مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۰، شماره ۱، بهار وتابستان ۱۴۰۰
صفحه ۶۷-۵۸

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3

DOR:20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 1
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بررسی بیان متفاوت ژن Pyrroline-5-carboxylate synthetase و برخی ژنهای مرتبط با پاسخ به تنش شوری درگندم

Evaluation of Pyrroline-5-carboxylate synthetase's Expression Pattern and Some Related Genes in Response to Salinity Stress in Bread Wheat

جمشید عظیمیان[۱]، امین آزادی[۲*]، اسلام مجیدی هروان[۱]، محمدرضا بختیاری زاده[۳] و رضا عزیزی نژاد[۱]

Jamshid Azimian[1], Amin Azadi[2,*], Eslam Majidi Hervan[3], Mohammad Reza Bakhtiarizadeh[4], Reza Azizinezhad[3]

۱- گروه به نژادی و بیوتکنولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه اصلاح نباتات، واحد یادگارامام خمینی(ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Plant Breeding, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: azadi.amin@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۷- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۱۷)

چکیده

تنش شوری یکی از محدودکننده ترین عوامل غیرزنده در تولید گندم می‌باشد. به منظور فائق آمدن بر این مشکل، شناخت نحوه پاسخ و عمل ژن‌ها در تنش می‌تواند اطلاعات مفیدی برای اصلاح گیاهان در جهت تحمل تنش‌های محیطی فراهم آورد. پژوهش حاضر با هدف شناسایی ژن‌هایی با الگوی بیان متفاوت بین دو حالت (نرمال و تحت تنش شوری) در گندم نان(*Triticum aestivum*) انجام‌شد. بررسی الگوی بیانی ژن‌های pyrroline-5-carboxylate synthetase, serine-threonine protein kinase و ژن Aldehyde dehydrogenase family 3 member I1, chloroplastic-like نشان داد پس از اعمال تنش میزان بیان نسبی این ژن‌ها نسبت به نمونه‌ی شاهد افزایش بیش‌تری داشت و بیان ژن‌های Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like، Putative calcium binding protein CML29 و GDSL esterase/lipase At2g40250-like نسبت به نمونه شاهد کاهش داشت. محتوی پرولین و بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز پرولین در شرایط تنش نسبت به شرایط کنترل تغییرات قابل توجهی را نشان داد. تنش شوری سبب القاء بیان ژن P5CS و افزایش سطح پرولین شد که می‌تواند بیانگر نقش مهم ژن pyrroline-5-carboxylate synthetase جهت انتقال به گیاهان حساس به منظور افزایش تحمل به شوری در آن‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی

پرولین،
qPCR،
تنش شوری،
گندم نان

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]

مقدمه

گندم گیاهی است از خانواده گندمیان، تک لپه، خودگشن، یکساله. گندم معمولی یا گندم نان به نام علمی *Triticum aestivum* که در سال ۱۸۵۳ توسط واویلوف نام‌گذاری گردیده است، جزء گروه گندم‌های هگزاپلوئید بوده و دارای گسترش و پراکندگی زیادی در جهان است و غالب‌ترین گونه به حساب می‌آید ارقام زراعی *Triticum aestivum* در مناطق مختلف دنیا و تحت شرایط اقلیمی متفاوت کشت می‌شوند (Khodabandeh, 1990). ایران دارای اقلیم گرم و خشک است و شوری گسترده در خاک و آب مشاهده می‌شود. ایران با داشتن ٦/٨ میلیون هکتار اراضی شور از کشورهای در معرض تهدید تنش شوری است (Haghighatnia and Alhani, 2020). پاسخ گیاهان به تنش شوری بسیار پیچیده است. این پاسخ از غلظت نمک، نوع یون‌ها، عوامل مختلف محیطی و مرحله رشد و نموی گیاه تأثیر می‌پذیرد. از یک‌سو، تنش اسمزی تحت شرایط شوری باعث آبگیری بافت‌های گیاهی می‌شود و به‌همین دلیل آن را خشکی فیزیولوژیک هم می‌نامند. از سوی دیگر، مسمومیت یونی در اثر تجمع یون‌های خاص بویژه سدیم ایجاد می‌گردد که موجب اختلال در واکنش‌های متابولیک گیاه می‌شود. برای مقابله با این تنش‌ها، در شرایط شوری کم و ملایم گیاه با افزایش غلظت مواد محلول، فشار اسمزی داخلی خود را حفظ می‌کند. در غلظت‌های بالای نمک گیاهان، با ورود و خروج یون‌ها، میزان Na^+ درون سیتوپلاسم، را کاهش داده و با ثابت نگهداشتن غلظت یون پتاسیم، نسبت Na^+/K^+ را پائین نگه می‌دارند. این ساز و کار به حدی در مقابله با اثرات سوء ناشی از تنش شوری مؤثر است که نسبت Na^+/K^+ در گیاه به‌عنوان یکی از ویژگی‌های مهم جهت تفکیک گونه‌های متحمل از حساس گزارش شده‌است(Ghvami *et al*., 2004).

