مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره چهارم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۶۶-۵۵

بررسی تاثیر سیانید هیدروژن در القای مقاومت به شوری در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis*

Study of Hydrogen Cyanide Effects on Salt Stress Induction in *Aeluropus littoralis*

میلاد احمدی نجف آبادی[۱*]، حسین عسکری[۱]، مسعود سلطانی نجف آبادی[۲]

Ahmadi N. Milad [1]*, Askari H[1].,Soltani N. Masood[2]

۱-گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

1. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
2. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: milad.ah2005@gmail.com
(تاریخ دریافت:۹۳/۴/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۰)

چکیده

تنش شوری به عنوان یک خطر جدی برای رشد و نمو گیاهان محسوب می شود. *Aeluropus littoralis* که یک هالوفیت تک لپه محسوب می‌شود، به عنوان یک مدل ژنتیکی جهت تجزیه و تحلیل رفتار فیزیولوژیک و مولکولی تحمل به شوری به کار می رود. تنش شوری، تولید اتیلن را در بافتهای گیاهی افزایش خواهد داد و در نتیجه این افزایش غلظت، سیانید هیدروژن نیز افزایش خواهد یافت. همچنین مکانیسم پالایش سیانید از طریق سه آنزیم *Cyanase*، *Rhodanese* و *β-cyanoalanine synthase* اجرا می شود. مطالعه حاضر به منظور درک پاسخ رشد و نمو سلولهای گیاهی در شرایط تنش و همچنین بررسی الگوی بیان افتراقی ژن های در گیر در بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن در سوسپانسیون سلولی گیاه فوق، در پاسخ به غلظت های مختلف شوری و سیانید پتاسیم انجام گرفت. در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل با غلظت های ۰.۰، ۰.۰/۲، ۰.۰/۴، ۰.۰/۶، ۰.۰/۲، ۰.۰/۴، ۰.۰/۶، ۱۲۰.۰/۲ و ۱۲۰.۰/۴ میلی مولار NaCl, KCN استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز وزن خشک سلولی و نیز آنالیز qRT-PCR ژن های درگیر در بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن نشان داد که اعمال تیمار سیانید پتاسیم در غلظت خاصی از شوری، احتمالا می تواند امکان مدیریت رشد گیاه را در شرایط شوری فراهم کند.

واژه‌های کلیدی

Aeluropus littoralis

تنش شوری

اتیلن

سیانید هیدروژن

qRT-PCR

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]

