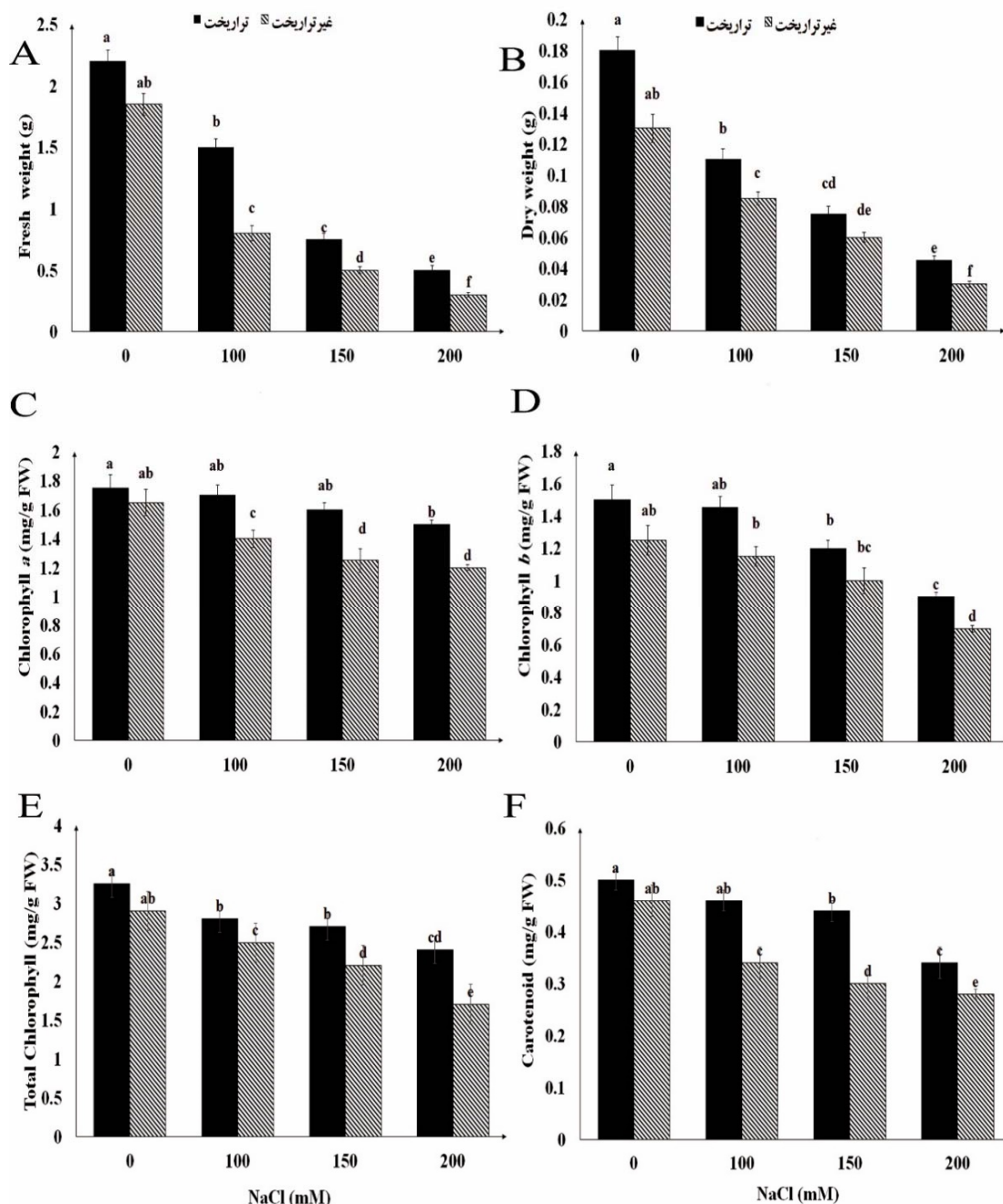
نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر و خشک بخش هوایی گیاهان در غلظت‌های مختلف نمک نشان داد که وزن تر در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت با افزایش غلظت نمک به طور معنی‌داری کاهش یافت. تجزیه داده‌ها مشخص کرد که تأثیر نمک بر وزن تر و خشک گیاهان غیرتراریخت بیشتر از گیاهان تراریخت است. به عنوان مثال وزن تر گیاهان غیر تراریخت در شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به ترتیب ۴۷ و ۳۳ درصد و وزن خشک آن‌ها به ترتیب ۲۳ و ۳۳ درصد نسبت به گیاهان تراریخت کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴-A-B).

رنگی‌های فتوسنتزی

میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل، تحت تأثیر سطوح مختلف نمک قرار گرفت. میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل در هر دو گیاه تراریخت و غیرتراریخت تنباکو با افزایش غلظت نمک روند کاهشی نشان داد (شکل ۴-C-E). با توجه به نتایج مشخص شد که تأثیر نمک بر کاهش رنگی‌های فتوسنتزی در گیاه تراریخت در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت کمتر است. به عنوان مثال مقدار کلروفیل کل گیاهان تراریخت در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به ترتیب ۲۵، ۲۲ و ۴۱ درصد بیشتر از گیاهان غیرتراریخت مشاهده شد.