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش های محیطی غیر زنده می‌باشد، به‌طوریکه بیش از ۱۰۰ کشور دنیا درگیر خاک‌های شور می‌باشند (Rengasamy, 2006). بنابر اعلام سازمان جهانی غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد(FAO) حدود ۳۹۷ میلیون هکتار زمین درسراسر جهان تحت تأثیر شوری قرار دارند که در این میان کشورهای آسیایی با ۱۹۵/۱میلیون هکتار زمین‌های متأثر از شوری، در معرض بیشترین آسیب ناشی از این پدیده هستند (Koohafkan and Stewart, 2008). در ایران حدود سی و شش درصد (٦/٨ میلیون هکتار) از زمین‌های کشاورزی شامل خاک‌های دارای درجات مختلفی از شوری هستند(Dehshiri and Modares Sanavy, 2017). بنابراین اصلاح گیاهان زراعی برای تحمل به شوری یکی از اهداف مهم اصلاح و به‌نژادی است. شناخت نحوه پاسخ و عمل ژن‌ها در تنش می‌تواند دانسته‌های بسیار مفیدی در رابطه با نحوه اصلاح گیاهان در جهت تحمل به تنش‌های محیطی فراهم آورد. به‌منظور شناسایی ساز و کارهای تحمل به شوری در گندم، شناسایی شبکه ژن‌های پاسخگو به تنش شوری در شرایط تنش شوری و بهبود تفسیر ژنی استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل جدید بسیار حائز اهمیت است. پژوهش حاضر با هدف شناسایی ژن های با الگوی بیان تفاوت بین دو حالت (نرمال و تحت تنش شوری) انجام شد

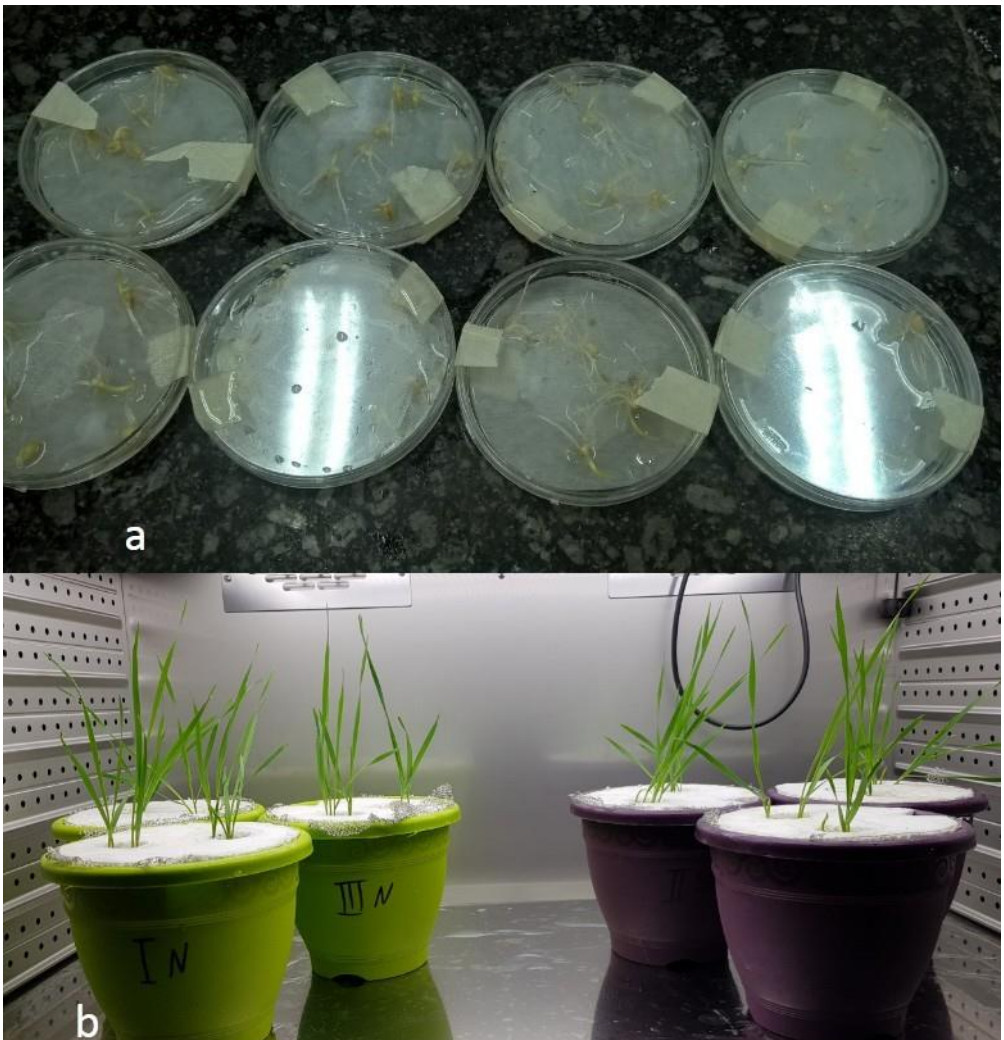
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش از رقم گندم متحمل به شوری" روشن ,Poustini and Siosemardeh, 2004; Dehdari *et al*.)" (2005 از مرکز تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و استفاده شد.