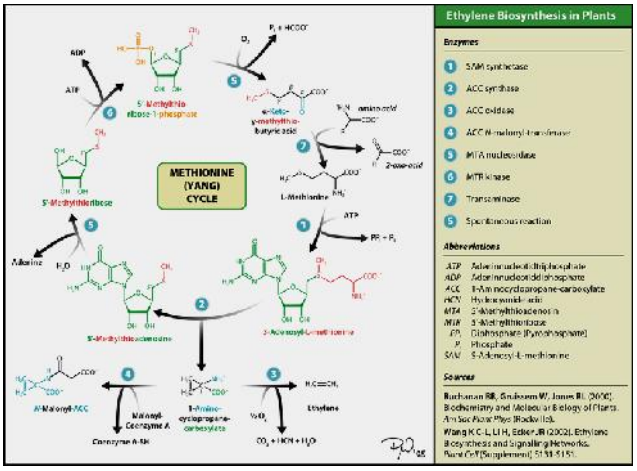
مقدمه

تنش های محیطی زنده و غیر زنده به طور مؤثری تولیدات زراعی را با بحران مواجه می کند (Breusegem *et al.* 2001). شوری خاک، پیش از به وجود آمدن انسان وجود داشته و شاید یکی از دلایل از بین رفتن تمدن سومریان باستان باشد (Jacobson and Adams, 1958). امروزه نیز شوری خاک به عنوان یکی از مهمترین عوامل نامساعد و تنش زای غیر زنده، مطرح است و بر تولید و کیفیت محصولات کشاورزی تاثیر نامطلوب دارد (Boyer, 1982). گزارشات اخیر حاکی است که در حدود ۲۰٪ از اراضی کشاورزی جهان به عنوان خاک شور نامیده می شوند (Flowers and Yeo, 1995) . تنش شوری در خاک یا آب به عنوان یک تنش جدی، اثرات خاصی روی رشد و عملکرد گیاه در مناطق خشک و نیمه خشک اعمال می کند و با افزایش شدت آن پتانسیل عملکرد تا ۲۵ سال آینده بیش از ۳۰٪ و در سال ۲۰۵۰ تا ۵۰٪ کاهش خواهد یافت. در برنامه‌های اصلاحی به منظور انتخاب صفات مطلوب در زمینه‌های مختلف ژنتیک نیاز به درک مکانیسم‌های فیزیولوژیک و ژنتیک است. عوامل محیطی موجود در شرایط مزرعه‌ای، پاسخ به شوری را درگیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهند و از انتخاب مستقیم ژنوتیپ های متحمل به شوری ممانعت می‌کند. در نتیجه اجرای تحقیقات مولکولی اجتناب ناپذیر است. درک مکانیزم های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک تحمل به شوری با استفاده از یک سیستم مدل هالوفیتی می تواند اطلاعات مفیدی در اختیار بگذارد. گیاه آلوروپوس به عنوان یک گیاه تک لپه هالوفیت با دارا بودن بیش از ۹۵ درصد هومولوژی ژنومی با برنج، به منظور انتقال مقاومت به برنج مورد توجه است. متأسفانه هنوز در بهره برداری از پتانسیل مطلوب این گیاه در تحمل به شوری اقدامی صورت نگرفته است، چرا که گیاه مورد نظر در حوزه کشاورزی چندان شناخته شده نیست. مطالعات در زمینه تولید اتیلن و نقش آن در گیاه در پاسخ به شرایط تنش از دیر باز مورد توجه دانشمندان و محققان بوده است. به طوری که به آن، هورمون تنش اطلاق می شود (Abeles *et al.* 1992; Hall and Smith ,1995). در گیاهان سیانید هیدروژن به عنوان یک ماده همراه در مسیر بیوسنتز اتیلن تولید می شود. در این واکنش آنزیم ACC Oxidase ترکیب 1-Aminocyclopropane-1-carboxylicacid را به اتیلن و HCN تبدیل می کند (شکل۱). بر خلاف اتیلن که تقریبا اکثر مطالعات انجام گرفته بر روی تنش، به نقش این هورمون در مقابله با استرس پرداخته است، نقش سیانید هیدروژن به عنوان یک محصول جانبی در مسیر تولید اتیلن در گیاه، در تنظیمات درون سلولی در واکنش به تنش های محیطی، بندرت مورد توجه قرار گرفته است. این در حالی است که سیانید هیدروژن همگام با اتیلن به میزان برابر و در پاسخ به تنشهای زنده و غیر زنده در گیاه تولید می شود (شکل۱). سیانید هیدروژن در گیاه علاوه بر القای مسیرهای تنفسی مقاوم به سیانید و پنتوز فسفات در گیاه (Bogatek and Lewak,1991; Bogatek *et al.* 1999)، پیش ساز آمینواسید آسپاراژین و محرک تولید اتیلن در گیاه، در غلظت های غیر سمی می باشد (Oracz *et al.* 2008). همچنین سیانید در یک اثر پس خوری، باعث افزایش فعالیت ژن کد کننده ACC Synthase– ژن کلیدی مسیر بیوسنتز اتیلن– شده و در نتیجه باعث افزایش تولید اتایلن در گیاه آرابیدوپسیس می شود (Pirrung and Brauman,1987; Smith and Arteca, 2000) . بنابراین تولید این عنصر به ظاهر سمی و خطرناک، در پاسخ به استرس بی مورد نبوده و به عنوان یک عامل دفاعی در برابر تنش در گیاه نقش ایفا می کند. همچنین بررسی تغییرات بیان ژن های عامل بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن در واکنش به اثرات متقابل استرس شوری و سیانید در گیاه، به عنوان یک خلاء بزرگ در مطالعات پیشین روی سیانید هیدروژن مشاهده می شود. در این مطالعه به بررسی الگوی رشد سلولی گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* در واکنش به تنش های شوری،