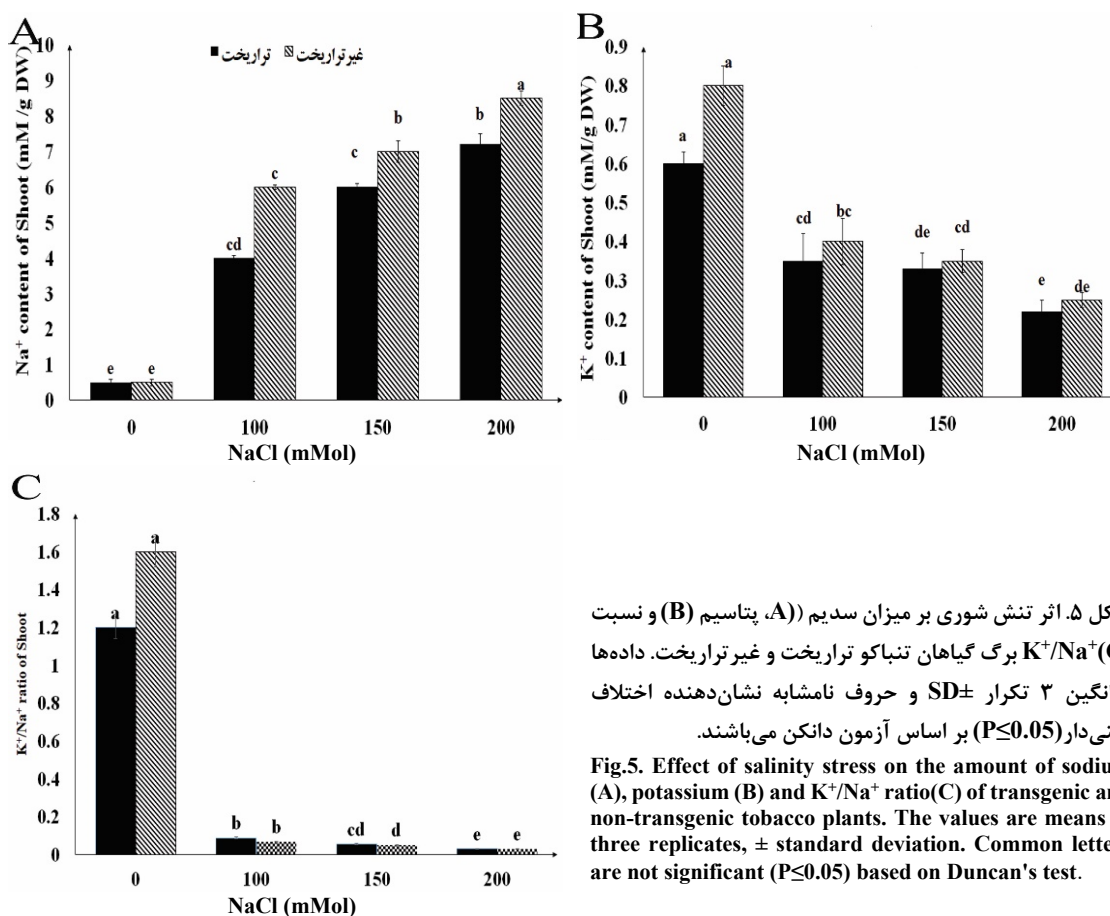
یافت. باین‌وجود تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در تغییرات سطح پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم مشاهده نشد (شکل ۵-B-C).

در محیط روند نزولی را نشان داد. در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار، گیاهان تراریخت و غیر تراریخت نسبت پتاسیم به سدیم به ترتیب ۶۵ و ۵۶ درصد در مقایسه با محیط فاقد نمک کاهش



شکل ۴. اثر تنش شوری بر وزن تر (A) و خشک (B) اندام هوایی و کلروفیل a (C)، b (D)، کلروفیل کل (E) و کاروتنوئید (F) گیاهان تنباکو تراریخت و غیرتراریخت. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

Fig 4. Effect of salinity stress on fresh (A) and dry weight (B) chlorophyll a (C), b (D), total chlorophyll (E) and carotenoids (F) of transgenic and non-transgenic tobacco plants. The values are means of three replicates, $\pm$ standard deviation. Common letters are not significant ($P \leq 0.05$) based on Duncan's test.



شکل ۵. اثر تنش شوری بر میزان سدیم (A)، پتاسیم (B) و نسبت K^+/Na^+ (C) برگ گیاهان تنباکو تراریخت و غیرتراریخت. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

Fig.5. Effect of salinity stress on the amount of sodium (A), potassium (B) and K^+/Na^+ ratio (C) of transgenic and non-transgenic tobacco plants. The values are means of three replicates, $\pm$ standard deviation. Common letters are not significant ($P \leq 0.05$) based on Duncan's test.

پروکلین

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروکلین در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در غلظت‌های مختلف NaCl، نشان داد که میزان پروکلین در برگ هر دو گیاه، با افزایش غلظت نمک به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. اگرچه میزان پروکلین در محیط فاقد نمک در بین گیاهان تراریخت و غیرتراریخت اختلاف معنی‌داری را نشان نداد؛ اما تجمع پروکلین در گیاهان تراریخت بیشتر از گیاهان غیرتراریخت در شرایط تنش شوری مشاهده شد. بر این اساس سطح پروکلین در گیاهان تراریخت در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به ترتیب ۲، ۱،۶ و ۱،۶ برابر گیاهان غیرتراریخت ثبت شد (شکل ۵-A).

