

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

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 Azimian¹, Amin Azadi^{2*}, Eslam Majidi Hervan³, Mohammad Reza Bakhtiarizadeh⁴, Reza Azizinezhad³

۱- گروه به نژادی و بیوتکنولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه اصلاح نباتات، واحد یادگار امام 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 Aburairhan, 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 می باشد. به منظور فائق آمدن بر این مشکل، شناخت نحوه پاسخ و عمل ژن ها در تنش می تواند اطلاعات مفیدی برای اصلاح گیاهان در جهت تحمل تنش های محیطی فراهم آورد. پژوهش حاضر با هدف شناسایی ژن هایی با الگوی بیان متفاوت بین دو حالت (نرمال و تحت تنش شوری) در گندم نان (*Triticum aestivum*) انجام شد. بررسی الگوی بیانی ژن های *pyrroline-5-carboxylate synthetase*، *serine-threonine protein kinase* و ژن *Aldehyde dehydrogenase family 3 member 2, chloroplast-like* نشان داد پس از اعمال تنش میزان بیان نسبی این ژن ها نسبت به نمونه ی شاهد افزایش بیش تری داشت و بیان ژن های *Proline dehydrogenase 2*، *GDSL* و *Putative calcium binding protein CML29.mitochondrial like* و *esterase/lipase At2g40250-like* نسبت به نمونه شاهد کاهش داشت. محتوی پرولین و بیان ژن های 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 می تواند بیانگر نقش مهم ژن *pyrroline-5-carboxylate synthetase* جهت انتقال به گیاهان حساس به منظور افزایش تحمل به شوری در آن ها باشد.

واژه های کلیدی

پرولین،

qPCR،

تنش شوری،

گندم نان

مقدمه

کشورهای آسیایی با ۱۹۵/۱ میلیون هکتار زمین‌های متأثر از شوری، در معرض بیشترین آسیب ناشی از این پدیده هستند (Koochafkan and Stewart, 2008). در ایران حدود سی و شش درصد (۶/۸ میلیون هکتار) از زمین‌های کشاورزی شامل خاک‌های دارای درجات مختلفی از شوری هستند (Dehshiri and Modares, 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 ژن‌های 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.

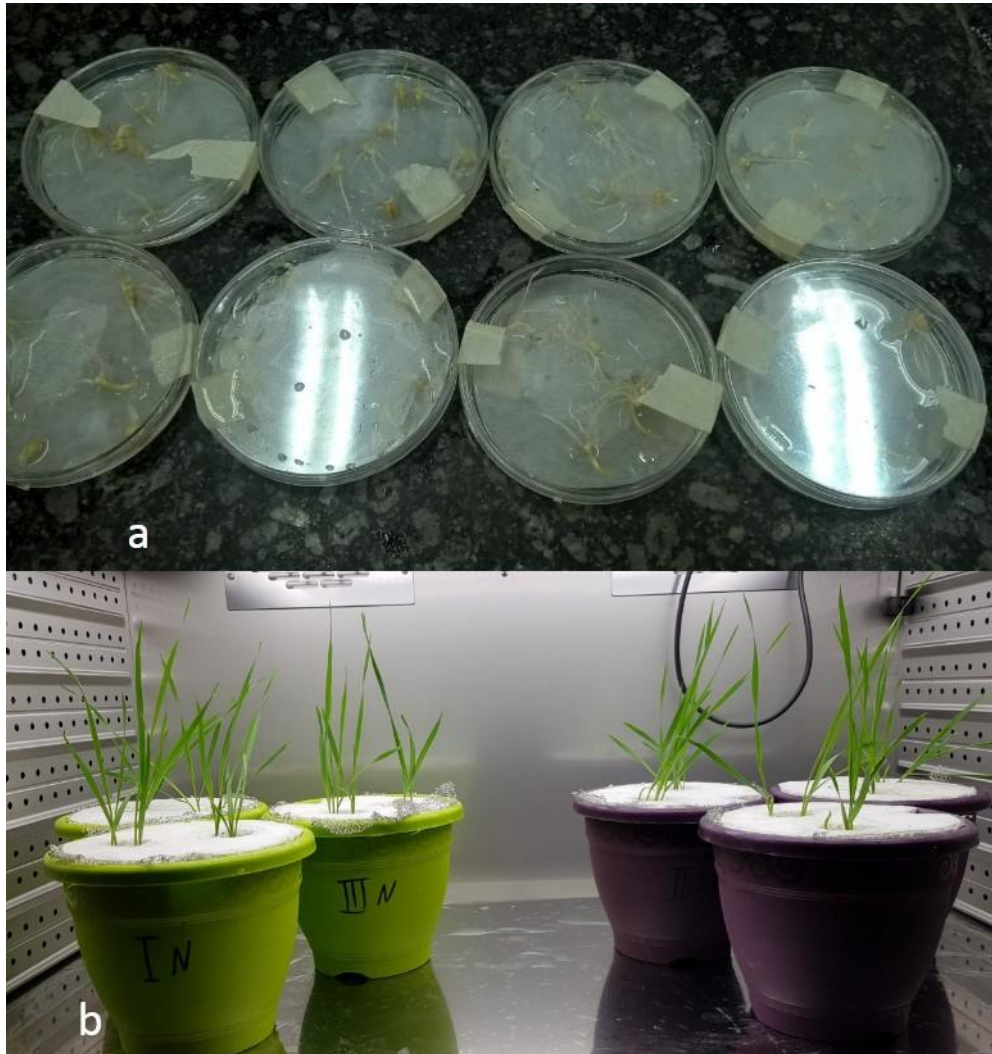
تیمار گیاهان: ابتدا بذور ضد عفونی شده برای مدت ۳ روز درون پتری دیش حاوی کاغذ صافی جوانه‌زنی کرده، سپس پنج گیاهچه یکنواخت به هر یک از شش گلدان پلاستیکی با قطر ۲۰ و عمق ۲۵ سانتی متر حاوی محلول هیدروپونیک که مطابق دستورالعمل هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) تهیه شده بود، انتقال داده شد. سپس گلدان‌ها در داخل فیتوترون (BINDER: KBWF (E 5.2) 720 با شرایط ۱۶-۸ ساعت نور و تاریکی و دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد در روز و شب و رطوبت ۶۰ تا ۷۰ درصد به مدت حدود سه هفته (با ظهور برگ چهارم) قرار داده شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی و با سه تکرار انجام شد. بعد از ظهور برگ چهارم گیاهچه‌های شرایط تنش به مدت ۴۸ ساعت در