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]

سیانید پتاسیم و اثرات متقابل این دو تنش پرداخته و به نقش سیانید هیدروژن به عنوان پاسخ گیاه در واکنش به تنش شوری پرداخته می شود، همچنین به بررسی تغییرات بیان ژن های کد کننده *AdoMet Synthase* و *ACC Oxidase*، آنزیم های کلیدی درگیر در تولید سیانید هیدروژن و نیز ژن های کد کننده *Cyanase*، *β-cyanoalanine Synthase* و *Rhodanese*، آنزیم های درگیر در پالایش و سم زدایی سیانید هیدروژن در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* با استفاده از qRT-PCR می پردازیم.



شکل۱- چرخه یانگ و آنزیم های درگیر در این مسیر: اتیلن و سیانید هیدروژن به عنوان فراورده های جانبی این چرخه توسط آنزیم *ACC Synthase* سنتز می شوند.

Figure 1. Yang cycle and Ethylene Biosynthesis pathway in plants

مواد و روش‌ها

تهیه ماده گیاهی

در این آزمایش از سوسپانسیون سلولی گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* به عنوان ماده گیاهی استفاده شد. به این منظور بذور *A. littoralis* از بانک ژن کرج تهیه گردید. بذور پس از استریل با هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد ، جهت کالوس زایی مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و۲ میلی گرم بر لیتر BAP به عنوان ترکیب هورمونی جهت کالوس زایی در محیط کشت جامد مورد استفاده قرار گرفت. سپس کالوسهای ترد و شکننده به محیط کشت مایع انتقال داده شد و پس از چند بار واکشت و بدست آوردن سوسپانسیون حاوی سلولهای منفرد و جدا از هم، تیماردهی در تکرارهای معین انجام گرفت. غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر kinetin به عنوان ترکیب بهینه هورمونی در سوسپانسیون سلولی مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون سلولی در شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه نگهداری شدند.

تیمار NaCl و سیانید

تیمار شوری با غلظت های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ میلی مولار در ارلن های ۱۰۰ml حاوی سلول های یکنواخت با ۳ تکرار اعمال شد و با اندازه گیری وزن خشک سلولی، منحنی رشد سلولی در شرایط شوری بدست آمد. بدین صورت که مدت زمانی که سلول ها در معرض تیمار شوری قرار گرفتند ۲۰ روز بود و به منظور ارزیابی تاثیر تیمارهای مختلف شوری بر رشد سلول ها هر ۲ روز یکبار از هر یک از ارلن ها به میزان ۱/۵ میلی لیتر نمونه برداری شد و با اندازه گیری وزن خشک سلول ها، منحنی رشد سلولی برای هر تیمار رسم شد و در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از این منحنی رشد، غلظت های محرک رشد و مهار کننده ی رشد سلولی در مقایسه با نمونه ی شاهد بدست آمد. همچنین تیمار سیانید پتاسیم در غلظت های ۰،

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]

۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸و ۱/۶ میلی مولار در ارلن های حاوی سلول های یکنواخت با ۳ تکرار اعمال شد و با اندازه گیری وزن خشک سلولی به شیوه ای که در رابطه با شوری بیان شد، منحنی رشد سلولی در این حالت نیز بدست آمد و غلظت های محرک رشد و مهار کننده ی رشد سلولی در مقایسه با نمونه ی شاهد بدست آمد.

با بررسی منحنی های بدست آمده از رشد سلول های تحت تیمار شوری و سیانید پتاسیم، غلظت های مناسب ۰، ۶۰ و - ۱۲۰ میلی مولار شوری و ۰، ۰/۲و ۰/۴ میلی مولار سیانید پتاسیم انتخاب و تیمار ترکیبی در ۹ غلظت مختلف ۰.۰، ۰.۰/۲، ۰.۰/۴، ۶۰.۰، ۶۰.۰/۲، ۶۰.۰/۴، ۱۲۰.۰، ۱۲۰.۰/۲ و ۱۲۰.۰/۴ میلی مولار NaCl,KCN اعمال شد. پس از ۱۰ روز از اعمال تیمار، برداشت نمونه ها صورت گرفت و ماده گیاهی لازم جهت انجام آزمایشات ملکولی فراهم آمد. همچنین وزن تر توده سلولی برداشت شده (پس از ۱۰ روز) اندازه گیری و ثبت گردید.