تیمار گیاهان: ابتدا بذور ضد عفونی شده برای مدت ۳ روز درون پتری دیش حاوی کاغذ صافی جوانه‌زنی کرده، سپس پنج گیاهچه یکنواخت به هر یک از شش گلدان پلاستیکی با قطر۲۰ و عمق ۲۵ سانتی متر حاوی محلول هیدروپونیک که مطابق دستورالعمل هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) تهیه شده‌بود، انتقال داده‌شد. سپس گلدان‌ها در داخل فیتوترون (BINDER: KBWF 720(E 5.2) با شرایط ١٦–٨ ساعت نور و تاریکی و دمای ۲۵–۲۰ درجه سانتیگراد در روز وشب و رطوبت ٦٠ تا ٧٠ درصد به مدت حدود سه هفته (یا ظهور برگ چهارم) قرار داده‌شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی و با سه تکرار انجام شد. بعد از ظهور برگ چهارم گیاهچه‌های شرایط تنش به مدت ٤٨ ساعت در

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]

معرض تنش شوری شدید ۲۵۰ میلی مولار قرار گرفتند (Moghimi *et al.*, 2018) و سپس کل برگ‌های گیاه از همه گلدان‌های نرمال و تنش بصورت جداگانه برداشت شد و به ازت مایع به فریزر ۸۰- منتقل شد. این بخش از پژوهش درآزمایشگاه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگارامام شهرری در پاییز سال ۱۳۹۶ انجام شد.



شکل ۱- a : ضد عفونی بذور به مدت سه روز درون پتری دیش و انتقال پنج گیاهچه یکنواخت به هر یک از شش گلدان حاوی محلول هیدروپونیک هوگلند **b**: **تعیین سه تکرار بیولوژیک برای تنش شوری و سه تکرار بیولوژیک برای شرایط نرمال(کنترل شده) و انتقال به فیتوترون.**

Fig 1. a) The disinfected seeds were kept in petri dish for three days to allow them to germinate and then five uniform seedlings were transferred to each of the six pots containing Hoagland hydroponic culture medium. **b)** Three biological replications were determined for both salinity stress and normal (controlled) conditions and the pots were transferred to phytotrons.

بررسی بیان ژن‌ها بـه روش Real Time PCR: استخراج RNA کل و سپس حذف DNA از هر تکرار بصورت جداگانه و با استفاده از کیتQIAGEN RNeasy plant mini kit و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. همچنین کیفیت و RNA استخراج شده به‌ترتیب بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی فرمالدهید و نانودراپ(Nano Drop 2000 spectrophotometer) کنترل شد. سنتز cDNA، توسط کیت شرکت سیناکلون (SINACLON, CAT. NO: RTS202) با استفاده از oligo (DT) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. شرایط واکنش ریل‌تایم و همچنین دمای اتصال پرایمرها در جدول‌های ذیل

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]

آورده شده‌است(جدول۲). جهت انتخاب ژن کاندید شش ژن با الگوی بیان متفاوت (سه ژن با بیان معنی داری مثبت یا UP و سه ژن نیز با بیان معنی داری منفی یا Down) بطور تصادفی (از تجزیه و تحلیل داده‌های ترانسکریپتوم موجود در مطالعه شوری گندم با شماره ثبت PRJNA589280 و بر اساس مطالعه‌های موجود در NCBI انتخاب شد (جدول۱).

جدول۱- ژن های انتخابی براساس مطالعه ها و منابع موجود

Table1. Selected genes based on available studies and references.

نام مطالعه	ژن انتخابی	رفرنس
Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity	pyrroline-5-carboxylate synthetase	(Wang *et al*., 2007)
GsSRK, a G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt stress	serine-threonine protein kinase	(Sun *et al*., 2013)
Transcriptome analysis of a *Triticum* Roshan in response to *aestivum* landrace salt stress conditions	Aldehyde dehydrogenase family 3 member I1, chloroplastic-like	(Azimian *et al*; 2021)
Mitochondrial proline oxidation is affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings	Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like	(Sun *et al*., 2013)
Transcriptome analysis of a *Triticum* Roshan in response to *aestivum* landrace salt stress conditions	Putative calcium binding protein CML29	(Azimian *et al*; 2021)
Transcriptome analysis of a *Triticum* Roshan in response to *aestivum* landrace salt stress conditions	GDSL_esterase/lipase_At2g40250-like	(Azimian *et al*; 2021)

طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های انتخابی از طریق نرم‌افزار آنلاین Primer3Plus (Untergasser *et al*., 2007) و سفارش سنتز الیگونوکلئوتیدها با مشخصات: OD=2 (0.025 umol) -- Purification: BioRP از طریق "شرکت تکاپو زیست" انجام‌شد. ریل‌تایم در دو تکرار انجام شد و برای نرمالیزاسیون و کنترل میزان بیان ژن‌ها از ژن اکتین-۲ با بیان ثابت به‌عنوان ژن مرجع(Housekeeping) و استاندارد مطابق آنچه توسط سایر پژوهشگران (Amirbakhtiar *et al*., 2019; Chaichi *et al*., 2019) انجام شد، صورت گرفت. واکنش‌های Real-Time PCR با استفاده از محلول SYBR Green ساخت شرکت Fermentas در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از Mix Master، دومیکرولیتر آغازگر پیشرو (۰/۳ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر آغازگر پسرو (۰/۳ میکرومولار) و ۱ میکرولیتر cDNA، انجام‌شد. چرخه دمایی و برنامه زنجیره ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه (پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد)، سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی (ده ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد)، اتصال آغازگر (۴۵ ثانیه در دمای اتصال تعیین شده در جدول۲) و بسط آغازگر (۱۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد)، در پایان یک چرخه حرارتی از دمای ۶۰ الی ۹۵ درجه با توقف پنج ثانیه‌ای در هر مرحله برای تهیه منحنی ذوب نمونه‌ها در نظر گرفته شد. در نهایت جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، از روش ct مقایسه ای (Livak and Schmittgen, 2001) (2-ΔΔCt) استفاده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 2. Primers used in this study.

دمای اتصال **Annealing temperature**	توالی آغازگر **Sequence of primer(5'-3')**	ژن **Gene**
57	F:5'-TCTGTGCGAGGAATGAAGGA-3' R:5'- CAACTAGTGCCATAACTACGACA-3'	pyrroline-5-carboxylate synthetase
63	F:5'-ACGTGTGGATGTGTTCCTGT-3' R:5'-TTACACAGCAAGGCCAATC-3'	serine-threonine protein kinase
59	F: 5'- AGCCATCTGTGCCCTAGTCT_3' R:5'- CGACCGGTCTGATCTAAGGT-3'	Aldehyde dehydrogenase family 3 member I1, chloroplastic-like
55	F:5'- AGAAGCGACGGAGTTAGGAG-3' R:5'- AGCCTGACGATTGAACAACA-3'	Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like
57	F:5'- CTAGCTAGAGGGCGTGCATA-3' R:5'- TCCACAACTCTCCTGACGTG-3'	Putative calcium binding protein CML29
62	F:5'- GCTGCAGATCGACCAACTTA-3' R:5'- GGGCTCACACATTGTAGGAA-3'	GDSL_esterase/lipase_At2g40250-like
60	F:5'- GCAGCTATAACTGGCAAAGC-3' R:5'- ACACCTTGGACTGATGCTGT-3'	ACTIN2 (HOUSEKEEPING GENE)

نتایج و بحث

این پژوهش به منظور بررسی الگوی بیانی ژن‌های pyrroline-5-carboxylate synthetase, serine-threonine protein kinase و ژن Aldehyde dehydrogenase family 3 member I1, chloroplastic-like نشان‌داد که پس از اعمال تنش میزان بیان نسبی این ژن‌ها نسبت به نمونه‌ی شاهد افزایش بیش‌تری داشت و بیان ژن‌های Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like، Putative calcium binding protein CML29 و GDSL_esterase/lipase_At2g40250-like نسبت به نمونه شاهد کاهش داشت (جدول-۳، شکل-۲). بیش‌ترین میزان بیان ژن pyrroline-5-carboxylate synthetase و کم‌ترین میزان بیان مربوط به ژن GDSL_esterase/lipase_At2g40250-like به‌ترتیب ٦/٨٨ و ٨/٩٧ برابر، بود. به عبارت دیگر ژن pyrroline-5-carboxylate synthetase در شرایط تنش با افزایش بیان موجب تحمل بیش‌تر گیاه نسبت به شوری می‌شود. این نتایج هم‌راستا با پژوهشی است که نشان می‌دهد افزایش بیان ژن های دخیل در فرآیند بیوسنتز پرولین سبب افزایش تحمل به خشکی و شوری در گیاهانی مانند تنباکوی تراریخته شد(Kishor *et al.*, 1995).

Pyrroline-5-carboxylate synthetase

تنش شوری یکی از عوامل محدود کننده رشد گیاه می‌باشد. تنظیم اسمزی (Osmotic adjustment) یکی از واکنش‌های معمول گیاه برای مقابله با تنش است. تنظیم اسمزی در گیاهان از طریق تجمع انواع مختلفی از محلول‌های آلی سازگار (Compatible solutes) در سیتوپلاسم انجام می‌شود.(Vahid Dastgerdi, 2020). پرولین نیز یکی از آمینواسیدهای فعال در پدیده تنظیم اسمزی است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش مهمی دارد. علاوه بر این پرولین در محافظت از ساختارهای سلولی در گیاهان در معرض تنش، پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین به عنوان مخزن انرژی جهت تنظیم پتانسیل ردوکس سلولی فعالیت می‌کند(Ehsanpour and Fatahian, 2003). تجمع پرولین در تنش‌های غیرزنده از جمله شوری و خشکی در برگ گیاه کنگرفرنگی بررسی شد و افزایش بیان ژن

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]

پرولین ۵-کربوکسیل سنتتاز(P5CS) در تحمل به تنش شوری گزارش شد(Sun *et al*., 2013). تجمع پرولین با تحمل به تنش خشکی و شوری در گیاهان رابطه هم‌افزایی دارد(Delauney and Verma, 1993). به‌عنوان جمع‌بندی نتایج نهایی حاصل از این پژوهش می‌توان اظهار داشت محتوی پرولین و بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز پرولین در شرایط تنش نسبت به شرایط کنترل تغییرات قابل توجهی را نشان دادند. تنش شوری سبب القاء بیان ژن P5CS و افزایش سطح پرولین شد. این نتایج می‌تواند بیانگر نقش مهم ژنpyrroline-5-carboxylate synthetase در تحمل به شوری و امکان استفاده کاربردی از آن به‌عنوان ژن هدف برای انتقال به گیاهان حساس به منظور افزایش تحمل در آن‌ها باشد.

