

تأثیر بیش بیان ژن‌های اسیدفسفاتاز *AtPAP17* و *AtPAP26* بر عملکرد و اجزاء عملکرد دانهتحت تنش شوری در گیاه *Arabidopsis thaliana*محمدعلی عباسی وینه^۱، محمدصادق ثابت^{۲*}، قاسم کریم زاده^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲. استادیار گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۳. استاد گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۶

چکیده

تنش شوری با تداخل در واکنش‌های فیزیولوژیک و اختلال در جذب عناصر غذایی کلیدی نظیر فسفر، منجر به کاهش شدید عملکرد دانه گیاهان می‌گردد. فعالیت فسفاتازها از جمله سازوکارهای گیاهان به‌منظور تأمین و حفظ هومئوستازی فسفر درون‌سلولی است. از مجموع ۲۹ اسیدفسفاتاز ارغوانی شناخته‌شده در گیاه *Arabidopsis thaliana*، افزایش سطح رونوشت ژن دو اسیدفسفاتاز *AtPAP17* و *AtPAP26* در شرایط تنش شوری اثبات شده است. در پژوهش حاضر از ژنوتیپ‌های بیش‌بیان (*OE17* و *OE26*)، جهش‌یافته ساده (*Mu17* و *Mu26*) و جهش‌یافته دوگانه (*DM*) ژن‌های مذکور به‌منظور مطالعه اثر *AtPAP17* و *AtPAP26* بر عملکرد و اجزاء عملکرد دانه گیاه *Arabidopsis thaliana*، استفاده شد. بر اساس آستانه تحمل به شوری در این گیاه (۱۰۰ mM کلرید سدیم) و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ mM کلرید سدیم (NaCl) بررسی شد. طی تنش، درصد گل‌دهی، تعداد غلاف در بوته، تعداد بذر در غلاف، وزن هزار دانه، عملکرد کل دانه و همچنین محتوای فسفر کل و آزاد اندازه‌گیری شد. نتایج حاکی از افزایش ۱/۷ و ۰/۸۹ برابری عملکرد کل دانه گیاهان *OE17* و *OE26* در مقایسه با *WT* در غلظت ۱۵۰ mM بود، در حالی بود که گیاهان جهش‌یافته فاقد عملکرد دانه در آن غلظت بودند. از طرف دیگر، محتوای فسفات کل در گیاهان *OE17* و *OE26* به ترتیب ۱/۷ و ۱/۵ برابر بیش‌تر از *WT* در غلظت ۱۵۰ mM بود. در مقابل گیاهان جهش‌یافته *Mu17*، *Mu26* و *DM* به ترتیب کاهش معنی‌دار ۲۰٪، ۲۰٪ و ۵۱٪ در محتوای فسفات کل در مقایسه با *WT* و در غلظت مشابه نشان دادند. تغییر در عملکرد دانه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر تحت شرایط تنش شوری شدید، به‌روشنی حاکی از تأثیر آنزیم‌های *PAP17* و *PAP26* جهت فراهم نمودن فسفر کافی در دسترس گیاه و بهبود عملکرد دانه این گیاهان بود. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه گیاه *Arabidopsis thaliana*، می‌توان تأثیر دو اسید فسفاتاز *AtPAP17* و *AtPAP26* را به‌عنوان کاندیدای مؤثر در بهبود عملکرد دانه در شرایط تنش شوری در گیاهان زراعی مطالعه نمود.

واژه‌های کلیدی: اسید فسفاتازهای ارغوانی، بهبود عملکرد دانه، تحمل به شوری، گیاهان جهش‌یافته

مقدمه

فتوستتیز، بیش‌تر به‌عنوان یون‌های شور مطرح می‌شوند اثرات زیانباری بر عملکرد و کیفیت محصولات زراعی دارد (Boyer, 1982). یون‌های سدیم و کلر به دلیل بیش‌ترین اثرات منفی و مخرب در فرایندهای متابولیکی گیاه و بازده

شوری یکی از تنش‌های غیرزیستی مهم به شمار می‌رود که اثرات زیانباری بر عملکرد و کیفیت محصولات زراعی دارد (Boyer, 1982). یون‌های سدیم و کلر به دلیل بیش‌ترین اثرات منفی و مخرب در فرایندهای متابولیکی گیاه و بازده

در ریزوسفر و جاروب^۴ منجر به آزادسازی فسفات از مخازن فسفر خاک می‌شود و با بازیافت فسفر از مونواسترهای فسفات که از طریق سیتوپلاسم به دیواره سلولی ترشح یافته‌اند، به گیاه *Arabidopsis thaliana* در حفظ هومئوستازی فسفات کمک می‌کند (Robinson et al., 2012). یکی دیگر از اسیدفسفاتازهای ارغوانی گیاه *AtPAP17*, *Arabidopsis* است که در پاسخ به کمبود فسفر و همچنین در شرایط تنش شوری و ABA^۵ بیان می‌شود و علاوه بر فعالیت اسیدفسفاتازی، دارای فعالیت پراکسیدازی نیز هست (Del Pozo et al., 1999).

با توجه به افزایش روزافزون شوری خاک‌ها در مناطق خشک و نیمه‌خشک، شناسایی ژن‌های مرتبط با تنش شوری بسیار حائز اهمیت است. تاکنون تأثیر اسیدفسفاتازهای ارغوانی به‌عنوان یکی از خانواده‌های ژنی مهم در تأمین فسفر موردنیاز سلول‌های گیاهی، در شرایط تنش شوری در گیاه *آرابیدوپسیس* مورد مطالعه قرار نگرفته است، لذا مطالعه حاضر با هدف تقویت توانمندی گیاه *آرابیدوپسیس* در به‌کارگیری سازوکارهای داخلی از جمله القای اسیدفسفاتازهای ارغوانی جهت کاهش اثرات کمبود فسفات حاصل از تنش شوری انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

در تحقیق حاضر از گیاه *A. thaliana* واریته Columbia-0 به‌عنوان ژنوتیپ شاهد (WT^۶) از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری دریافت شد. از ژنوتیپ‌های بیش‌بیان^۷ (OE) ژن *AtPAP17* (locus No. AT3G17790) و ژن *AtPAP26* (locus No. At5g34850) به‌منظور مطالعه اثر *AtPAP17* و *AtPAP26* بر عملکرد و اجزاء عملکرد دانه گیاه *A. thaliana* استفاده شد. ژنوتیپ‌های بیش‌بیان OE17 و OE26 علاوه بر آنکه ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26* آن‌ها به‌صورت طبیعی تحت تنظیم پروموتور القایی فسفات قرار داشت، همواره از بیان CDS ژن‌های فوق‌الذکر تحت پیش‌برنده دائمی CaMV 35S برخوردار بودند. انتقال ژن به گیاهان به روش Floral Dip و

عناصر غذایی حیاتی نظیر فسفر در سلول‌های گیاه، کاهش رشد و عملکرد گیاه را در پی دارد (Zhu, 2001; Ashraf and Harris, 2004).

فسفر از نظر کمی و کیفی یکی از مهم‌ترین عناصر غذایی موجودات زنده به شمار می‌رود که در تشکیل مولکول‌های زیستی نظیر فسفات، پیروفسفات، ATP، ADP و AMP و همچنین در فتوسنتز، تنفس سلولی، انتقال انرژی و تنظیم سوخت‌وساز درون‌سلولی نقش اساسی دارد (Rychter and Rao, 2005). گیاهان در مواجهه با شرایط کمبود فسفر، تغییرات مورفولوژیک و فیزیولوژیک متعددی در خود ایجاد می‌کنند که از آن جمله می‌توان به تغییر در بیان ژن‌های فسفاتازها و ترشح برخی از این آنزیم‌ها به محیط، تحریک انتقال فسفات در گیاه، افزایش رشد ریشه نسبت به ساقه، افزایش رشد ریشه‌های موئین، افزایش تعداد ریشه‌های جانبی، تغییر در محتوای فسفولیپیدهای کلروپلاست و ترشح پروتون و اسیدهای آلی به ریزوسفر اشاره نمود (Del Pozo et al., 1999). تحت شرایط تنش شوری، بیان و یا افزایش بیان اسیدفسفاتازها در گیاهانی نظیر جو (Walia et al., 2006)، یونجه (Ehsanpour and Amini, 2003) نخودفرنگی و گندم (Barrett-Lennard et al., 1982, 1999) گزارش شده است.