فنل کل، فلاونوئیدها و آنتوسیانین

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فنل کل در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در غلظت‌های مختلف NaCl، نشان داد که میزان فنل کل در برگ هر دو گیاهان تراریخت و غیرتراریخت با افزایش غلظت نمک اندکی افزایش می‌یابد. به‌طور کلی در

غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک میزان فنل در گیاهان غیرتراریخت بیشتر از گیاهان تراریخت بود. در این غلظت‌های نمک میزان فنل کل گیاهان غیرتراریخت در حدود ۸ درصد بیشتر از گیاهان تراریخت مشاهده شد. در مقابل آنالیز داده‌ها مشخص کرد که در برگ گیاهان تراریخت و غیرتراریخت با افزودن نمک به محیط، سطح فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها کاهش یافته است. با این وجود محتوی فلاونوئیدها در گیاهان غیرتراریخت در حدود ۶ درصد بیشتر از گیاهان تراریخت در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک بود. این در حالی است که گیاهان تراریخت سطح آنتوسیانین را در شرایط ۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به گیاهان غیرتراریخت تقریباً ۴ درصد افزایش دادند. با توجه به نمودار می‌توان بیان کرد که اثر شوری در کاهش محتوی آنتوسیانین بیشتر از تأثیر تراریخت در محتوی آنتوسیانین است (شکل ۶-B-D).

آسکوربیک اسید

آنالیز داده‌ها بیانگر این است که گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تأثیری بر میزان آسکوربیک اسید ندارند؛ اما با افزودن بیشترین غلظت نمک به محیط میزان آسکوربیک اسید در گیاهان تراریخت و غیر تراریخت نسبت به گیاهان شاهد در حدود ۱۲ و ۱۰ درصد افزایش یافت. درواقع تنها در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک محتوی آسکوربیک اسید در هر دو نوع گیاه نسبت به محیط فاقد نمک افزایش داشت (شکل E-۶).

پراکسید هیدروژن

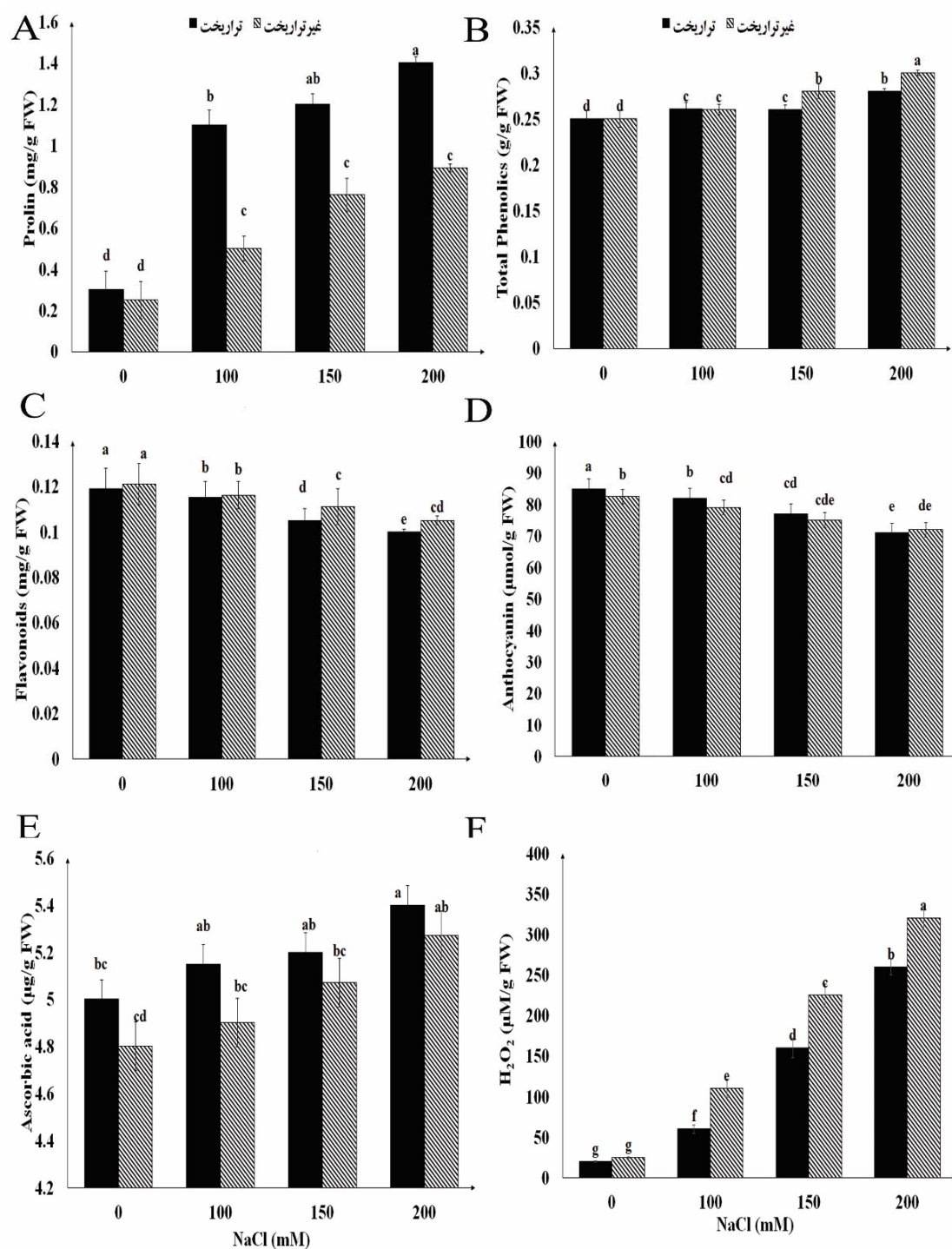
نتایج حاصل از اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن مشخص کرد که میزان پراکسید هیدروژن با اضافه شدن نمک و تشدید غلظت آن به محیط در گیاهان تراریخت و غیر تراریخت افزایش می‌یابد. از این رو سطح پراکسید هیدروژن در گیاهان تراریخت و غیر تراریخت در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به ترتیب ۱۰ و ۱۳ برابر بیشتر از گیاهان شاهد ثبت شد. بررسی نتایج آشکار ساخت که تجمع پراکسید هیدروژن در گیاهان تراریخت در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به ترتیب ۸۳، ۴۱ و ۲۳ درصد از گیاهان غیرتراریخت کمتر بود (شکل F-۶).