طراحی آغازگر برای واکنش qRT-PCR

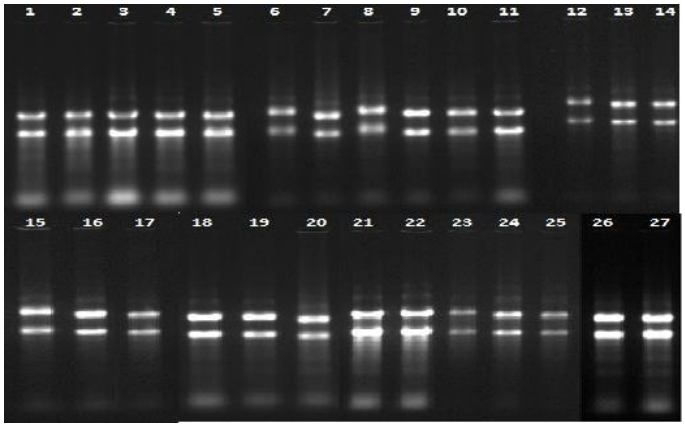
بدلیل عدم وجود توالی ژن های مورد مطالعه در گیاه *Aeluropus littoralis* در بانک ژن، ابتدا آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی جهت انجام واکنش PCR، بر اساس نواحی حفاظت شده‌ی توالی ژنهای مورد نظر در سایر گیاهان مشابه با استفاده از ClustalW و NCBI BLAST طراحی شد. سپس قطعات ژنی حاصل از واکنش PCR با استفاده از وکتور TA به باکتری *E.Coli* $DH_5\alpha$ منتقل و همسانه سازی قطعات ژنی صورت گرفت. پلاسمیدهای نوترکیب جهت توالی یابی فرستاده شدند. پس از توالی یابی قطعات ژنی مورد نظر، آغازگرهای مناسب جهت واکنش qRT-PCR با استفاده از نرم افزار Primer Express V3.0 و Primer3، طراحی شد (جدول۱). صحت آغازگرهای طراحی شده با استفاده از Primer Blast و نرم افزار آنلاین IDT (Integrated DNA Technologies) تایید شد.

استخراج RNA و تیمار DNaseI

نمونه های برداشت شده با استفاده از هاون چینی دو بار اتوکلاو و ازت مایع به خوبی پودر گردید و در دمای ۸۰- نگهداری شد. سپس استخراج RNA طبق پروتوکل RNX-Plus انجام گرفت (شکل۲). نمونه های RNA پس از استخراج، توسط NanoDrop غلظت سنجی شد و مقدار 2µg از آن جهت تیمار با DNaseI شرکت Cinnagen، مورد استفاده قرار گرفت. در انتها صحت اثرDNase روی RNA استخراجی، با استفاده از PCR و با بکارگیری آغازگرهای α.tubulin بررسی شد. وجود باند در نمونهRNA تیمار نشده با DNase بیانگر آلودگی ژنومی می باشد.

واکنش RT-PCR

تهیهٔ cDNA با استفاده از کیت-M $RevertAid^{TM}$ MuLVشرکت Vivantis صورت گرفت. مقدار غلظت RNA مورد استفاده 2µg بود.