اسید فسفاتازها، فسفات را از مونواسترهای فسفات و انیدریدها در دامنه‌ای از pH اسیدی هیدرولیز می‌کنند و در تولید، انتقال و بازیافت Pi^۱ فعالیت دارند (Veljanovski et al., 2006). ژنوم گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* دارای ۵۸ اسیدفسفاتاز بوده که از این میان، ۲۹ ژن متعلق به *AtPAP*^۲ها می‌باشند (Lohrasebi et al., 2007) و نقش مهمی در حفظ هومئوستازی^۳ فسفات درون‌سلولی گیاه بر عهده دارند (Lu et al., 2008). در پژوهشی که توسط Lohrasebi و همکاران (2007) صورت گرفت، گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* تحت شرایط تنش‌های مختلف از جمله فاقد گوگرد، فاقد نیتروژن، نمک بالا (۱۰۰ mM NaCl)، سرما و کمبود فسفر قرار گرفت. نتایج حاکی از بیان ژن *AtPAP26* صرفاً در شرایط کمبود فسفر و تنش شوری بود. در شرایط کمبود فسفات، اسیدفسفاتاز *AtPAP26* با فعالیت

^۴ Scavenging

^۵ Abscisic acid; ABA

^۶ Wild-type; WT

^۷ Overexpressed; OE

^۱ Inorganic phosphate; Pi

^۲ *Arabidopsis thaliana* purple acid phosphatase; AtPAP

^۳ Homeostasis

به دلیل پتانسیل مختلف ژنوتیپ‌های بیش‌بیان و جهش‌یافته انتخاب گردید.

شاخص‌های اندازه‌گیری شده

درصد گل‌دهی در دو، چهار، شش و هشت روز (تا مشاهده ۱۰۰٪ گل‌دهی حداقل در یکی از گیاهان) بعد از اعمال تنش شوری و در خلال دوره تنش با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم اندازه‌گیری شد. همچنین تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در غلاف به ازای هر ژنوتیپ تعیین گردید. پس از رسیدگی فیزیولوژیک بذور، وزن هزار دانه و همچنین میزان عملکرد کل دانه بر اساس حاصل‌ضرب تعداد غلاف در بوته × تعداد دانه در غلاف × وزن هزار دانه محاسبه گردید.

محتوای فسفر کل و آزاد

اندازه‌گیری میزان فسفات کل و فسفات آزاد درون سلولی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم به روش آمز (Ames 1966) و با اعمال تغییرات به شرح زیر اندازه‌گیری شد. مقدار ۵۰ mg بافت گیاهی پودر شده در ازت مایع به لوله پیرکس انتقال داده شد. سه برابر حجم بافت، محلول نیترات منیزیم $Mg(NO_3)_2$ ۱۲٪ (حل شده در اتانول ۹۶٪) اضافه گردید. در مرحله بعد لوله‌های حاوی نمونه‌ها روی شعله مستقیم تا سوختن کامل نمونه‌ها و تبدیل به خاکستر سفید قرار گرفتند. جهت هیدرولیز کلیه پیروفسفات‌ها، مقدار ۱ ml پرکلریک اسید ($HClO_4$) غلیظ (۱۵ N) به هر لوله سرد اضافه و در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳ تا ۴ ساعت در آب در حال جوش تا حل شدن فسفات موجود در نمونه‌ها قرار گرفتند و ورتکس هر ۱۵ دقیقه صورت گرفت. حجم نهایی هر محلول با آب دو بار تقطیر به ۲ ml رسانده شد و کلیه نمونه‌ها در طول موج ۸۲۰ nm قرائت گردید.

به‌منظور اندازه‌گیری محتوای فسفات آزاد درون سلولی، ابتدا ۱۰۰ mg بافت گیاهی پودر شده در ازت مایع به میکروتیوب ۱/۵ ml انتقال داده شد. مقدار ۲۰۰ μ l آب دو بار تقطیر به کلیه نمونه‌ها اضافه و به‌خوبی ورتکس گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ قرار گرفت و روشناور به میکروتیوب‌های جدید انتقال یافت. مقدار ۱۰ μ l از روشناور حاصل به همراه ۲۹۰ μ l آب

Vacuum Infiltration به گیاهان *آرابیدوپسیس تالیانا* طبیعی انجام شد. غربالگری گیاهان تراریخت در محیط کشت MS انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (100 mg l^{-1}) و همچنین به کمک واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26* تأیید گردید (Jamali, 2014; Sabet et al., 2018).

همچنین، از ژنوتیپ‌های جهش‌یافته‌ی هموزیگوت ($^{\Delta}$ Mu) Mu17 (SALK-097940) و Mu26 (SALK-152821) به تفکیک دارای درج T-DNA در ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26* به‌منظور تأیید تأثیر این دو ژن بر عملکرد و اجزا عملکرد دانه استفاده شد. درج T-DNA در ژن‌های مذکور به کمک واکنش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها و آغازگر T-DNA (LBb1) انجام شد (Sabet, 2011; Jamali, 2014). همچنین از ژنوتیپ جهش‌یافته دوگانه دارای درج T-DNA در هر دو ژن ($^{\Delta}$ DM)، حاصل تلاقی ژنوتیپ‌های جهش‌یافته‌های Mu17 و Mu26، استفاده شد (Farhadi et al., 2015).

شرایط کشت و رشدی گیاهان

بذور کلیه‌ی گیاهان مورد بررسی در پتری‌دیش حاوی یک‌لایه کاغذ صافی واتمن مرطوب به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط تاریکی و دمای 4°C (به‌عنوان پیش تیمار جهت جوانه‌زنی همزمان بذور) قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از جوانه‌زنی به گلدان‌های حاوی پیت، پرلیت و ورمیکولیت با نسبت ۱:۱:۱ منتقل هر دور روز یک‌بار و به مدت چهار هفته با محلول هوگلند (Landis et al., 2009) واجد فسفات کافی ($1/25 \text{ KH}_2\text{PO}_4$) آبیاری شدند. آزمایش‌ها در سه تکرار زیستی (۲۰-۱۵ گیاه در هر تکرار) در اتاق رشد با شرایط نوری 7000 Lux و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای $23-25^{\circ}\text{C}$ انجام شد. تیمار شوری گیاهچه‌ها به مدت ۱۶ روز با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و 150 mM کلرید سدیم (NaCl) به همراه محلول آبیاری ذکرشده حاوی 1 mM ($1/25 \text{ KH}_2\text{PO}_4$) تیمار گردیدند. با توجه به آستانه تحمل به تنش شوری 100 mM در گیاه *آرابیدوپسیس* (Saleki et al., 1993)، در پژوهش حاضر علاوه بر سطح آستانه، از دو سطح کم‌تر و بیش‌تر ۵۰ و 150 mM کلرید سدیم (NaCl)

⁹ Double Mutant; DM

⁸ Mutant; Mu

در غلظت ۱۵۰ شوری برآورد گردد، واریانس خطای نهایی در آزمایش فاکتوریل عمدتاً ناشی از سطح غلظت صفر تنش شوری خواهد بود. در چنین شرایطی مقایسه میانگین ترکیبات تیماری، به روش متداول سبب پوشیده ماندن اختلاف بین ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش شوری می‌شود. ضمن آن که تفاوت زیاد واریانس خطاها موجب نقض فریضه‌های تجزیه واریانس نیز می‌گردد. از این رو در تحقیق حاضر با اعمال برش‌دهی فیزیکی^{۱۳}، ژنوتیپ‌ها در هر سطح تنش شوری مقایسه شدند و به روش One-Way ANOVA تجزیه واریانس داده‌ها انجام گردید.

نتایج

تأثیر اسیدفسفات‌های *AtPAP26* و *AtPAP17* بر

گل‌دهی

روند گل‌دهی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف تنش شوری از نظر شیب خط رگرسیون در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۱). معنی‌دار شدن اثر متقابل نشان داد روند گل‌دهی گیاهان در غلظت‌های مختلف شوری یکسان نبوده است.