بحث

در مطالعه حاضر گیاه تنباکو حاوی ژن P5CS همراه با ژن PTII به‌صورت تراریخت درآمده بودند. ژن NPTII به‌عنوان ژن گزینشگر عمل کرده به‌طوری‌که پس از انتقال ژن P5CS به گیاهان و تولید گیاهان تراریخت به‌عنوان ابزاری جهت گزینش گیاهان تراریخت به کار می‌رود. کانامایسین به واحد کوچک ریبوزومی متصل و با ایجاد جهش در اسیدآمین‌ها، مانع سنتز صحیح پروتئین و نهایتاً مرگ سلولی می‌شود (Nap et al., 1992). ژن NPTII با فسفریلاسیون کانامایسین مقاومت به این ماده را فراهم می‌کند؛ بنابراین بافت‌های ترانسفورم شده امکان رشد در محیط واجد کانامایسین را دارند. بر اساس این توضیحات گیاهان بازایی شده نسل T₁ در این آزمایش قادر به رشد روی محیط کشت حاوی کانامایسین هستند و به‌احتمال زیاد گیاهان تراریخت حاوی ژن NPTII نیز خواهند بود. در مرحله بعدی آزمایش به‌منظور تأیید تراریخت بودن گیاهان *N. plumbaginifolia*

آزمایش‌های PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده از ترادف NPTII:P5CS روی ۳ لاین مختلف انجام گرفت که باند ۲۷۰ bp به محصول PCR نشان‌دهنده حضور قطعی ژن NPTII در گیاهان بود. مشابه این نتایج در مقالات دیگر نیز گزارش‌شده است (Razavizadeh and Ehsanpour, 2009). همچنین نتایج حاصل از پرولین بیانگر افزایش چشمگیر پرولین در گیاهان تراریخت در شرایط تنش شوری است.

گزارش‌ها نشان می‌دهد که بسیاری از گیاهان پرولین را در پاسخ به تنش شوری افزایش می‌دهند. پیشنهادشده است که تولید بالای پرولین در گیاهان ممکن است تحمل به تنش‌ها را سبب شود (Iqbal et al., 2014; Per et al., 2017). در برخی از گیاهان مثل گوجه‌فرنگی در سطوح بالای نمک تجمع مواد آلی از جمله اسیدآمین‌ها پرولین هم‌زمان با تجمع یون‌های سدیم گزارش‌شده است که در این گیاهان تولید بالای پرولین تحمل به تنش را سبب شده است (Yancey, 2001). افزایش سنتز پرولین در تنش‌های شوری و اسمزی در ارقام مختلف سیب‌زمینی مورد مطالعه گسترده قرار گرفته است. بامطالعه بر روی گیاهان تراریخت سیب‌زمینی گزارش‌شده است که انتقال ژن P5CS موجب افزایش تولید پرولین در گیاهان تراریخت شده و سپس مقاومت به شوری را در آن‌ها افزایش می‌دهد (Mani et al., 2002). مطابق آزمایش‌های انجام‌شده در این تحقیق نیز فرا بیان ژن P5CS سبب افزایش تولید پرولین و افزایش مقاومت به شوری در گیاهان تراریخت نسبت به غیر تراریخت شد. با توجه به نقش پرولین در حفظ متابولیسم و سنتز پروتئین (Trotel-Aziz et al., 2000)، تعادل اسمزی (Santos et al., 1996)، تنظیم pH سلولی (Santos et al., 1996)، منبع ذخیره کربن و نیتروژن (Lutts et al., 1999) در پاسخ به تنش‌ها و بخصوص شوری، افزایش رشد گیاهان تراریخت مورد مطالعه احتمالاً به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم بیانگر نقش فرا بیان ژن P5CS در مقاومت به شوری است. بخشی از اثرات نامطلوب شوری مربوط به تنش اسمزی است و همین اثر اسمزی سبب می‌گردد که میزان رشد با افزایش شوری کاهش یابد؛ بنابراین



شکل ۶. اثر تنش شوری بر میزان پرولین (A)، فنل کل (B)، فلاونوئیدها (C)، آنتوسیانین (D)، آسکوربات (E) و پراکسید هیدروژن (F) برگ گیاهان تنباکو تراریخت و غیرتراریخت. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

Fig.6. Effect of salinity stress on the amount of proline (A), total phenol (B), flavonoids (C), anthocyanin (D), ascorbate (E) and hydrogen peroxide (F) of transgenic and non-transgenic tobacco plants. The values are means of three replicates, $\pm$ standard deviation. Common letters are not significant ($P \leq 0.05$) based on Duncan's test.