Serine-threonine protein kinas و Putative calcium binding protein CML2

از جمله ژن‌هایی که نقش بسیار مهمی در کنترل هموستازی یون سدیم (به‌عنوان علامت احتمالی سمیت سدیم) دارند، ژن: plasma membrane Na^+/H^+ antiporter Salt Overly Sensitive1 (SOS_1) است (Gupta and Huang, 2014; Rao *et al*., 2016; EL Mahi *et al*., 2019). در این پژوهش ژن‌های کد کنندهSOS_1 بعنوان دریافت‌کننده یون سدیم عمل می‌کند (Zhu, 2003). SOS_1 مهم‌ترین نقش را در تحمل شوری گیاه دارد. این ژن کد کننده یک آنتی پورتر پروتون/ سدیم واقع در غشای پلاسمایی است و فعال‌سازی آن در خروج یون سدیم و در توزیع مجدد این یون در سراسر گیاه نقش دارد (Fatemi *et al*., 2015). کلسیم یکی دیگر از ماکرومولکول‌ها و عناصر غذائیست که در بسیاری از فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی نقش دارد، همچنین کلسیم (Calcium-Transporting ATPase) می‌تواند بعنوان یک پیامبر ثانویه از طریق تحریک درون سلولی، گیاهان را در پاسخ به تنش‌های متعدد غیرزنده حفظ نماید. تنش شوری باعث افزایش سطح کلسیم سیتوزولی می‌شود. دریافت‌کننده‌های کلسیم SOS_3 سبب افزایش کلسیم سیتوسولی شود که در ادامه با serine/threonine protein kinase SOS_2 وارد واکنش می‌شود و سبب فعال‌سازی آن می‌شود. در مطالعه حاضر ژن مربوط به سنتز serine/threonine protein kinase SOS_2 افزایش بیان داشته‌است(Guan *et al*., 2013). پروتئین‌کینازهای موجود در گیاهان، خانواده اصلی از ژن‌های پیام‌رسان هستند که در مسیرهای سوخت و ساز، استفاده از مواد مغذی و محرک‌های خارجی از جمله تنش‌های غیرزنده مانند شوری و خشکی حضوردارند (Rehman *et al*., 2019). مطالعات گذشته نقش سه مؤلفه کلیدی در مسیر MAPK در پاسخ به تنش شوری و اسمزی را نشان داده‌است: ۱) کلسیم/کالمودلین پروتئین فسفات در مسیر انتقال ۲) SOS_2 درگیر در فرآیند SOS و ۳) فعال شدن serine-threonine protein kinas (Chen *et al*., 2003)، پژوهش حاضر افزایش serine-threonine protein kinas در پاسخ به تنش شوری در گندم را به خوبی نشان می‌دهد. هم‌چنین بیان ژن Putative calcium binding protein CML29 تحت شرایط تنش شوری کاهش داشت.

GDSL_esterase/ lipase_At2g40250-like

گزانتوفیل‌ها دسته‌ای از کاروتنوئیدها و از عناصر ریزمغذی مهم برای انسان هستند و در اسیدهای چرب موجود در میوه‌ها، سبزیجات و برخی غلات، مانند گندم نان (*Triticum aestivum*) یافت می‌شوند. استریفیکاسیون باعث افزایش تجزیه و تجمع کاروتنوئیدها می‌شود و در نتیجه باعث پایداری بافت‌هایی از جمله دانه گندم برداشت شده می‌شود. زانتانوفیل اسیل ترانسفراز برای استریفیکاسیون زانتانوفیل در گندم نان لازم و ضروری است. زانتانوفیل اسیل ترانسفراز دارای موتیف Gly-Asp-Ser-Leu (GDSL) است که توسط خانواده‌ژنی GDSL esterase/lipase رمزگذاری می‌شود (Watkins *et al*., 2019). نشان داده شده‌است که اعضای خانواده GDSL نقش بسزایی در تنظیم رشد و نمو مانند موفولوژی اندام‌ها، سوخت و ساز ثانویه، ایمنی گیاه و تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاه دارند (Su *et al*., 2020). نتایج مطالعه حاضر کاهش بیان ژن GDSL_esterase/lipase_At2g40250-like در گندم تحت شرایط تنش شوری را نشان داد.