دو بار تقطیر و $700 \mu\text{l}$ معرف سنجش فسفات (آسکوربیک‌اسید ۱۰٪، آمونیوم مولیبدات $(\text{H}_2\text{MoO}_7\text{N}_6\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ۴۲٪) در سولفوریک‌اسید (H_2SO_4) ۱ N به نسبت (۶:۱) مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 45°C آنکوبه گردید. قرائت جذب نور نمونه‌ها در طول موج 820 nm صورت گرفت.

منحنی استاندارد فسفات کل و آزاد درون سلولی با استفاده از رقت‌های مختلف KH_2PO_4 ترسیم و فرمول رگرسیونی و r^2 مربوطه‌ی حاصل از آن به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای انجام آزمون آماری ابتدا فرض نرمال بودن باقی‌مانده‌ها بررسی شد. تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA^{۱۰}) با استفاده از نرم‌افزار SAS V.9.2 صورت گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل ژنوتیپ (در شش سطح) و غلظت شوری (در چهار سطح) و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی^{۱۱} با سه تکرار انجام شد. همچنین، مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون^{۱۲} LSD و در سطح احتمال معنی‌داری $P < 0.01$ انجام شد.

با توجه به آنکه واریانس خطای تجزیه واریانس شاخص‌های اندازه‌گیری شده در غلظت صفر، به دلیل پراکنش بیش‌تر باقی‌مانده‌ها، می‌تواند بسیار بیش‌تر از همان شاخص

جدول ۱. تجزیه واریانس منابع تغییر عملکرد و اجزاء عملکرد دانه در ژنوتیپ‌های *Arabidopsis thaliana* تحت شرایط تنش شوری

Table 1. Analysis of variance of yield and yield components on *Arabidopsis thaliana* genotypes subjected under NaCl stress

میانگین مربعات (Mean Square)								
Source of Variation	منابع تغییرات	درجه آزادی	شیب خط رگرسیون Slope of regression line	گل‌دهی Flowering (%)	تعداد بذر در بوته No. of pod plant ⁻¹	تعداد بذر در غلاف No. of seed pod ⁻¹	وزن هزار دانه 1000 Seed weight	عملکرد کل دانه Total seed yield
Genotype	ژنوتیپ	5	36.96**	1318.58**	684.12**	10.39**	167.02**	6.98**
Stress	تنش	3	37.38**	2023.17**	1529.21**	36.23**	391.95**	45.66**
Stress×Genotype	ژنوتیپ × تنش	15	17.76*	498.51**	159.05**	4.38**	26.21**	1.00**
Error	خطا	48	8.56	169.01	4.67	1.31	0.84	0.38
CV (%)	ضریب تغییرات (%)		24.80	18.65	21.96	8.46	7.90	28.53

* و **: به ترتیب معنی‌داری در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪، respectively

¹ Physical slicing

¹⁰ Analysis of variance; ANOVA

¹¹ Completely Randomized Design; CRD

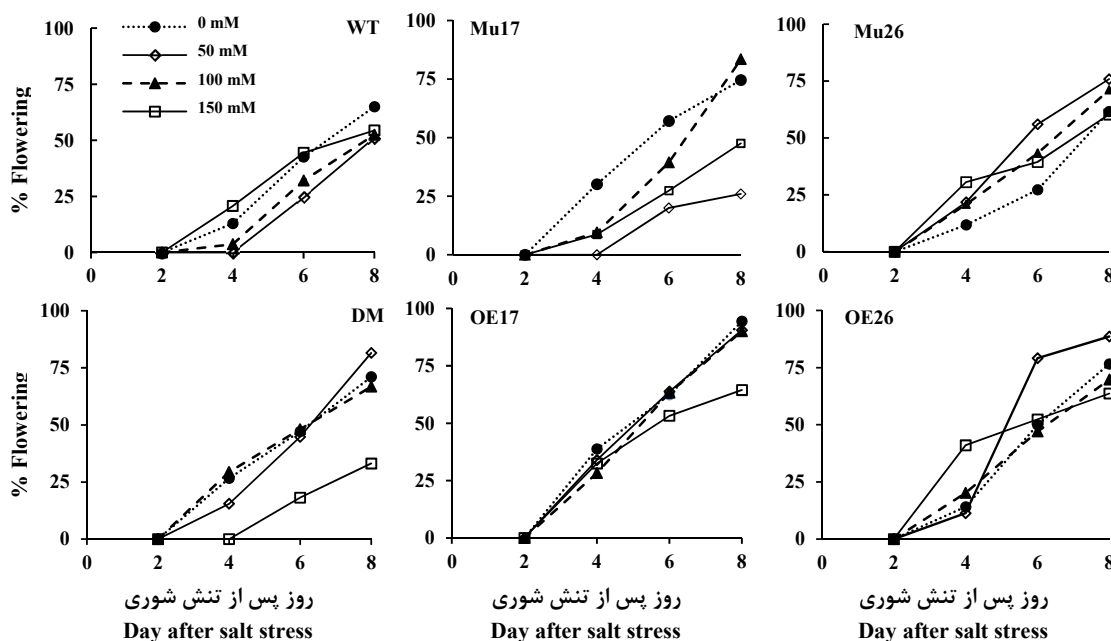
¹² Least Significant Difference; LSD

که به ترتیب دارای افزایش معنی‌دار ۷۶/۹۴٪ و ۷۳/۱۶٪ نسبت به گیاهان طبیعی بودند (جدول ۲). در همین غلظت، درصد گل‌دهی در گیاهان جهش‌یافته همواره بیش‌تر از گیاهان طبیعی بود. با افزایش غلظت شوری از ۱۰۰ به ۱۵۰ mM، گیاهان OE26 کم‌ترین میزان کاهش گل‌دهی (۶/۱۹٪) را نشان دادند و گیاهان Mu17 و DM با ۳۳/۱۰٪ و ۵۳/۲۵٪ بیش‌ترین میزان کاهش گل‌دهی را داشتند (جدول ۲).

در غلظت ۵۰ تنش شوری، شیب‌خط گل‌دهی در گیاهان بیش‌بیاں بالاتر از گیاهان طبیعی بود به‌طوری‌که شیب‌خط در گیاهان OE17 و OE26 به ترتیب ۲۸/۶۷٪ و ۴۲/۳۲٪ نسبت به گیاهان طبیعی افزایش معنی‌دار نشان دادند. در غلظت ۱۰۰ mM به‌عنوان حد آستانه تحمل گیاه *Arabidopsis* به تنش کلرید سدیم (Saleki et al., 1993) همچنان گیاهان OE17 دارای بیش‌ترین شیب‌خط (۲۹/۹۵٪ بیش‌تر) نسبت به گیاهان WT بودند (شکل ۱ و جدول ۲).

درصد گل‌دهی

در غلظت ۵۰ mM تنش شوری، بیش‌ترین درصد گل‌دهی متعلق به گیاهان OE17 (۹۰/۵۸٪) و OE26 (۸۸/۶۴٪) بود



شکل ۱. روند گل‌دهی گیاهان *Arabidopsis thaliana* مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف شوری، WT: گیاهان طبیعی، Mu17: گیاهان جهش‌یافته ژن *AtPAP17*، Mu26: گیاهان جهش‌یافته ژن *AtPAP17*، DM: گیاهان جهش‌یافته دوگانه ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26*، OE17: گیاهان بیش‌بیاں ژن *AtPAP17* و OE26: گیاهان بیش‌بیاں ژن *AtPAP26* در غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ mM کلرید سدیم (NaCl). اندازه‌گیری بر روی گیاهان مورد مطالعه که همگی ۲۸ روز پس از جوانه‌زنی به مدت ۲، ۴، ۶ و ۸ روز تحت غلظت‌های مختلف شوری ذکر شده با محلول آبیاری دارای ۱/۲۵ mM فسفات صورت گرفت. داده‌ها میانگین سه تکرار زیستی از مجموع ۱۵ تا ۲۰ گیاه در هر تکرار است.