شکل۲- RNA استخراج شده از ۲۷ نمونه با استفاده از کیت RNX-Plus روی ژل آگارز **۱ درصد**

Figure 2. The Extracted RNAs on Agarose Gel (27 plant samples by RNX-Plus extraction kit)

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]

جدول۱- اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن جهت واکنش Real Time PCR

Table 1. Used primers in real time PCR

Gene name	Primer sequence F/R [5'-3']	Primer Tm[°C]	% GC	Amplicon length [bp]
AdoMetS.	ACATGGTCATGGTCCTTGGTG	59.1	52	75 bp
	GGCAGGTCTCCCTGACAATCT	59.1	57	
ACO	GAGCTGATGGACGAGGTGGA	59.8	60	153 bp
	GTGGCGGACGAAGAAGGTG	60.2	63	
CAS	TGGGAACATGGGCATAGGAT	58.7	50	70 bp
	CGGCATCGTAAGAATGAGTTCA	58.8	45	
RHO	TTAGATGGAGGTTTGCCCCAGT	60.6	50	150 bp
	TGCTTCAAATGTGACAGGACCA	60.1	45	
CYN	GGAATCATGTCGGCCATTG	58.3	53	72 bp
	CACACGATCTTTTCCATCGG	57.6	50	
α-Tub	TGGAGTTGGAGATCATGCTCA	58	48	64 bp
	ACAGTTGTGCCAGGTGGTGAC	60	57	
Actin1	GGATCTTTACGGCAATGTC	51.7	47	123 bp
	GGCGCAACTACCTTCACCT	54.2	53	
Actin2	TTGCTGGCCGAGACCTTAC	57.5	58	113 bp
	GGCGAGCTTTTCCTTGATG	57.1	53	

واکنش Real Time PCR

جهت مقایسه میزان تظاهر ژن های درگیر در مسیر بیوسنتز و متابولیسم سیانید هیدروژن، آزمون Real Time PCR برای ۲۷ نمونه (۹ نمونه تیمار شده و از هر کدام ۳ تکرار) انجام گرفت. در این آزمون، کمیت سنجی بیان ژن به صورت نسبی انجام گرفت. آزمون Real Time PCR با استفاده از معرف سایبر گرین (SYBR GREEN) شرکت Bioneer انجام گرفت. دستگاه مورد استفاده، دستگاه ترمال سایکلر مدل ABI StepOne ساخت شرکت Applied Biosystems بود و واکنش Real Time PCR در میکروپلیت ۴۸ چاهکی و در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر انجام شد. مواد استفاده شده در واکنش، طبق جدول۲ می باشد. چرخه های دمایی نیز، به شرح زیر انتخاب شدند: واسرشت سازی اولیه در ۹۵°c به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ چرخه دمایی شامل واسرشت سازی در ۹۵°c به مدت ۱۵ ثانیه، و اتصال پرایمر و تکثیر در دمای ۶۰°c به مدت ۴۵ ثانیه انجام گرفت.

جدول۲- مواد لازم جهت انجام Real time PCR.

Table 2. Composition of Real time PCR reactions

Materials مواد	Quantities مقدار
SYBR GREEN Master Mix(2X)	6 µl
ROX Reference Dye(50x)	0.24 µl
cDNA Tamplate(100 ng/ µl)	1 µl
Primers (5 µM each) F/R	0.6 + 0.6 µl
Distillated Water	3.56 µl
Total volume	12 µl

بعد از ۴۵ سیکل به منظور آزمون اختصاصی بودن تکثیر، از منحنی دمای ذوب استفاده شد که برنامه آن به شرح زیر می باشد: ابتدا ۹۵°c به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰°c به مدت ۱ دقیقه و افزایش دما با سرعت ۰/۳ °c در دقیقه از دمای ۶۰°c تا دمای ۹۵ °c و توقف در دمای ۹۵°c به مدت ۱۵ ثانیه صورت گرفت.مطابق مقالات منتشر شده توسط Oracz 2008 و Caldana 2007 ژن های خانه دار α.tubulin ، actin1 و

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]

actin2 به عنوان کنترل درونی انتخاب و با استفاده از واکنش q-RT-PCR در ۲۷ نمونه (۹ تیمار به همراه ۳ تکرار) مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس بر اساس مقایسه تغییرات بیان هر یک از این ژن ها با مقایسه میزان Ct و نیز ارزیابی پایداری بیان هر کدام از آنها، بهترین ژن خانه دار به عنوان کنترل درونی، α.tubulin شناخته شد. سپس آزمون qRT-PCR برای کلیه ژن های مورد مطالعه و نیز ژن α.tubulin، برای هر نمونه انجام گرفت. جهت اطمینان از عدم آلودگی ترکیبات به کار رفته در واکنش، از کنترل منفی استفاده شد.