Aldehyde dehydrogenase family 3 member I1, chloroplastic-like:

آلدئید دهیدروژنازها (ALDHs) آنزیم هایی وابسته به $NAD(P)^+$ هستند که با اکسیداسیون مولکول‌ها به اسید کربوکسیلیک‌های متناظر، طیف وسیعی از مولکول‌های آلیفاتیک و معطر اندوژنوس (درون‌زا) و اگزوژنوس (برون‌زا) را متابولیزه می‌کنند. گیاهان

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]

تاریخته‌ای که بیان بالایی در مورد آنزیم آلدهیددهیدروژناز داشتند، نسبت به گیاهان غیرتراریخته تحمل بیشتری به تنش خشکی و شوری از خود نشان دادند (Sunkar *et al*., 2003; Kotchoni *et al*., 2006). همچنین در مطالعه‌ای بر روی گیاه تنباکو نشان داده شد که اعمال تنش شوری و خشکی باعث افزایش بیان ژن ALDH7B2 می‌شود (Gautam *et al*., 2020). افزایش بیان ALDH3I1 در گیاهان باعث ایجاد مقاومت به تنش شوری می شود. نتایج حاصل از این پژوهش، افزایش ۱/٤٦ برابری بیان این ژن بر اثر اعمال تنش شوری را نشان داد.

Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like:

متابولیسم میتوکندری گیاهان در جوانه‌زنی و استقرار اولیه گیاه نقش اساسی دارد و عملکرد آن در شرایط تنش شوری بشدت کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر تنش شوری بر اکسیداسیون پرولین در میتوکندری گندم انجام شد، میزان جذب پرولین در شرایط تنش شوری در میتوکندری از طریق حامل‌های خاص کاهش می‌یابد. کاهش میزان اکسیداسیون پرولین در شرایط تنش شوری بعنوان یک عامل عامل سازگاری گندم در برابر تنش‌هایی مانند شوری محسوب شود که می‌توان علت اصلی کاهش در اکسیداسیون پرولین را کاهش فعالیت پرولین دهیدروژناز نسبت داد (Soccio *et al*., 2010). در پژوهش حاضر بیان ژن Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like تحت شرایط تنش شوری کاهش داشت.

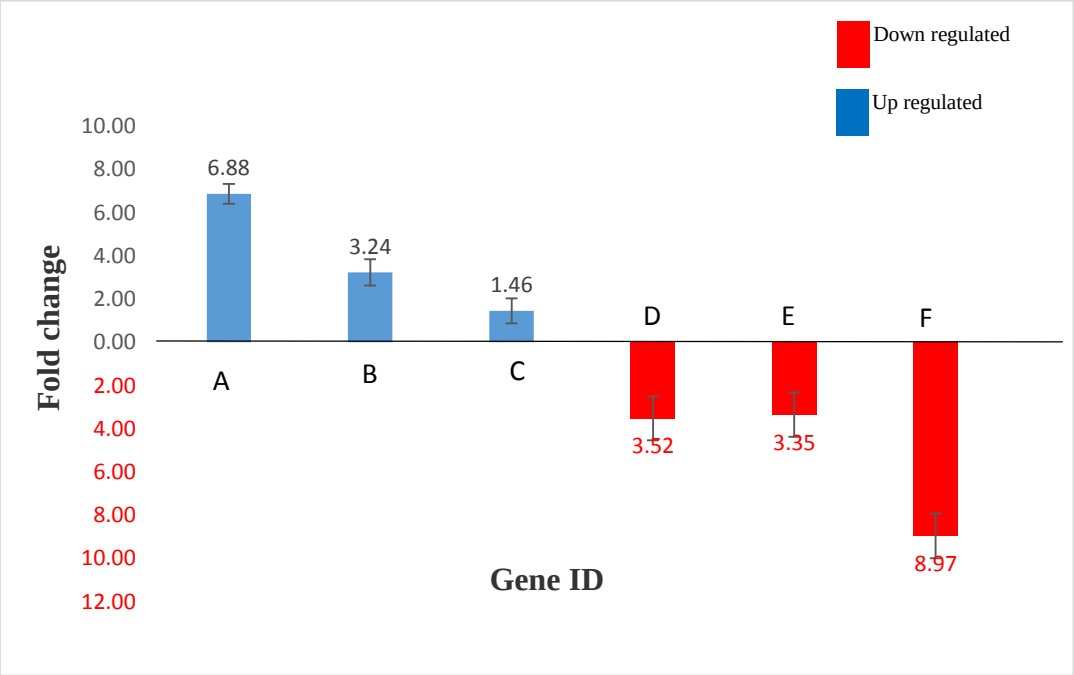
جدول۳- نتایج Real time PCR

Table 3. Real time PCR results.