Fig. 1. Trend of flowering on *Arabidopsis thaliana* genotypes subjected to 0, 50, 100 and 150 mM NaCl. Wild type (WT), overexpress (OE), single mutant (Mu), and double mutant (DM) genotypes for *AtPAP17* and *AtPAP26* genes. After 28 days growing at normal condition, the plants were subjected to salt stress by applying 50, 100 and 150 mM NaCl concentrations involving 1.25 mM KH_2PO_4 . The control plants were grown without addition of NaCl. Flowering percentage were measured at 2, 4, 6, and 8 days after applying salt stress. There were three replications (with 15-20 plants on each replication) of each treatment.

جدول ۲. مقایسه میانگین‌های (\pm SE) صفات زئوتیپ‌های *Arabidopsis thaliana* مورد مطالعه در تنش کلرید سدیمTable 2. Means (\pm SE) comparison of yield and yield components on *Arabidopsis thaliana* genotypes subjected to NaCl stress

غلظت کلرید سدیم Co. NaCl	ژنوتیپ Geno-type	شیب خط رگرسیون Slope of regression line	درصد گل‌دهی Flowering	تعداد غلاف در	تعداد بذر در	وزن هزار دانه	عملکرد کل
				بوته No. of pod plant ⁻¹	غلاف No. of seed pod ⁻¹	1000 Seed weight (mg)	دانه Total seed yield (mg plant ⁻¹)
0mM	WT	11.24 \pm 0.69 ^{ab}	65.04 \pm 5.1 ^b	6.44 \pm 1.3 ^a	36.00 \pm 0.6 ^b	17.00 \pm 0.2 ^b	3.92 \pm 0.8 ^{ab}
	Mu17	4.89 \pm 0.66 ^c	25.95 \pm 1.0 ^c	2.66 \pm 0.2 ^b	35.00 \pm 1.7 ^b	15.73 \pm 0.5 ^c	3.47 \pm 0.1 ^b
	Mu26	9.86 \pm 1.50 ^b	61.62 \pm 3.6 ^b	6.51 \pm 0.3 ^a	34.67 \pm 1.2 ^b	16.40 \pm 0.1 ^b	3.70 \pm 0.2 ^{ab}
	DM	11.69 \pm 1.35 ^{ab}	71.11 \pm 4.4 ^b	8.78 \pm 0.9 ^a	36.33 \pm 0.3 ^b	15.20 \pm 0.1 ^c	4.86 \pm 0.5 ^{ab}
	OE17	15.38 \pm 1.1 ^b	94.44 \pm 5.5 ^a	8.42 \pm 1.2 ^a	40.67 \pm 1.2 ^a	18.07 \pm 0.4 ^a	5.27 \pm 0.6 ^a
	OE26	13.29 \pm 2.16 ^{ab}	76.67 \pm 6.7 ^b	7.89 \pm 0.4 ^a	33.33 \pm 0.7 ^b	18.07 \pm 0.2 ^a	4.77 \pm 0.3 ^{ab}
50mM	WT	11.72 \pm 0.72 ^b	51.19 \pm 1.9 ^c	6.70 \pm 1.1 ^a	32.00 \pm 1.5 ^b	15.67 \pm 0.2 ^b	3.32 \pm 0.4 ^a
	Mu17	12.42 \pm 0.40 ^b	74.60 \pm 12.9 ^{ab}	3.47 \pm 0.8 ^b	17.67 \pm 1.4 ^c	11.93 \pm 0.8 ^c	0.71 \pm 0.1 ^b
	Mu26	13.21 \pm 1.80 ^b	75.84 \pm 7.3 ^{ab}	5.71 \pm 0.6 ^{ab}	28.00 \pm 1.5 ^b	13.00 \pm 0.3 ^c	2.10 \pm 0.3 ^{ab}
	DM	13.70 \pm 0.89 ^{ab}	81.57 \pm 4.2 ^b	6.01 \pm 0.8 ^{ab}	21.00 \pm 1.0 ^c	9.00 \pm 0.2 ^d	1.12 \pm 0.1 ^b
	OE17	15.08 \pm 0.49 ^a	90.58 \pm 1.2 ^a	5.81 \pm 1.1 ^{ab}	36.67 \pm 1.2 ^a	17.13 \pm 0.8 ^a	3.69 \pm 0.8 ^a
	OE26	16.68 \pm 1.46 ^a	88.64 \pm 7.3 ^a	6.59 \pm 0.8 ^a	38.33 \pm 0.7 ^a	15.13 \pm 0.5 ^b	2.90 \pm 0.8 ^a
100mM	WT	11.75 \pm 0.18 ^b	81.82 \pm 2.0 ^{ab}	4.27 \pm 0.5 ^b	28.33 \pm 3.5 ^b	12.06 \pm 1.8 ^b	1.45 \pm 0.3 ^c
	Mu17	12.39 \pm 1.46 ^b	71.14 \pm 5.3 ^b	4.35 \pm 0.3 ^b	22.33 \pm 1.4 ^c	9.73 \pm 0.3 ^b	0.94 \pm 0.1 ^d
	Mu26	11.79 \pm 0.92 ^b	71.15 \pm 4.5 ^b	6.75 \pm 0.4 ^a	25.67 \pm 0.3 ^{bc}	11.40 \pm 0.4 ^b	1.73 \pm 0.0 ^{bc}
	DM	11.56 \pm 0.90 ^b	70.85 \pm 7.9 ^b	5.01 \pm 0.6 ^b	0.00 \pm 0.0 ^d	0.00 \pm 0.0 ^c	0.00 \pm 0.0 ^e
	OE17	15.27 \pm 0.64 ^a	90.11 \pm 5.0 ^a	4.12 \pm 0.2 ^b	26.67 \pm 0.3 ^{bc}	15.26 \pm 0.2 ^a	2.14 \pm 0.1 ^a
	OE26	11.81 \pm 0.33 ^b	69.80 \pm 1.6 ^b	5.33 \pm 0.3 ^b	34.33 \pm 0.7 ^a	12.00 \pm 0.4 ^b	2.19 \pm 0.1 ^a
150mM	WT	8.73 \pm 1.51 ^{ab}	54.44 \pm 10.9 ^a	3.23 \pm 0.4 ^b	21.33 \pm 2.1 ^b	9.60 \pm 0.3 ^c	0.67 \pm 0.1 ^c
	Mu17	8.05 \pm 2.39 ^{ab}	47.59 \pm 5.5 ^{ab}	3.05 \pm 0.3 ^b	10.00 \pm 0.0 ^c	0.00 \pm 0.0 ^d	0.00 \pm 0.0 ^d
	Mu26	9.98 \pm 0.82 ^a	60.32 \pm 5.2 ^a	4.50 \pm 0.4 ^a	0.00 \pm 0.0 ^d	0.00 \pm 0.0 ^d	0.00 \pm 0.0 ^d
	DM	6.07 \pm 0.80 ^c	33.12 \pm 12.0 ^b	0.00 \pm 0.0 ^c	0.00 \pm 0.0 ^d	0.00 \pm 0.0 ^d	0.00 \pm 0.0 ^d
	OE17	10.12 \pm 0.29 ^a	64.50 \pm 4.5 ^a	3.90 \pm 0.2 ^b	31.67 \pm 1.2 ^a	14.33 \pm 1.0 ^a	1.88 \pm 0.2 ^a
	OE26	10.74 \pm 0.35 ^a	65.48 \pm 3.0 ^a	3.22 \pm 0.2 ^b	22.67 \pm 0.3 ^b	11.53 \pm 0.6 ^b	1.27 \pm 0.1 ^b

اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها ($p > 0.01$) برای شاخص‌های مورد مطالعه در هر سطح غلظت کلرید سدیم با حروف مختلف نشان داده شده است.

Mean values for each level of NaCl concentrations in a column with different letters are significantly different at $P < 0.01$.

را نسبت به گیاهان WT در غلظت ۱۰۰ mM شوری نشان دادند (جدول ۲).