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 اوایلوف 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 ۶/۸ 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 یک سو، تنش اسمزی تحت شرایط شوری باعث آبیگری 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 شده است (Ghvami *et al.*, 2004).

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های 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 در سراسر جهان تحت تأثیر شوری قرار دارند که در این میان

مایع به فریزر ۸۰- منتقل شد. این بخش از پژوهش در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام شهرری در پاییز سال ۱۳۹۶ انجام شد.

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



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.

فرمالدهید و نانودراپ (Nano Drop 2000 spectrophotometer) کنترل شد. سنتز cDNA، توسط کیت شرکت سیناکلون oligo (DT) با استفاده از (SINACLON, CAT. NO: RTS202) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. شرایط واکنش ریل تایم و همچنین دمای اتصال پرایمرها در جدول‌های ذیل

بررسی بیان ژن‌ها به روش **Real Time PCR**: استخراج RNA کل و سپس حذف DNA از هر تکرار بصورت جداگانه و با استفاده از کیت QIAGEN RNeasy plant mini kit و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. همچنین کیفیت و RNA استخراج شده به ترتیب بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی

تجزیه و تحلیل داده‌های ترانسکریپتوم موجود در مطالعه شوری گندم با شماره ثبت PRJNA589280 و بر اساس مطالعه‌های موجود در NCBI انتخاب شد (جدول ۱).

آورده شده است (جدول ۲). 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

جدول ۱- ژن های انتخابی براساس مطالعه ها و منابع موجود

Table 1. 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 (<i>Triticum aestivum</i>) seedlings exposed to different salinity | pyrroline-5-carboxylate synthetase | (Wang <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 2013) |
| Transcriptome analysis of a <i>Triticum Roshan</i> in response to <i>aestivum</i> landrace salt stress conditions | Aldehyde dehydrogenase family 3 member I1, chloroplastic-like | (Azimian <i>et al.</i> ; 2021) |
| Mitochondrial proline oxidation is affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings | Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like | (Sun <i>et al.</i> , 2013) |
| Transcriptome analysis of a <i>Triticum Roshan</i> in response to <i>aestivum</i> landrace salt stress conditions | Putative calcium binding protein CML29 | (Azimian <i>et al.</i> ; 2021) |
| Transcriptome analysis of a <i>Triticum Roshan</i> in response to <i>aestivum</i> landrace salt stress conditions | GDSL_esterase/lipase_At2g40250-like | (Azimian <i>et al.</i> ; 2021) |

میکرولیتر آغازگر پسر (۰/۳ میکرومولار) و ۱ میکرولیتر cDNA انجام شد. چرخه دمایی و برنامه زنجیره ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه (پنج دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد)، سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی (ده ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد)، اتصال آغازگر (۴۵ ثانیه در دمای اتصال تعیین شده در جدول ۲) و بسط آغازگر (۱۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد)، در پایان یک چرخه حرارتی از دمای ۶۰ الی ۹۵ درجه با توقف پنج ثانیه ای 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) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) استفاده شد.

طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های انتخابی از طریق نرم افزار آنالین Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) و سفارش سنتز الیگونوکلوئوتیدها با مشخصات: OD=2 (0.025 -- Purification: BioRP (umol) از طریق "شرکت تکاپو زیست" انجام شد. ریل تایم در دو تکرار انجام شد و برای نرمالیزاسیون و کنترل میزان بیان ژن‌ها از ژن اکتین-۲ با بیان ثابت به عنوان 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، دو میکرولیتر آغازگر پیشرو (۰/۳ میکرومولار)، ۲

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'-ACGTGTGGATGTGTTCCCTGT-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'- TCCACAACCTCTCTGACGTG-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

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

این پژوهش به منظور بررسی الگوی بیانی ژن‌های pyrroline-5-carboxylate synthetase, serine-threonine protein kinase, 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 ژن GDSL_esterase/lipase_At2g40250-like به ترتیب ۶/۸۸ و ۸/۹۷ 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 ژن‌های

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 حضور دارند (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) SOS₂ 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

گزارتوفیل‌ها 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 خانواده ژنی 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) آنزیم‌هایی 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

پرولین-5-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 ژن pyrroline-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.

Putative calcium و Serine-threonine protein kinas 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 (SOS₁) است (Gupta and Huang, 2014; Rao *et al.*, 2019; EL Mahi *et al.*, 2019). در این پژوهش ژن‌های کد کننده SOS₁ بعنوان دریافت‌کننده یون سدیم عمل می‌کند (Zhu, 2003). SOS₁ 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 غذائیت 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 SOS₃ سبب افزایش کلسیم سیتوسولی شود که در ادامه با SOS₂ serine/threonine protein kinase وارد واکنش می‌شود و سبب فعال‌سازی آن می‌شود. در مطالعه حاضر ژن مربوط به سنتز SOS₂ serine/threonine protein kinase افزایش بیان داشته- است (Guan *et al.*, 2013). پروتئین‌کینازهای موجود در گیاهان،

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.

تراریخته‌ای 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 می‌شود. نتایج حاصل از این پژوهش، افزایش ۱/۴۶ برابری بیان این ژن بر اثر اعمال تنش شوری را نشان داد.

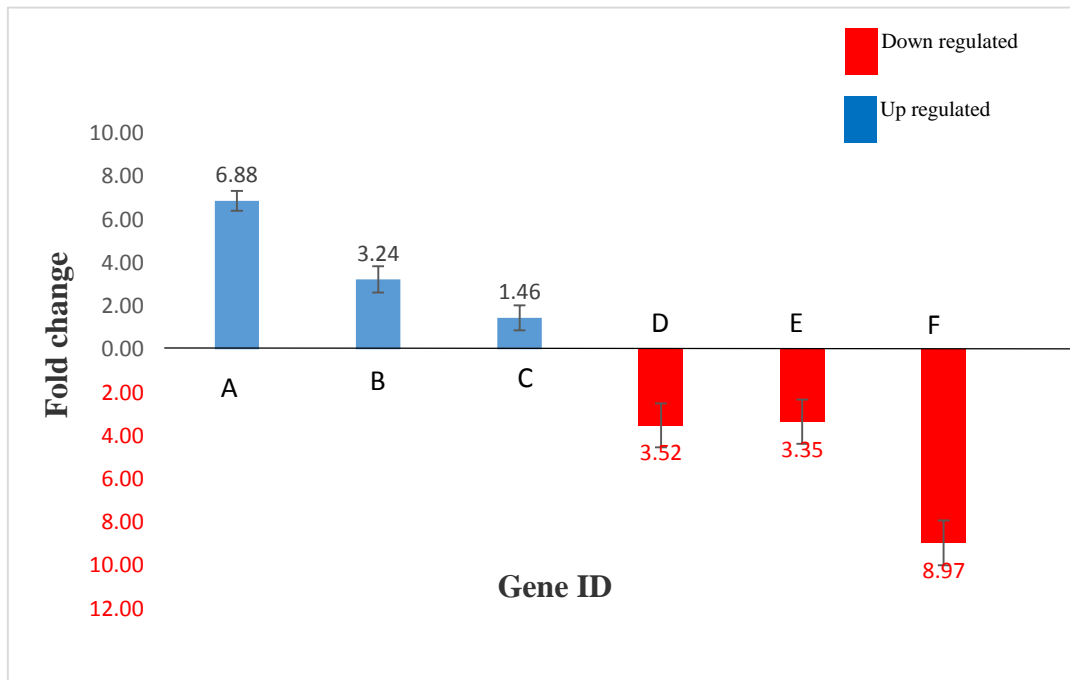
Proline dehydrogenase 2, mitochondrial like

متابولیسم میتوکندری گیاهان در جوانه‌زنی و استقرار اولیه گیاه نقش اساسی دارد و عملکرد آن در شرایط تنش شوری بشدت

جدول ۳- 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 |



شکل ۲- 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](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 (*Brassic 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://ncmbjpiu.ir/article-1-365-en.html>

- Gautam R, Meena RK, Woch N, Kirti PB. 2020.** Ectopic expression of BrALDH7B2 gene encoding an antiqutin 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, Alhani F. 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 [δ]-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- $\Delta\Delta$ CT 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

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 Azimian¹, Amin Azadi^{2,*}, Eslam Majidi Hervan¹, Mohammad Reza Bakhtiarizadeh³, Reza Azizinezhad¹

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 II, 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