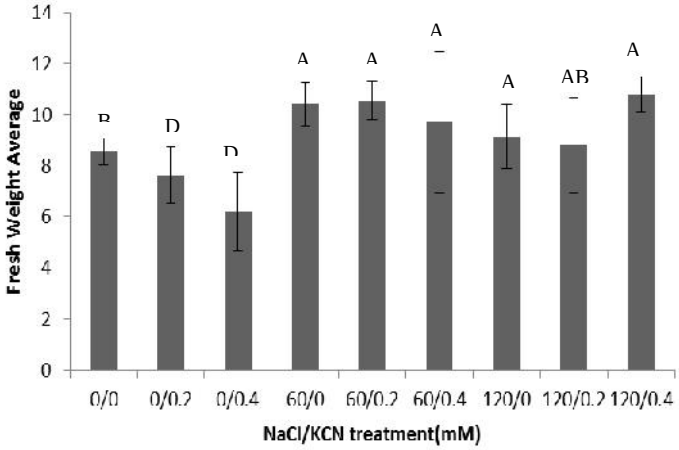
آنالیز واکنش qRT-PCR

کمیت سنجی بیان ژن در آزمون Real Time PCR به صورت نسبی انجام گرفت. در این ارزیابی میزان بازده PCR دارای اهمیت می باشد. پس از اندازه گیری میزان Ct، برای ۶ ژن مورد مطالعه(۵ ژن درگیر در مسیر بیوسنتز و متابولیسم سیانید هیدروژن و نیز یک ژن کنترل درونی) در ۲۷ نمونه تیمار شده در غلظت های مختلف NaCl و سیانید، کارایی پی سی آر با استفاده از نرم افزار LinRegPCR تعیین و پس از محاسبات آماری با استفاده از برنامه Excell، میزان بیانهر ژن طبق فرمول Pfaffl محاسبه گردید (Pfaffl 2001).

نتایج و بحث

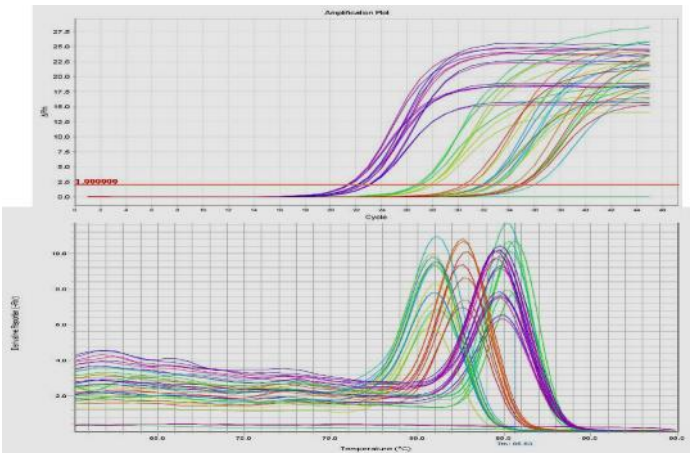
تیمار همزمان NaCl و سیانید

با آنالیز و بررسی منحنی های بدست آمده از رشد سلول های تحت تیمار شوری و سیانید پتاسیم، غلظت های مناسب ۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار شوری و ۰، ۰/۲و ۰/۴ میلی مولار سیانید پتاسیم انتخاب و تیمار همزمان اعمال گشت. نتایج حاصل از اندازه گیری وزن تر سلول ها در مرحله‌ی برداشت در نمودار شماره ۱ آمده است.



نمودار۱- میانگین وزن تر سلول ها در پاسخ به غلظت های مختلف شوری و سیانید پتاسیم.

Graph 1. The wet weight means of cells in response to different concentrations of NaCl and KCN



شکل۳- رسم منحنی تکثیر PCR (بالا) و منحنی ذوب (پایین) ژنهای مورد مطالعه در چند تیمار متفاوت، با استفاده از Real Time PCR.