Gene ID	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std.Error	95% C.I	P(H1)	Result	Log2 fold change in qrt-PCR
TraesCS3A02G363700	TRG	1.1293	117.47	81.902 - 186.228	55.470 - 226.651	0.063	UP	6.88
TraesCS2D02G493700	TRG	1.1183	9.439	6.535 - 13.727	6.079 - 14.910	0	UP	3.24
TraesCS5B02G210100	TRG	1.085	2.743	1.842 - 5.020	1.805 - 5.147	0	UP	1.46
TraesCS1D02G212400	TRG	1.1683	0.087	0.058 - 0.131	0.045 - 0.181	0	DOWN	3.52
TraesCS7B02G335200	TRG	1.115	0.098	0.064 - 0.144	0.049 - 0.147	0	DOWN	3.35
TraesCS7D02G094900	TRG	1.1167	0.002	0.000 - 0.004	0.000 - 0.007	0	DOWN	8.97

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]



شکل۲- مقایسه الگوی بیان ژن های انتخابی: A: pyrroline-5-carboxylate synthetase, B: serine-threonine protein kinase, C: Aldehyde dehydrogenase family 3 member I1, chloroplastic-like, D: Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like, E: Putative calcium binding protein CML29, F: GDSL_esterase/lipase_At2g40250-like.

Fig 2. Expression patterns of selected genes (A: pyrroline-5-carboxylate synthetase, B: serine-threonine protein kinase, C: Aldehyde dehydrogenase family 3 member I1, chloroplastic-like, D: Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like, E: Putative calcium binding protein CML29 F: GDSL_esterase/lipase_At2g40250-like).

منابع

Amirbakhtiar N, Ismaili A, Ghaffari MR, Nazarian Firouzabadi F, Shobbar ZS. (2019). Transcriptome response of roots to salt stress in a salinity-tolerant bread wheat cultivar. PLoS ONE 14(3): e0213305. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213305

Azimain J, Majidi Hervn E, Azadi A, Bakhtiarizadeh MR, Azizinezhad R. (2021). Transcriptome analysis of a *Triticum aestivum* landrace (Roshan) in response to salt stress conditions. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 19(3): 261-274. doi:10.1017/S1479262121000319

Chaichi M, Sanjarian F, Razavi K, Gonzalez-Hernandez JL. (2019). Analysis of transcriptional responses in root tissue of bread wheat landrace (*Triticum aestivum* L.) reveals drought avoidance mechanisms under water scarcity. PLoS ONE 14(3): e0212671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212671

Chen GP, Ma WS, Huang ZJ, Xu T, Xue YB, Shen YZ. 2003. Isolation and characterization of TaGSK1 involved in wheat salt tolerance. Plant Science 165(6): 1369-1375. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00365-0

Dehdari A, Rezai A, Maibody SAM. 2005. Salt tolerance of seedling and adult bread wheat plants based on ion contents and agronomic traits. Communications in soil science and plant analysis 36(15-16): 2239-2253. https://doi.org/10.1080/00103620500196622

Dehshiri A, Modares Sanavy SAM. 2017. Effects of Salinity on Yield Quantity and Quality of Three Rapeseed (*Brassicc napus*) Cultivars under Different Atmospheric Carbon Dioxide Concentrations. Journal of Crop Production 9(4):1-16. 10.22069/ejcp.2017.5651.1425

Delauney AJ, Verma DPS. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The plant journal 4(2): 215-223. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x

Ehsanpour A, Fatahian N. 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. Plant cell, tissue and organ culture 73(1): 53-56. https://doi.org/10.1023/A:1022619523726

EL Mahi H, Hormaeche JP, Luca AD, Villalta I, Espartero J, Arjona FG, Fernandez JL, Bundo M, Mendoza I, Mieulet D, Lalanne E, Lee SY, Yun DJ, Guiderdoni E, Aguilar M, Leidi E, Pardo JM, Quintero FJ. 2019. A critical role of sodium flux via the plasma membrane Na $^{+}$ /H $^{+}$ 7 exchanger SOS1 in the salt tolerance of rice. Plant Physiology 180(2): 1046–1065. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.19.00324

Fatemi F, Najafi zarrini H, Heydari P. 2015. Phylogenetic and Functional Study of SOS1 Gene to Different Plant Species. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 5 (17): 8-12. http://ncmbjpiau.ir/article-1-365-en.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]

Gautam R, Meena RK, Woch N, Kirti PB. 2020. Ectopic expression of BrALDH7B2 gene encoding an antiquitin from *Brassica rapa* confers tolerance to abiotic stresses and improves photosynthetic performance under salt stress in tobacco. Environmental and Experimental Botany 180(104223): 1-13. doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104223

Ghvami F, Malboobi MA, Ghannadha MR, Yazdi Samadi B, Mozaffarri J, Jafar Aghaei. 2004. An Evaluation of Salt Tolerance in Iranian Wheat Cultivars at Germination and Seedling Stages. Iranian Journal of Agricultural Sciences 35(2): 453-464.

Guan Q, Wu J, Yue X, Zhang Y, Zhu J. 2013. A nuclear calcium-sensing pathway is critical for gene regulation and salt stress tolerance in Arabidopsis. PLOS Genetics 9(8): e1003755. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003755

Gupta B, Huang B. 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. International Journal of Genomics 2014(701596): 1-18. DOI: http://10.1155/2014/701596

Haghighatnia H, AlhaniF. 2020. Evaluation of Irrigation Water Salinity Tolerance Indices in New Cultivars and Lines of Safflower. Iranian Journal of Soil and Water Research 51(7): 1811-1821. https://dx.doi.org/10.22059/ijswr.2020.299239.668552

Hoagland D, Arnon D. 1950. The water- culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station 347 (2nd): 32.