تعداد بذر در غلاف

با افزایش شوری از ۰ به ۵۰ mM، بیش‌ترین کاهش تعداد بذر در گیاهان Mu17 و DM به ترتیب با ۴۹/۵۱٪ و ۴۲/۱۹٪ نسبت به گیاهان طبیعی مشاهده شد. گیاهان OE17 و OE26 در غلظت ۵۰ mM شوری به ترتیب ۱۴/۵۹٪ و ۱۹/۷۸٪ افزایش معنی‌دار تعداد بذر نسبت به گیاهان طبیعی نشان دادند (جدول ۲). گیاهان OE26 در غلظت ۱۰۰ mM

تأثیر اسید فسفاتازهای *AtPAP17* و *AtPAP26* بر

میزان اجزا عملکرد دانه

تعداد غلاف

در غلظت ۵۰ mM شوری، گیاهان Mu17 کاهش تعداد غلاف معنی‌دار ۴۸/۲۱٪ نسبت به گیاهان طبیعی نشان دادند. در شرایط ۱۵۰ mM شوری، علی‌رغم ۳۳/۱۲٪ گل‌دهی گیاهان DM، هیچ‌یک از گل‌های این گیاهان تشکیل غلاف ندادند (جدول ۲). برخلاف انتظار در این مرحله از رشد زایشی، گیاهان DM افزایش معنی‌دار تعداد غلاف در هر بوته

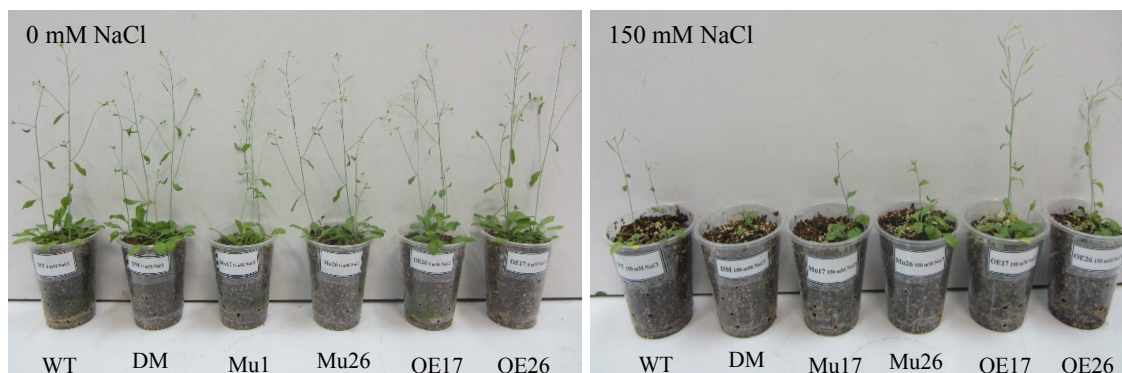
برای جوانه‌زنی در غلظت ۱۵۰ mM شوری بودند. با وجود تداوم دوره شوری (تا ۲۸ روز)، گیاهان OE17 در غلظت ۱۰۰ mM شوری افزایش معنی‌دار به ترتیب ۲۶/۵۳٪ و گیاهان OE17 و OE26 به ترتیب افزایش معنی‌دار ۴۹/۲۷٪ و ۲۰/۱۰٪ وزن هزار دانه نسبت به گیاهان طبیعی در سطوح شوری مذکور را به خود اختصاص دادند (جدول ۲).

بنابراین به‌طور کلی با افزایش مدت‌زمان اعمال تنش شوری، گیاهان DM تحت شرایط ۱۵۰ mM شوری علی‌رغم ۳۳٪/۱۲ گل‌دهی اما هیچ‌یک از گل‌ها به غلاف نرفتند. گیاهان Mu26 تحت شرایط ۱۵۰ mM تنش شوری و گیاهان DM در غلظت ۱۰۰ mM شوری با وجود میانگین به ترتیب ۴/۵۰ و ۵/۰ غلاف در هر بوته اما در مرحله بذردهی قادر به تولید بذر نبودند. در مرحله بعدی، گیاهان Mu17 نیز با وجود میانگین ۱۰ بذر در هر غلاف اما با افزایش تداوم دوره تنش شوری در سطح ۱۵۰ mM، این تعداد بذر نیز نکرده شده و فاقد قوه‌نامیه کافی و مناسب برای جوانه‌زنی بودند. از طرفی گیاهان OE17 و OE26 اختلاف معنی‌داری در صفات موردبررسی با گیاهان طبیعی نشان دادند (شکل ۲).

شوری بیش‌ترین تعداد بذر (میانگین ۳۴/۳۳ بذر در هر غلاف) و نسبت به گیاهان طبیعی در این غلظت ۲۱/۱۷٪ افزایش تعداد بذر نشان دادند. در غلظت ۱۵۰ mM شوری، گیاهان DM به دلیل عدم ورود به فاز غلاف‌دهی به طبع بذری تشکیل ندادند (جدول ۲). در این سطح از تنش شوری، گیاهان Mu26 علی‌رغم میانگین ۴/۵۰ غلاف در هر بوته و گیاهان DM در سطح پایین‌تر شوری (۱۰۰ mM) با میانگین ۵ غلاف در هر بوته قادر به تولید بذر نبودند. گیاهان بیش‌بیین OE17 با بیش‌ترین تعداد بذر (میانگین ۳۱/۶۶ بذر در هر غلاف) نسبت به گیاهان طبیعی افزایش ۴۸/۴۷٪ را در غلظت ۱۵۰ mM شوری به خود اختصاص دادند (جدول ۲).

وزن هزار دانه

علاوه بر گیاهانی که توانایی تحمل به شوری را تا مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی بذر نداشتند (گیاهان DM در غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ mM شوری و گیاهان Mu26 در غلظت ۱۵۰ mM شوری)، گیاهان Mu17 نیز علی‌رغم میانگین ۱۰ بذر در هر غلاف اما فاقد بذر واجد قوه‌نامیه کافی و مناسب



شکل ۲. تغییرات رشدی ژنوتیپ‌های *Arabidopsis thaliana* مورد مطالعه در مرحله زایشی در غلظت ۱۵۰ mM کلرید سدیم (NaCl). WT: ژنوتیپ طبیعی، DM: ژنوتیپ جهش‌یافته دوگانه ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26*، Mu17: ژنوتیپ جهش‌یافته ژن *AtPAP17*، Mu26: ژنوتیپ جهش‌یافته ژن *AtPAP26*، OE17: ژنوتیپ بیش‌بیین ژن *AtPAP17* و OE26: ژنوتیپ بیش‌بیین ژن *AtPAP26*.

Fig. 2. The growth changes of the *Arabidopsis thaliana* genotypes during the reproductive stage at 0 and 150 mM NaCl. Wild type (WT), overexpress (OE), single mutant (Mu), and double mutant (DM) genotypes for *AtPAP17* and *AtPAP26* genes.

شوری بود (جدول ۱ و شکل ۳). همه گیاهان جهش‌یافته در غلظت ۱۵۰ mM شوری و همچنین گیاهان DM در غلظت ۱۰۰ mM شوری توانایی تحمل تنش شوری در غلظت‌های ذکرشده را نداشته و به طبع از عملکرد دانه‌ای نیز برخوردار

عملکرد کل دانه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین عملکرد کل دانه بیان‌گر وجود اثر متقابل معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بین گیاهان مورد مطالعه و غلظت‌های اعمال‌شده

معنی‌دار ۵۴/۲۶٪ و ۵۱/۹۰٪ محتوای فسفات کل را نسبت به گیاهان طبیعی در غلظت‌های مذکور نشان دادند. گیاهان بیش‌بیان در همه شرایط (وجود و عدم وجود تنش شوری) با توجه به حضور پیش‌برنده دائمی CaMV 35S افزایش معنی‌دار محتوای فسفات کل نسبت به گیاهان طبیعی نشان دادند به طوری که در شرایط غلظت ۵۰ mM شوری، گیاهان OE17 و OE26 به ترتیب ۲/۸ و ۱/۸ برابر، در غلظت ۱۰۰ mM شوری ۲/۴ و ۱/۶ برابر و در غلظت ۱۵۰ mM شوری، ۱/۷ و ۱/۵ برابر محتوای فسفات کل بیش‌تری نسبت به گیاهان طبیعی در غلظت‌های مشابه برخوردار بودند (شکل ۴ الف).