Figure 3. The obtained graphs of qPCR

واکنش Quantitative RT-PCR

جهت مقایسه میزان تظاهر شبکه ژنی درگیر در مسیر بیوسنتز و متابولیسم سیانید هیدروژن، آزمون Real Time PCR برای ۲۷ نمونه انجام گرفت. نتایج به دست آمده از آنالیز منحنی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]

ذوب در این مطالعه نشان داد که تکثیر تمام ژنها به صورت اختصاصی و فاقد محصولات غیر اختصاصی نظیر پرایمر دایمر است. شکل۳ منحنی ذوب ژن های مورد مطالعه را در تعدادی از تیمارها نشان می دهد.

میانگین بیان و انحراف معیار برخی ژن های درگیر در متابولیسم و پالایش سیانید هیدروژن در گیاه *Aeluropus littoralis* در غلظت های مختلف سیانید پتاسیم و شوری و اثرات متقابل این دو تیمار در جدول۳ آورده شده است. سپس با استفاده از نرم افزار SAS، آنالیز آماری نتایج حاصل از میزان بیان ژن های مورد مطالعه در تیمارهای مختلف، انجام گرفت. جدول۴ نتایج حاصل از تجزیه واریانس و جدول۵ نتایج حاصل از مقایسه میانگین در سطح ۰/۰۵ به شیوه آزمون LSD را نشان می دهند.

میزان بیان شبکه ژنی درگیر در بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های متفاوت این دو تیمار، بررسی ومطالعه شد. بررسی و مقایسه میزان تظاهر شبکه ژنی درگیر در بیوسنتز و پالایش سیانید هیدروژن در غلظت های ۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار شوری و ۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی مولار سیانید پتاسیم و همچنین افزایش غلظت سیانید پتاسیم در یک غلظت ثابت از شوری و افزایش غلظت شوری در یک غلظت ثابت از سیانید پتاسیم انجام گرفت. نمودارهای۲ تا ۶، میزان بیان ژن های مورد مطالعه را در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های متفاوت این دو تیمار نشان می‌دهد. همچنین نمودارهای مربوط به رشد سوسپانسیون سلولی گیاه آلروپوس لیتورالیس تحت تأثیر تیمارهای مختلف شوری و سیانید پتاسیم و برهمکنش های مختلف این دو تیمار، رسم و با میزان تظاهر ژن های مورد مطالعه تحت این تیمارها مقایسه گشت.

جدول۳- مقایسه اثرات متقابل شوری و سیانید پتاسیم بر میزان بیان برخی ژنهای درگیر در متابولیسم و پالایش سیانید هیدروژن در گیاه *Aeluropus littoralis*

Table 3. The effect of NaCl and KCN treatments on the expression of some genes in Hydrogen Cyanide metabolism in *Aeluropus littoralis*

Treatment	Genes									
NaCl,KCN(mM)	AdoMet S.		CAS		RHO		CYN		ACO	
	Ratio Average	STDEV	Ratio Average	STDEV	Ratio Average	STDEV	Ratio Average	STDEV	Ratio Average	STDEV
0,0 mM	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
0,0.2 mM	0.675407306	0.090354666	0.846505301	0.059813682	1.508548372	0.709069141	0.947872754	0.062010359	1.407984028	0.035804094
0,0.4 mM	0.997400271	0.03159976	1.062982028	0.056353122	1.083596421	0.040019962	0.988466253	0.013649846	1.116241104	0.061972238
60,0 mM	0.836165056	0.076993867	1.050064388	0.045815188	0.984480532	0.002230736	1.00201949	0.006768918	1.034642857	0.103672011
60,0.2 mM	1.065925174	0.054647263	0.997049115	0.03038948	3.888757837	1.941537097	1.013274837	0.02823638	0	0
60,0.4 mM	1.038153694	0.034786373	0.975195463	0.026190332	1.056623476	0.047810584	1.021002904	0.054976387	1.388115666	0.058030139
120,0 mM	0.954202183	0.070123171	1.021408528	0.045023525	1.095016424	0.063666122	0.998488778	0.001824087	1.209253285	0.202949717
120,0.2 mM	0.756449585	0.144049465	0.971733351	0.030124894	1.018481197	0.037001618	1.004154782	0.004899679	1.066154133	0.091706194
120,0.4 mM	1.024993377	0.050063248	0.93831741	0.025136527	2.027850242	1.506330548	0.970667034	0.049930347	1.202791668	0.208482972