به نظر می‌رسد که گیاهان تراریخت این مطالعه در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت با افزایش بیان ژن P5CS و تولید بیشتر پرولین، امکان بهره‌گیری از ویژگی‌های خاص پرولین در تطابق اسمزی و همچنین حفظ ساختارهای سلولی و آنزیمی (Razavizadeh and Ehsanpour, 2009) را فراهم و تحمل بیشتری نسبت به تنش شوری از خود بروز دادند. در توافق با نتایج به‌دست‌آمده در آزمایش حاضر، افزایش میزان پرولین در گیاه سورگوم (Forghani et al., 2018) و تولید بالای اسمولیت‌های سازگار از طریق مهندسی ژنتیک در گیاهان تراریخت دیگری مانند آرابیدوپسیس، گندم، براسیکا و سیب‌زمینی (Chinnusamy et al., 2006) نیز مشاهده شده که منجر به افزایش تحمل به شوری در مرحله رویشی گردیده است. بعلاوه مطالعات قبلی صورت گرفته بر روی تنباکو با فرایبان ژن P5CS در پاسخ به تنش خشکی (Ehsanpour et al., 2012) و شوری (Riahi and Ehsanpour, 2013)، بیانگر افزایش تحمل به خشکی و شوری با افزایش پرولین در این گیاهان و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شبیه کاتالاز و پراکسیداز است که تأییدکننده نتایج این تحقیق نیز است.

عدم تعادل متابولیکی ناشی از مسمومیت، تنش اسمزی و کمبود عناصر Ca^{+2} و K^{+} از عوامل کلیدی اصلی هستند که منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو شده و نهایتاً منجر به کاهش فتوسنتز و تولید مواد غذایی برای رشد می‌گردد (Chinnusamy et al., 2005). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که در گیاهان حساس به شوری با افزایش نمک غلظت یون‌های سدیم و کلر در بافت گیاه افزایش و غلظت پتاسیم کاهش می‌یابد (Ahmad et al., 2013; Forghani et al., 2017). درواقع افزایش Na^{+} که منجر به کاهش K^{+} و یا خروج K^{+} درون سلولی از ریشه و نهایتاً اندام‌های هوایی می‌شود منجر به آسیب‌های جبران‌ناپذیر در گیاهان می‌گردد که بخشی از اثرات زیان‌بار شوری را ایجاد می‌کند. مطابق این روند نیز در گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تنباکو این تحقیق نیز مشاهده شد. نتایج این تحقیق مشخص کرد که گیاهان تراریخت سدیم کمتری نسبت به گیاهان غیرتراریخت در اندام هوایی تجمع داد درحالی‌که نسبت پتاسیم به سدیم با گیاهان غیرتراریخت تفاوتی نداشت. مطالعاتی که توسط اخوان (Akhavan, 2011) و رضوی‌زاده (Razavizadeh,

2010) بر روی گیاه تنباکو تراریخت صورت گرفته است بیانگر کاهش سطح سدیم در پاسخ به تنش شوری در گیاهان تراریخت است. به‌هرحال کاهش نسبت K^{+}/Na^{+} در هر دو نوع گیاه بیانگر حساسیت گیاه تنباکو به تنش شوری است. در طی تنش شوری افزایش ROS و تجمع یون‌های سمی مانند سدیم و کلر صورت می‌گیرد که به‌شدت به ساختار غشایی و ترکیبات سلولی آسیب وارد می‌نماید. برای حفظ غلظت کم سدیم، گیاه دارای سیستم آنتی‌پورت ویژه‌ای همانند Na^{+}/H^{+} است که سدیم را به واکوئل و خارج سلول پمپ می‌نماید و سلول mRNA این آنتی‌پورت را به‌صورت ویژه‌ای در پاسخ به تنش اسمزی حفظ می‌نماید که این امر با تجمع ترکیبات سازگار به‌منظور حفظ تعادل اسمزی و نهایتاً پایداری این آنتی‌پورت صورت می‌گیرد (Dar et al., 2016). لذا به نظر می‌رسد افزایش پرولین در گیاهان تراریخت باعث افزایش اسمولاریته و پتانسیل اسمزی داخل سلولی می‌شود (Iqbal et al., 2014) و احتمالاً با پایداری آنتی‌پورت مذکور احتمالاً غلظت سدیم را تعدیل نماید.

در این مطالعه با افزایش سطح شوری میزان کلروفیل a، b، کل و همچنین محتوای کاروتنوئید در هر دو گیاهان تراریخت و غیرتراریخت کاهش یافت ولی کاهش میزان کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهان غیرتراریخت تحت تنش شوری، شدیدتر از گیاهان تراریخت مشاهده شد. مشابه با نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام‌شده در این تحقیق، کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش شوری در سایر گیاهان ازجمله آفتابگردان (Santos, 2004) و گونه‌های نخود (Soussi et al., 1998) نیز مشاهده شده است. کاهش سنتز کلروفیل ممکن است به دلیل کاهش تجمع آمینولولینیک اسید (ALA^1) باشد. گزارش شده است که تحت تنش شوری در برخی گیاهان ازجمله آفتابگردان و ذرت، میزان ALA کاهش می‌یابد (Santos, 2004; Santos et al., 1996). تنش شوری همچنین موجب کاهش تعداد کلروپلاست‌ها و تغییرات ساختار تیلاکوئیدها و غشا پلاستیدها و تجزیه‌ی آن‌ها می‌گردد (Ahmad et al., 2013). محلول‌های سازگار نقش مهمی در جلوگیری از تخریب غشا تیلاکوئید در زمان دهیدراته شدن و تنش اسمزی به عهده‌دارند و از آنجایی‌که پرولین به‌عنوان یک تثبیت‌کننده پروتئین نیز عمل می‌کند (Iqbal et al., 2017; Per et al., 2014)، می‌توان پیشنهاد نمود که پرولین