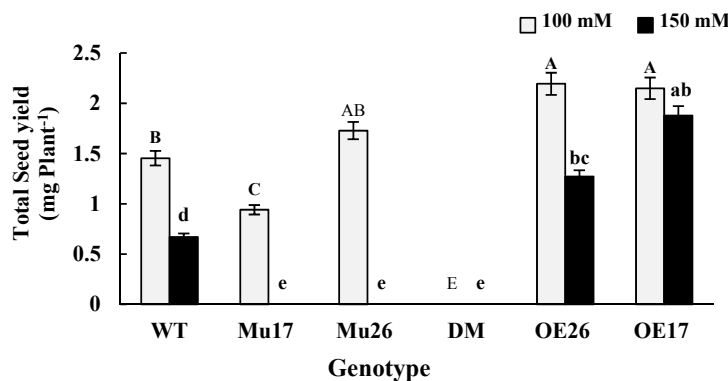
در شرایط ۱۵۰ mM تنش شوری، محتوای فسفر آزاد درون سلولی گیاهان Mu17 و Mu26 به ترتیب به میزان معنی‌دار ۳۹/۹۱٪ و ۲۳/۷۴٪ نسبت به گیاهان طبیعی کاهش یافت. گیاهان DM اگرچه در غلظت ۵۰ mM از محتوای فسفر آزاد درون سلولی بیش‌تری (۱۸/۱۸۳) نسبت به گیاهان طبیعی برخوردار بودند، در ۱۰۰ و ۱۵۰ mM شوری محتوای فسفر آزاد درون سلولی به ترتیب ۳۷/۵۲٪ و ۷۷/۲۰٪ نسبت به گیاهان طبیعی کاهش معنی‌دار پیدا کرد (شکل ۴ ب).

نبودند. گیاهان OE26 و OE17 نسبت به گیاهان طبیعی در غلظت ۱۰۰ mM شوری به ترتیب با ۵۱/۰۳٪ و ۴۷/۵۸٪ بهبود عملکرد دانه در رتبه اول و دوم قرار گرفتند. همان‌طور که اشاره شد با افزایش غلظت شوری (۱۵۰ mM) علاوه بر گیاهان جهش‌یافته دوگانه (DM)، جهش‌یافته منفرد (Mu) نیز فاقد عملکرد دانه بودند در حالی که گیاهان OE17 و OE26 با بهبود عملکرد دانه ۱/۷ و ۰/۸۹ برابری نسبت به گیاهان طبیعی در رتبه اول و دوم قرار گرفتند (شکل ۳).

تنظیم هومئوستازی فسفات

محتوای فسفات کل و آزاد درون سلولی

با افزایش سطح تنش شوری و به طبع افزایش تنش اسمزی القاشده در محیط کشت، میزان فسفات کل و آزاد درون سلولی در گیاهان طبیعی کاهش پیدا کرد (شکل ۴). میزان فسفات کل در گیاهان جهش‌یافته منفرد تحت شرایط ۵۰ و ۱۰۰ mM نسبت به گیاه طبیعی از نظر آماری کاهش معنی‌دار مشاهده نشد. در شرایط ۱۵۰ mM شوری، گیاهان Mu17 و Mu26 به ترتیب کاهش معنی‌دار ۳۸/۵۹٪ و ۲۰/۶۸٪ محتوای فسفات کل را نشان دادند (شکل ۴ الف). همچنین گیاهان DM در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ mM شوری کاهش



شکل ۳. تغییرات عملکرد کل دانه در گیاهان بیش‌بیان و جهش‌یافته ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26* آرابیدوپسیس *تالیانا* در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ mM کلرید سدیم (NaCl). WT: گیاهان طبیعی، Mu17: گیاهان جهش‌یافته ژن *AtPAP17*، Mu26: گیاهان جهش‌یافته ژن *AtPAP26*، DM: گیاهان جهش‌یافته دوگانه ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26*، OE17: گیاهان بیش‌بیان ژن *AtPAP17* و OE26: گیاهان بیش‌بیان ژن *AtPAP26*. داده‌ها میانگین سه تکرار زیستی از مجموع ۱۵ تا ۲۰ گیاه در هر تکرار است اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال معنی‌داری ۰/۰۱ < P شد. تفاوت آماری بین سطح ۱۰۰ mM کلرید سدیم توسط حروف بزرگ و بین سطح ۱۵۰ mM کلرید سدیم با حروف کوچک نشان داده شده است.

Fig. 3. The changes in total yield of overexpress and mutant *Arabidopsis thaliana* genotypes of *AtPAP17* and *AtPAP26* genes treated at 100 and 150 mM NaCl concentrations. Wild type (WT), overexpress (OE), single mutant (Mu), and double mutant (DM) genotypes for *AtPAP17* and *AtPAP26* genes. There were three replications (with 15-20 plants on each replication) of each treatment. The significant mean differences ($P < 0.01$) were separately shown at each level of salt stress with uppercase and lowercase.

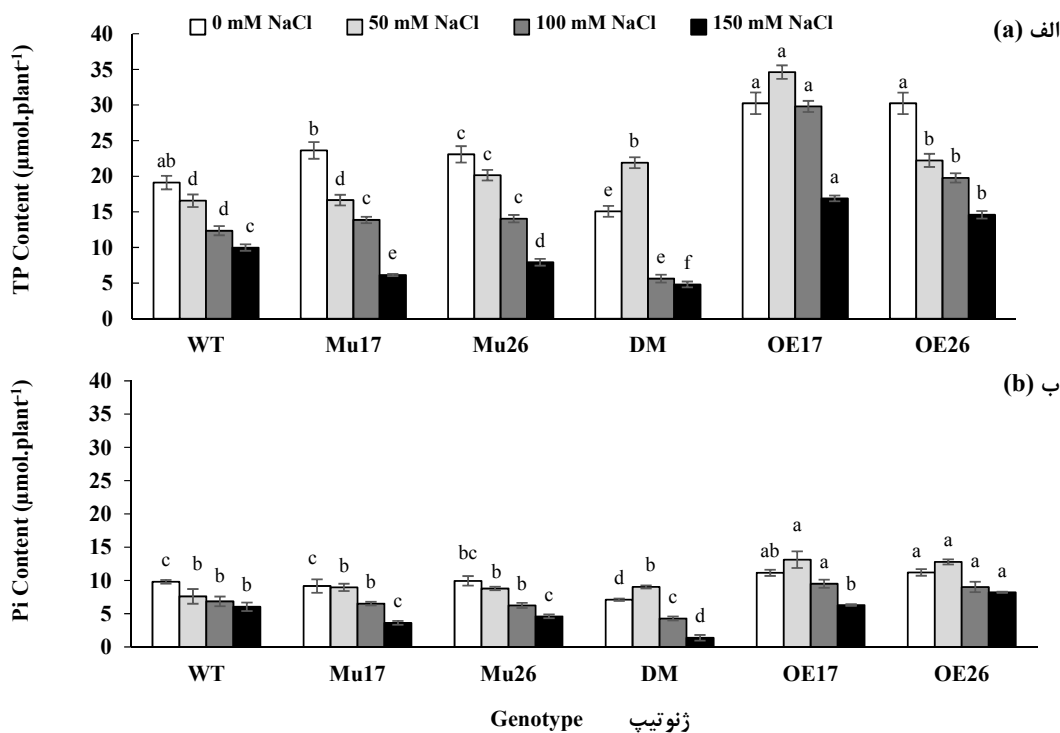
جدول ۳. تجزیه واریانس منابع تغییرات فسفات کل و آزاد درون سلولی در ژنوتیپ‌های *Arabidopsis thaliana* تحت شرایط تنش شوری

Table 3. Analysis of variance of the yield and yield components on *Arabidopsis thaliana* genotypes subjected under NaCl stress

Source of Variation	منابع تغییرات (df)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (Mean Square)	
			فسفر کل (TP Content)	فسفر آزاد (Pi Content)
Genotype	ژنوتیپ	5	415.34**	41.57**
Stress	تنش	3	687.02**	101.33**
Genotype×Stress	ژنوتیپ × تنش	15	31.80**	3.15**
Error	خطا	48	1.63	1.00
C.V. (%)	ضریب تغییرات (%)		12.55	7.15**