Khodabandeh N. (1990). Cereal cultivation. Tehran university press 1st edition: 508

Kishor PK, Hong Z, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS. 1995. Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant physiology 108(4): 1387-1394. https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1387

Koohafkan P, Stewart B. 2008. Water and cereals in drylands. The Food and Agriculture Organization of the United Nations and Earthscan, London-Sterling, VA, UK. 1st Edition: 1-120.

Kotchoni SO, Kuhns C, Ditzer A, Kirch HH, Bartels D. 2006. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in Arabidopsis thaliana confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. Plant Cell Environ 29(6):1033-48. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01458.x. PMID: 17080931.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. Methods (San Diego, Calif.) 25(4): 402-408. PMID:11846609. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Moghimi A, Yang C, Miller ME, Kianian SF, Marchetto PM. 2018. A novel approach to assess salt stress tolerance in wheat using hyperspectral imaging. Frontiers in plant science 9(1182): 1-17. doi:10.3389/fpls.2018.01182

Poustini K, Siosemardeh A. 2004. Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. Field Crops Research 85(2-3): 125-133. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00157-6

Rao AQ, Din S, Akhtar S, Sarwar MB, Ahmed M, Rashid B, Azmat Ullah Khan M, Qaisar U, Shahid AA, Ahmad Nasir I, Husnain T. 2016. Genomics of salinity tolerance in plants. In: Abdurakhmonov IY (ed.) Plant Genomics Chapter 11: 273-299. doi: 10.5772/63361.

Rehman SU, Wang J, Chang X, Zhang X, Mao X, Jing R. 2019. A wheat protein kinase gene TaSnRK2. 9-5A associated with yield contributing traits. Theoretical and applied genetics 132(4): 907-919. https://doi.org/10.1007/s00122-018-3247-7

Rengasamy, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. Journal of experimental botany 57(5): 1017-1023. https://doi.org/10.1093/jxb/erj108

Soccio, M., Laus, M. N., Spera, G., Trono, D., Pompa, M., Flagella, Z., Pastore, D. (2010). Mitochondrial proline oxidation is affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings. Annals of Applied Biology 157(1): 1-11. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00392.x

Su HG, Zhang XH, Wang TT, Wei WL, Wang YX, Chen J, Xu ZS. 2020. Genome-Wide Identification, Evolution, and Expression of GDSL-Type Esterase/Lipase Gene Family in Soybean. Frontiers in plant science 11(726): 1-19. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00726

Sun XL, Yu QY, Tang LL, Ji W, Bai X, Cai H, Zhu YM. 2013. GsSRK, a G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt stress. Journal of Plant Physiology 170(5): 505-515. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.11.017

Sunkar R, Bartels D, Kirch HH. 2003. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from Arabidopsis thaliana in transgenic plants improves stress tolerance. The Plant Journal 35(4): 452–464. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01819.x

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Research 35(2): W71–W74. doi:10.1093/nar/gkm306

Vahid Dastgerdi M. 2020. The effect of exogenous glycinebetaine on proline and salt tolerance of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plant under in vitro culture. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 32(4): 815-825.

Wang ZQ, Yuan YZ, Ou JQ, Lin QH, Zhang CF. 2007. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. Journal of Plant Physiology 164(6): 695-701. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.05.001

Watkins JL, Li M, McQuinn RP, Chan KX, McFarlane HE, Ermakova M, Pogson BJ. 2019. A GDSL esterase/lipase catalyzes the esterification of lutein in bread wheat. The Plant Cell 31(12): 3092-3112. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00272

Zhu JK. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. Current opinion in plant biology 6(5): 441-445. https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00085-2

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 1
2021

Evaluation of Pyrroline-5-carboxylate synthetase's Expression Pattern and Some Related Genes in Response to Salinity Stress in Bread Wheat

Jamshid Azimian[1], Amin Azadi[2,*], Eslam Majidi Hervan[1], Mohammad Reza Bakhtiarizadeh[3], Reza Azizinezhad[1]

1.Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2 Department of Plant Breeding, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3 Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: azadi.amin@gmail.com

Abstract

Salinity is one of the most determinative abiotic stresses in wheat cultivation. In order to overcome this concern, understanding how genes respond and act under stress conditions can provide useful information for plant breeding to withstand environmental stresses. The aim of this study was to identify genes with significant differences between two normal and stress conditions in bread wheat (*Triticum aestivum*). Gene expression patterns of pyrroline-5-carboxylate synthetase, serine-threonine protein kinase and Aldehyde dehydrogenase family 3 member I1, chloroplastic-like showed that: under salt stress, the genes expression levels have increased while the expression of Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like, Putative calcium binding protein CML29 and GDSL_esterase / lipase_At2g40250-like genes decreased compared to control. Proline content and expression of key genes involved in proline biosynthesis under stress conditions showed significant changes in comparison with control conditions. Salinity stress induced P5CS expression and increased proline levels, which could indicate the crucial role of pyrroline-5-carboxylate synthetase as valuable gene transfer from stress tolerant to sensitive plant to increase plant tolerance under salinity.

Key word: Bread wheat, Proline, Real-time PCR analysis, Salinity stress

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.3.3]