¹Aminolevulinic acid

عده دارند (Hasanuzzaman et al., 2013; Khan et al., 2012). برخی گزارش‌ها دال بر افزایش میزان آنتوسیانین در طی تنش شوری در گیاهانی مثل نیشکر، گوجه‌فرنگی (Eryilmaz, 2006) و کلم قرمز (Wahid and Ghazanfar, 2006) است. هرچند گزارش‌های متناقضی در خصوص تغییرات محتوای فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در پاسخ به تنش شوری نیز وجود دارد (Khan et al., 2012). در آزمایش‌های انجام‌شده در این تحقیق مشخص شد که با افزایش تنش شوری در هر دو گیاهان تراریخت و غیرتراریخت میزان آنتوسیانین و فلاونوئیدها کاهش یافت که می‌تواند بیانگر عدم نقش مؤثر آن‌ها در کاهش آسیب‌های ناشی از تنش شوری در گیاه تنباکو باشد. بعلاوه کاهش میزان فنل و ترکیبات وابسته در گیاهان تراریخت نسبت به غیرتراریخت در تنش شوری، احتمالاً به دلیل افزایش میزان پرولین در گیاهان تراریخت است که با توجه به عملکرد آنتی‌اکسیدانی این ماده کاهش قابل‌توجه سطح H_2O_2 بالطبع کاهش نیاز به سنتز ترکیبات فنلی در گیاهان تراریخت را به دنبال داشته است. علاوه بر ترکیبات فنلی، آسکوربات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی در برابر ROS در نظر گرفته می‌شود که به دلیل توانایی بالای آسکوربات در انتقال الکترون در واکنش‌ها است که در نهایت سبب حفاظت غشا در برابر رادیکال‌های آزاد می‌شود (Gill and Tuteja, 2010). در گوجه‌فرنگی افزایش شوری سبب افزایش میزان اسید آسکوربیک در کلروپلاست شد (Mittova et al., 2002). همچنین در گیاه نخود نیز مقدار اسید آسکوربیک موجود در فضای آپوپلاستی در هنگام تنش شوری افزایش یافت (Hernández et al., 2001). در این مطالعه نیز در بیشترین غلظت نمک افزایش سطح آسکوربیک اسید در هر دو گیاه تراریخت و غیرتراریخت مشاهده شد. مشابه این روند، در گیاه پنبه نیز با افزایش مقدار نمک، مقدار اسید آسکوربیک داخل گیاه و همچنین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش نشان داد (Garratt et al., 2002).

نتیجه‌گیری

با بررسی نتایج می‌توان بیان کرد که گیاه تنباکو نسبت به تغییرات شوری حساس است و این گیاه با توجه به نتایج این مطالعه در پاسخ به تنش شوری میزان پرولین و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی به‌خصوص ترکیبات فنلی و آسکوربات را افزایش می‌دهد؛ اما در گیاهان تراریخت، فرا

ممکن است سبب حفاظت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز کلروفیل در زمان تنش شوری شود و از تجزیه آنزیم‌ها جلوگیری کند و این امر منجر به ادامه‌ی عمل فتوسنتز در گیاهان تراریخت شده است. از طرفی با توجه به نقش پرولین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت، این ترکیب در گیاهان تراریخت علاوه بر حفظ ساختارهای سلولی و حفاظت از آنزیم‌ها، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان نیز عمل کرده و از تأثیر ROS بر فعالیت فتوسنتزی و آنزیمی جلوگیری می‌کند و سبب کاهش خسارات ناشی از افزایش ROS می‌شود.

به دنبال تنش شوری در گیاهان تنش اکسیداتیو نیز رخ می‌دهد، بنابراین تولید رادیکال‌های آزاد متعدد و ROS‌ها به‌عنوان سیگنالی عمل می‌کنند که سبب افزایش فعال شدن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی ازجمله ترکیبات فنلی شامل فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، ترکیبات ساده فنلی، آسکوربات و غیره می‌شود (Hasanuzzaman et al., 2012; Khan et al., 2012). این تحقیق با افزایش میزان غلظت نمک، میزان تولید H_2O_2 که یکی از گونه‌های اکسیژن فعال است افزایش معنی‌داری را در هر دو گیاهان تراریخت و غیر تراریخت نشان داد. در مطالعات انجام‌گرفته توسط محققین مشاهده شده است که تولید فنل در تنش شوری در مراحل مختلف رشد متفاوت است و تجمع فنل به مرحله رشد گیاه بستگی دارد (Hichem and Mounir, 2009). در آزمایش‌های دیگر در کدو، خیار (Tiwari et al., 2010)، گندم (Ashraf et al., 2010) و براسیکا (Verma and Mishra, 2005) مطابق با گیاهان تراریخت و غیرتراریخت تنباکو افزایش تنش شوری تجمع ترکیبات فنلی را به همراه داشته است. باین‌وجود یافته‌های ما بیانگر افزایش تجمع بیشتر فنل کل در گیاهان غیرتراریخت نسبت به گیاهان تراریخت در پاسخ به تنش شوری است. در مطالعه‌ای بر روی برنج مشخص شد که میزان فلاونوئیدها در پاسخ به تنش شوری افزایش یافت (Chutipaijit et al., 2009). در مقابل گزارش‌شده است که در گیاه کالاندولا با افزایش تنش شوری، میزان فلاونوئیدها کاهش‌یافته است (Khalid and da Silva, 2010) که به نظر می‌رسد تغییرات آن وابسته به اندام، مرحله نموی و گونه مورد مطالعه است. طبق مطالعات انجام‌شده مشخص گردیده است که آنتوسیانین‌ها حفاظت از کلروپلاست در برابر اشعه‌ی خورشیدی، حفاظت از برگ‌ها در برابر فتواکسیداتیو در طی پیری، آسیب ناشی از UV-B به سیستم فتوسنتزی را بر

قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه اصفهان بواسطه حمایت از این پایان نامه تشکر می‌نمایند. ضمناً نویسنده مسئول تایید می‌نماید محتوای این مقاله در تعارض با منافع هیچ فردی نمی‌باشد.

بیان ژن P5CS و بالطبع تجمع پرولین و کاهش غلظت سدیم در ساقه مقاومت به شوری را در گیاهان تنباکو تقویت کرده است.

منابع

- Abdel-Hameed, E.-S.S., 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. Food Chemistry. 114, 1271-1277.
- Ahmad, P., Azooz, M., Prasad, M.N.V., 2013. Salt Stress in Plants: Signalling, Omics and Adaptations. Springer Science & Business Media.
- Akhavan, Z., 2011, Study of P5CS gene expression and carbohydrate content changes in roots and leaves of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.cv. Wisconsin) under in vitro salt stress condition. MSc dissertation, Faculty of Science Department of Biology, University of Isfahan, Iran. [In Persian].
- Armengaud, P., Thierry, L., Buhot, N., Grenier-de March, G., Savoré, A., 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. Physiologia Plantarum. 120, 442-450.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. 24, 1.
- Ashraf, M.A., Ashraf, M., Ali, Q., 2010. Response of two genetically diverse wheat cultivars to salt stress at different growth stages: leaf lipid peroxidation and phenolic contents. Pakistan Journal of Botany. 42, 559-565.
- Bates, L., Waldren, R., Teare, I., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39, 205-207.
- Bor, J.-Y., Chen, H.-Y., Yen, G.-C., 2006. Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. Journal Of Agricultural and Food Chemistry. 54, 1680-1686.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.K., 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science. 45, 437-448.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K., 2006. Salt Stress Signaling and Mechanisms of Plant Salt Tolerance, Genetic Engineering. Springer, pp. 141-177.
- Chutipaijit, S., Cha-Um, S., Sompornpailin, K., 2009. Differential accumulations of proline and flavonoids in indica rice varieties against salinity. Pakistan Journal of Botany. 41, 2497-2506.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal. 4, 215-223.
- Dar, M.I., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F.A., 2016. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development, in: Iqbal, N., Nazar, R.A., Khan, N. (eds.), Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies. Springer India, New Delhi, pp. 155-166.
- Ehsanpour, A., Fatahian, N., 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73, 53-56.
- Ehsanpour, A., Twell, D., 2005. Analysis of SFL1 and SFL2 Promoter Region in *Arabidopsis thaliana* using gateway cloning system. Journal of Science. 16, 303-309.
- Ehsanpour, A.A., Zarei, S., Abbaspour, J., 2012. The role of over expression of P5CS gene on proline, catalase, ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant under in vitro drought stress. Journal of Cell and Molecular Research. 4, 43-49.
- Eryilmaz, F., 2006. The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 20, 47-52.

- Forghani, A.H., Almodares, A., Ehsanpour, A.A., 2018. Potential objectives for gibberellic acid and paclobutrazol under salt stress in sweet sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench cv. Sofra). *Applied Biological Chemistry*. 61, 113-124.
- Forghani, A.H., Almodaress, A., Ehsanpour, A.A., 2017. Comparative effects of gibberellin and paclobutrazol on Na and K content, phenolic compounds and the activity of some enzymes in its biosynthesis pathway in sweet sorghum (*sorghum bicolor*) under salt stress. *Journal of Crop Production and Processing*. 7, 133-149. [In Persian with English summary].
- Garratt, L.C., Janagoudar, B.S., Lowe, K.C., Anthony, P., Power, J.B., Davey, M.R., 2002. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Free Radical Biology and Medicine*. 33, 502-511.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48, 909-930.
- Hare, P., Cress, W., Van Staden, J., 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany*. 50, 413-434.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., da Silva, J.A.T., Fujita, M., 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In: Venkateswarlu, B., Shanker, A., Shanker, C., Maheswari, M. (eds.), *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*. Springer, pp. 261-315.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M., 2013. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In: Ahmad, P., Azooz, M., Prasad, M. (eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer, New York, NY. pp. 25-87.
- Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R., Sevilla, F., 2001. Antioxidant systems and O_2^-/H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*. 127, 817-831.
- Hichem, H., Mounir, D., 2009. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. *Industrial Crops and Products*. 30, 144-151.
- Hu, C., Delauney, A.J., Verma, D., 1992. A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89, 9354-9358.
- Iqbal, N., Umar, S., Khan, N.A., Khan, M.I.R., 2014. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. *Environmental and Experimental Botany*. 100, 34-42.
- Iyer, S., Caplan, A., 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiology*. 116, 203-211.
- Khalid, K.A., da Silva, J.A.T., 2010. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. *Scientia Horticulturae*. 126, 297-305.
- Khan, N.A., Nazar, R., Iqbal, N., Anjum, N.A., 2012. *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Kishor, P.K., Sangam, S., Amrutha, R., Laxmi, P.S., Naidu, K., Rao, K., Rao, S., Reddy, K., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*. 424-438.
- Lutts, S., Kinet, J., Bouharmont, J., 1996. Effects of various salts and of mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures. *Journal of Plant Physiology*. 149, 186-195.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J.I., Damsz, B., Narasimhan, M.L., Hasegawa, P.M., Joly, R.J., Bressan, R.A., 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal*. 31, 699-712.
- Makkar, H.P., Siddhuraju, P., Becker, K., 2007. *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press.
- Mani, S., Van de Cotte, B., Van Montagu, M., Verbruggen, N., 2002. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 128, 73-83.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M., 2002. Salt stress induces up-regulation of an

- efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum*. 115, 393-400.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters*. 461, 205-210.
- Nap, J.-P., Bijvoet, J., Stiekema, W.J., 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Research*. 1, 239-249.
- Peng, Z., Lu, Q., Verma, D., 1996. Reciprocal regulation of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular and General Genetics*, MGG. 253, 334-341.
- Per, T.S., Khan, N.A., Reddy, P.S., Masood, A., Hasanuzzaman, M., Khan, M.I.R., Anjum, N.A., 2017. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant Physiology and Biochemistry*. 115, 126-140.
- Poljakoff-Mayber, A., Somers, G., Werker, E., Gallagher, J., 1994. Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae): their structure, germination, and salt tolerance. II. Germination and salt tolerance. *American Journal of Botany*. 81, 54-59.
- Razavizadeh, R., Ehsanpour, A., 2009. Effects of salt stress on proline content, expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, and activities of catalase and ascorbate peroxidase in transgenic tobacco plants. *Biological Letters*. 46, 63-75.
- Razavizadeh, R., 2010. Evaluation of P5CS gene over expression on some physiological parameters and proteomics of transgenic tobacco plants under in vitro salt stress. PhD dissertation, Faculty of Science Department of Biology, University of Isfahan, Iran. [In Persian].
- Riahi, M., Ehsanpour, A.A., 2013. Responses of transgenic tobacco (*Nicotiana glauca*) over-expressing P5CS gene under in vitro salt stress. *Progress in Biological Sciences*. 2, 76-84.
- Sairam, R., Tyagi, A., 2004. Physiological and molecular biology of salinity stress tolerance in deficient and cultivated genotypes of chickpea. *Plant Growth Regulation*. 57, 109-114.
- Santos, C.V., 2004. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae*. 103, 93-99.
- Santos, M., Camara, T., Rodriguez, P., Claparols, I., Torne, J., 1996. Influence of exogenous proline on embryogenic and organogenic maize callus subjected to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59, 65-74.
- Shi, G., Liu, C., Cui, M., Ma, Y., Cai, Q., 2012. Cadmium tolerance and bioaccumulation of 18 hemp accessions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 168, 163-173.
- Soussi, M., Ocana, A., Lluch, C., 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany*. 49, 1329-1337.
- Steward, G.R., Larher F., 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. Amino acids and derivatives. In: Paul, K.S., Eric, E.C. (eds.), *Biochemistry of Plants*. 1st ed. Volume 5. Academic Press; New York, NY, USA. pp. 609-635.
- Stewart, G., Lee, J., 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta*. 120, 279-289.
- Thompson, J.F., 1980. Arginine synthesis, proline synthesis, and related processes, Amino acids and derivatives. Elsevier, pp. 375-402.
- Thompson, M.R., Douglas, T.J., Obata-Sasamoto, H., Thorpe, T.A., 1986. Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiologia Plantarum*. 67, 365-369.
- Tiwari, J.K., Munshi, A.D., Kumar, R., Pandey, R.N., Arora, A., Bhat, J.S., Sureja, A.K., 2010. Effect of salt stress on cucumber: Na^+/K^+ ratio, osmolyte concentration, phenols and chlorophyll content. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32, 103-114.
- Trotel-Aziz, P., Niogret, M.F., Larher, F., 2000. Proline level is partly under the control of abscisic acid in canola leaf discs during recovery from hyper-osmotic stress. *Physiologia Plantarum*. 110, 376-383.

- Van Rensburg, L., Krüger, G., Krüger, H., 1993. Proline accumulation as drought-tolerance selection criterion: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*. 141, 188-194.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*. 151, 59-66.
- Venekamp, J., 1989. Regulation of cytosol acidity in plants under conditions of drought. *Physiologia Plantarum*. 76, 112-117.
- Verma, S., Mishra, S.N., 2005. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology*. 162, 669-677.
- Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*. 64, 88-93.
- Wahid, A., Ghazanfar, A., 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology*. 163, 723-730.
- Yancey, P.H., 2001. Water stress, osmolytes and proteins. *American Zoologist* 41, 699-709.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology*. 38, 1095-1102.
- Zhu, J.-K., 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 124, 941-948.