** : Significant at the 1% level of probability

** : معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪



شکل ۴. محتوای فسفات کل و آزاد درون سلولی گیاهان *Arabidopsis thaliana* مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف شوری، WT: گیاهان طبیعی، Mu17: گیاهان جهش یافته ژن *AtPAP17*، Mu26: گیاهان جهش یافته ژن *AtPAP26*، DM: گیاهان جهش یافته دوگانه ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26*، OE17: گیاهان بیش بیان ژن *AtPAP17* و OE26: گیاهان بیش بیان ژن *AtPAP26* در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ mM کلرید سدیم (NaCl). اندازه‌گیری بر روی گیاهان ۳۵ روزه صورت گرفت که همگی بعد از ۲۸ روز پس از جوانه‌زنی به مدت ۱۶ روز تحت غلظت‌های مختلف شوری ذکر شده با محلول آبیاری دارای ۱/۲۵ mM فسفات صورت گرفت. داده‌ها میانگین سه تکرار زیستی از مجموع ۲۰ تا ۲۵ گیاه در هر تکرار است. اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها ($p < 0.05$) بین هر سطح کلرید سدیم توسط حروف مختلف نشان داده شده است.

Fig. 4. The total and inorganic phosphate content in *Arabidopsis thaliana* genotypes subjected to the NaCl concentrations. Wild type (WT), overexpress (OE), single mutant (Mu), and double mutant (DM) genotypes for *AtPAP17* and *AtPAP26* genes. After 28 days growing at normal condition, the plants were subjected to salt stress by applying 50, 100 and 150 mM NaCl concentrations involving 1.25 mM KH_2PO_4 . The control plants were grown without addition of NaCl. TP and Pi content were measured on 35-day-old plants. There were three replications (with 15-20 plants on each replication) of each treatment. The significant mean differences ($P \leq 0.01$) were shown with different letters.

نیازمند حفظ همئوستازی و تعادل فسفر سیتوزولی خواهد بود. این تعادل با انتقال فسفر از واکونل و بافت‌های پیر گیاه به اندام‌های جوان صورت می‌پذیرد (Rychter and Rao, 2005). فراهم نشدن فسفات کافی در سلول‌ها سبب کاهش نسبت ATP/ADP، اختلال در فعالیت آنزیم^{۱۴} Rubisco، کاهش بازسازی^{۱۵} RuBP و میزان فتوفسفوریلاسیون و درنهایت فتوستتزی و کاهش تثبیت کربن گیاهان می‌شود (Rychter and Rao, 2005). در پژوهشی مشخص شد که محتوای کربوهیدرات کل، به‌عنوان شاخصی از میزان کارایی دستگاه فتوستتزی، در ژنوتیپ‌های بیش‌بیان OE17 و OE26 بیش‌تر از ژنوتیپ طبیعی تحت غلظت ۱۵۰ mM کلرید سدیم بود (Abbasi, 2016)، از این‌رو افزایش عملکرد دانه ژنوتیپ‌های بیش‌بیان در این پژوهش در مقایسه با ژنوتیپ طبیعی، ناشی از فراهم شدن فسفر کافی جهت تعادل نسبت ATP/ADP، کمک به فعالیت آنزیم Rubisco، افزایش میزان فتوفسفوریلاسیون و انتقال ساخت مواد فتوستتزی بوده است. این در حالی بود که به دلیل تخریب ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26* در گیاهان جهش‌یافته، ساخت و انتقال مواد فتوستتزی در این ژنوتیپ‌ها با مشکل مواجه شد و عملکرد دانه در غلظت ۱۵۰ mM شوری برای این گیاهان مشاهده نشد.

مطالعات نشان می‌دهد که اسیدفسفاتاز PAP17 علاوه بر فعالیت اسیدفسفاتازی، دارای فعالیت پراکسیدازی نیز در ریشه‌ها و برگ‌های گیاه آرابیدوپسیس است (Del Pozo et al., 1999; Abbasi, 2016). از این‌رو بر اساس مطالعات قبلی و داده‌های حاصل از تحقیق حاضر می‌توان بیان نمود که گیاهان بیش‌بیان OE17 با فعالیت پراکسیدازی بیش‌تر نسبت به گیاهان طبیعی، تنش اکسیداتیو القاشده ناشی از تنش شوری را بهتر کنترل کرده و به طبع از شرایط رشدی مناسب‌تر و میزان عملکرد دانه بالاتری برخوردار بودند. از طرفی گیاهان جهش‌یافته DM و Mu17 به دلیل تخریب ژن *AtPAP17* بیش‌ترین میزان تخریب اکسیداتیوی را به خود اختصاص دادند به‌نحوی که درنهایت کم‌ترین میزان عملکرد دانه را نسبت به گیاهان طبیعی در غلظت ۱۵۰ mM شوری نشان دادند.

گیاهان OE17 و OE26 در غلظت ۵۰ mM شوری، افزایش معنی‌دار ۶۳٪ و ۶۸٪ محتوای فسفر آزاد درونی سلولی و در غلظت ۱۰۰ mM شوری، افزایش ۴۷٪/۳۸ و ۴۲٪/۳۱ این محتوا را نسبت به گیاهان طبیعی دادند. در غلظت ۱۵۰ mM شوری، گیاهان OE26 افزایش معنی‌دار ۸۵٪/۳۲ محتوای فسفر آزاد درونی سلولی نسبت به گیاهان طبیعی را به خود اختصاص دادند (شکل ۴ الف).

بحث

تنش شوری با اختلال در استفاده و بهره‌برداری از آب و مواد غذایی (Mahajan and Tuteja, 2005)، بر جذب فسفات از ریشه‌ها و انتقال آن به بافت‌های هوایی گیاهان تأثیر می‌گذارد. میزان این تأثیر، بسته به غلظت فسفات محلول خاک متفاوت است. چنانچه میزان فسفات بسیار کم و در بازه میکرو مولار (μM) باشد، تنش شوری باعث مهار جذب فسفر توسط گیاه و انتقال آن از ریشه به بافت‌های هوایی می‌شود (Navarro et al., 2001). اسیدفسفاتازها با تنظیم و حفظ همئوستازی فسفر درون‌سلولی، گیاه را در مواجهه با شرایط کمبود فسفات یاری می‌رسانند. از این‌رو گیاهانی که کارایی و پتانسیل بیش‌تری در نیل به این مهم داشته باشند، در این رقابت پیروز خواهند بود. در پژوهش حاضر، با افزایش غلظت کلرید سدیم و تداوم شرایط تنش شوری، اختلاف بین گیاهان مورد مطالعه در مراحل مختلف رشد زایشی واضح‌تر نمایان گردید. با توجه به یکسان بودن محیط کشت کلیه ژنوتیپ‌ها، عملکرد دانه بیش‌تر گیاهان بیش‌بیان در مقایسه با گیاهان طبیعی به دلیل فعالیت اسیدفسفاتازهای *AtPAP17* و *AtPAP26* و به طبع آن، تأمین فسفات کافی در دسترس برای سلول‌های گیاهی است. مؤید این مطلب، افزایش محتوای فسفر کل و آزاد گیاهان بیش‌بیان در مقایسه با گیاهان طبیعی بود که این افزایش می‌تواند حاصل مجموع بیان ژن‌های داخلی و تراژن *AtPAP17* و *AtPAP26* تحت پیش‌برنده دائمی CaMV 35S باشد.

فسفر پس از نیتروژن مهم‌ترین عنصر مؤثر بر گسترش سطح برگ و بهبود رشد و نمو گیاهان محسوب می‌شود. همچنین تولید مواد فتوستتزی و انتقال آن‌ها از کلروپلاست به سیتوزول، به شکل ترکیبات تریوزفسفات است. از این‌رو ساخت مواد فتوستتزی و انتقال آن از کلروپلاست به سیتوزول

^{۱۴} Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase; Rubisco

^{۱۵} Ribulose-1,5-Bisphosphate; RuBP

فسفر کل و آزاد و به طبع میزان عملکرد دانه ژنوتیپ‌های جهش‌یافته، کاهش معنی‌داری در مقایسه با ژنوتیپ WT نشان داد. نتایج حاکی از آن بود که بیان و یا افزایش بیان سایر ژن‌های شبکه اسیدفسفاتازی، قادر به حفظ هم‌موسازی فسفات سلول‌های این گیاهان در غلظت‌های زیاد شوری نبوده و تأثیر تخریب این دو ژن در شرایط تنش شوری شدید آشکار گردید.

تغییر روند در عملکرد دانه گیاهان مورد مطالعه در تحقیق حاضر تحت شرایط تنش شوری شدید، به‌روشنی حاکی از تأثیر ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26* جهت فراهم نمودن فسفر کافی در دسترس و بهبود عملکرد دانه بود. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه در گیاه *Arabidopsis thaliana* نشان داد استفاده از توان و پتانسیل داخلی خود گیاه می‌تواند راه‌کاری مؤثر در کاهش اثرات مخرب حاصل از تنش شوری شدید باشد. بر این اساس دو اسیدفسفاتاز ارغوانی *PAP17* و *PAP26* می‌توانند جهت مطالعه در گیاهان زراعی که عملکرد دانه حائز اهمیت اقتصادی است، معرفی شوند.

برخلاف انتظار، در سطح پایین‌تر از حد آستانه تحمل به تنش شوری در گیاه‌آرابیدوپسیس (۵۰ mM کلرید سدیم) با توجه به تخریب ژن‌های *AtPAP17* و *AtPAP26* در گیاهان جهش‌یافته، مرحله گل‌دهی این گیاهان نسبت به گیاهان طبیعی تحت تأثیر منفی قرار نگرفت. با علم به آن‌که گیاهان جهش‌یافته با تخریب یک یا هر دو ژن مهم *AtPAP17* و *AtPAP26* در شرایط تنش شوری، تنش کمبود فسفر القا شده را شدیدتر از سایر گیاهان حس کردند. در نتیجه برای جبران عدم فعالیت این دو ژن و تأمین فسفات موردنیاز سلول، سایر ژن‌های هم‌خانواده را روشن نموده و یا اینکه بیان آن‌ها را افزایش داده است (Hurley et al., 2010; Farhadi et al., 2019). به‌عبارت‌دیگر عدم کاهش معنی‌دار برخی شاخص‌ها در گیاهان جهش‌یافته در مقایسه با گیاهان طبیعی ناشی از رابطه جبرانی ژن‌های شبکه اسیدفسفاتازی در غلظت ۵۰ mM شوری خواهد بود. کاهش محتوای فسفر کل و آزاد درون‌سلولی گیاهان جهش‌یافته در این غلظت می‌تواند تائید‌کننده این موضوع باشند. درحالی‌که با افزایش غلظت کلرید سدیم به ۱۰۰ و ۱۵۰ mM، محتوای

منابع

- Abbasi-Vineh, M.A., 2016. The Role of Two Genes *AtPAP17* and *AtPAP26* in Salt Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana* Plants. M.Sc. dissertation, University of Tarbiat Modares, IRAN. [In Persian with English Summary].
- Ashraf, M.P.J.C., Harris, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 166(1), 3-16.
- Barrett-Lennard, E., Robson, A., Greenway, H., 1982. Effect of phosphorus deficiency and water deficit on phosphatase activities from wheat leaves. *Journal of Experimental Botany*. 33(4), 682-693.
- Barrett-Lennard, E.G., Van Ratingen, P., Mathie, M.H., 1999. The developing pattern of damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) due to the combined stresses of salinity and hypoxia: experiments under controlled conditions suggest a methodology for plant selection. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50(2), 129-136.
- Boyer, J.S., 1982. Plant productivity and environment. *Science*. 218(4571), 443-448.
- Del Pozo, J.C., Allona, I., Rubio, V., Leyva, A., De La Peña, A., Aragoncillo, C., Paz-Ares, J., 1999. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising oxidative stress conditions. *The Plant Journal*. 19(5), 579-589.
- Ehsanpour, A., Amini, F., 2003. Effect of salt and drought stress on acid phosphatase activities in alfalfa (*Medicago sativa* L.) explants under in vitro culture. *African Journal of Biotechnology*. 2(5), 133-135.
- Farhadi, S., 2015. Producing of Homozygote double mutant lines in *Arabidopsis thaliana* *PAP17* and *PAP26* Genes. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. [In Persian with English Summary].
- Farhadi, S., Sabet, MS., Moieni, A., Malboobi, MA., 2019. The effect of two phosphatase *AtPAP17* and *AtPAP26* gene-knock-out on growth period duration and flowering in *Arabidopsis thaliana* plants. *Modern Genetics Journal*. 15(1), 1-10. [In Persian with English Summary].

- Hasegawa, P.M., 2013. Sodium (Na^+) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany*. 92, 19-31.
- Hurley, B.A., Tran, H.T., Marty, N.J., Park, J., Snedden, W.A., Mullen, R.T., Plaxton, W.C., 2010. The dual-targeted purple acid phosphatase isozyme AtPAP26 is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis* to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology* 153(3), 1112-1122.
- Jamali, A., 2014. Functional Analysis of *AtPAP17* Gene Encoding a Purple Acid Phosphatase in *Arabidopsis thaliana* Plants. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. [In Persian with English Summary].
- Landis, T.D., Pinto, J.R., Davis, A.S., 2009. Fertigation injecting soluble fertilizers into the irrigation system. *Forest Nursery Notes*. 29(2), 4-13
- Lohrasebi, T., Malboobi, M. A., Samaeian, A., Sanei, V., 2007. Differential expression of *Arabidopsis thaliana* acid phosphatases in response to abiotic stresses. *Iran Journal Biotechnol.* 5(3), 130-139.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444(2), 139-158.
- Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Horie, T., Fairbairn, D.J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., Uozumi, N., Robertson, W., 2002. Altered shoot/root Na^+ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na^+ transporter AtHKT1. *FEBS letters*. 531(2), 157-161.
- Navarro, J.M., Botella, M.A., Cerdá, A., Martínez, V., 2001. Phosphorus uptake and translocation in salt-stressed melon plants. *Journal Plant Physiology*. 158(3), 375-381.
- Rychter, A.M., Rao, I., 2005. Role of phosphorus in photosynthetic carbon metabolism. *Handbook of Photosynthesis*, 2, 123-148.
- Robinson, W.D., Park, J., Tran, H.T., Del Vecchio, H.A., Ying, S., Zins, J.L., Patel, K., McKnight, T.D. and Plaxton, W.C., 2012. The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 63(18), 6531-6542.
- Sabet, M.S., Zamani, K., Lohrasebi, T., Malboobi, M.A., Valizadeh, M., 2018. Functional assessment of an overexpressed *Arabidopsis* purple acid phosphatase gene (*AtPAP26*) in tobacco plants. *Iranian Journal of Biotechnology*. 16(1), 31-41.
- Sabet, M.S., 2011. Functional Analysis of *AtPAP26* Gene Encoding a Purple Acid Phosphatase in *Arabidopsis thaliana* and Gene Transfer and Expression Analysis in tobacco. Ph.D. Dissertation, University of Tabriz, Tabriz, IRAN. [In Persian with English Summary].
- Saleki, R., Young, P.G., Lefebvre, D.D., 1993. Mutants of *Arabidopsis thaliana* capable of germination under saline conditions. *Plant Physiology*. 101(3), 839-845.
- Veljanovski, V., Vanderbeld, B., Knowles, V.L., Snedden, W.A., Plaxton, W.C., 2006. Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiology*. 142 (3), 1282-1293.
- Walia, H., Wilson, C., Wahid, A., Condamine, P., Cui, X., Close, T.J., 2006. Expression analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) during salinity stress. *Functional and Integrative Genomics*. 6(2), 143-156.
- Zamani, K., Sabet, M.S., Lohrasebi, T., Mousavi, A., Malboobi, M.A., 2012. Improved phosphate metabolism and biomass production by overexpression of *AtPAP18* in tobacco. *Biologia*. 67(4), 713-720.
- Zhu, Jian Kang, 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. 6 (2), 66-71.