Abbreviations: AdoMet S.: S-adenosylmethionine synthetase, CAS: β.cyanoalanine synthase, RHO: Rhodanese, CYN: Cyanase, ACO: acc oxidase, STDEV: standard deviation

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]

جدول۴- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف شوری و سیانید، بر روی ژن های مورد مطالعه

Table 4. Analysis of variance of NaCl and cyanide treatments on the studied Genes

نام ژن	تغییرات	DF	SS	MS	F value	Pr>F
AdoMet S.	Model	8	0.458751	0.057344	10.87**	<.0001
	Error	18	0.094922	0.005273	-	
	Total	26	0.553672	-	-	
CAS	Model	8	0.100927	0.012616	8.09**	0.0001
	Error	18	0.028057	0.001559	-	
	Total	26	0.128983	-	-	
RHO	Model	8	21.79052	2.723814	3.74**	0.0095
	Error	18	13.10138	0.727855	-	
	Total	26	34.8919	-	-	
CYN	Model	8	0.012081	0.00151	1.3^{ns}	0.3021
	Error	18	0.020835	0.001158	-	
	Total	26	0.032916	-	-	
ACO	Model	8	4.202994	0.525374	42.1**	<.0001
	Error	18	0.224603	0.012478	-	
	Total	26	4.427597	-	-	

** معنی دار در سطح ۱ درصد. ns: non significant

جدول۵- مقایسه میانگین بیان ژن های مورد مطالعه در تیمارهای مختلف شوری و سیانید

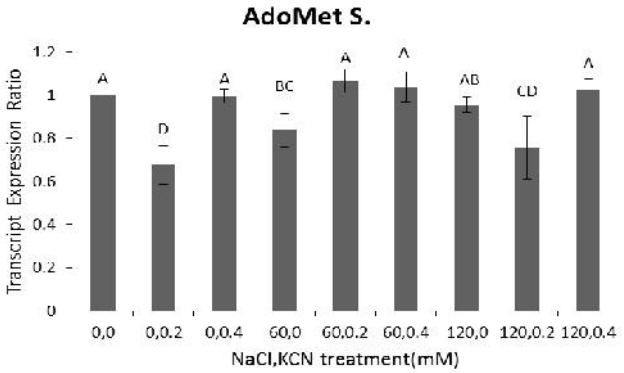
Table 5. The Expression levels of studied genes in different NaCl and cyanide treatments

تیمار	تکرار	میانگین بیان ژن				
NaCl,KCN(mM)		AdoMet S.	CAS	RHO	CYN	ACO
0,0	3	1	1	1	1	1
		A	ABC	B	AB	D
0,0.2	3	0.67541	0.84651	1.5085	0.94787	1.40798
		D	D	B	B	A
0,0.4	3	0.9974	1.06298	1.0836	0.98847	1.11624
		A	A	B	AB	DC
60,0	3	0.83617	1.05006	0.9845	1.00202	1.03464
		BC	A	B	AB	DC
60,0.2	3	1.06593	0.99705	3.8888	1.01327	0
		A	ABC	A	A	E
60,0.4	3	1.03815	0.9752	1.0566	1.021	1.38812
		A	BC	B	A	AB
120,0	3	0.9542	1.02141	1.095	0.99849	1.20925
		AB	AB	B	AB	BC
120,0.2	3	0.75645	0.97173	1.0185	1.00415	1.06615
		DC	BC	B	AB	DC
120,0.4	3	1.02499	0.93832	2.0279	0.97067	1.20279
		A	C	B	AB	BC

مقایسه میانگین در سطح 0.05 با آزمون LSD انجام شد.

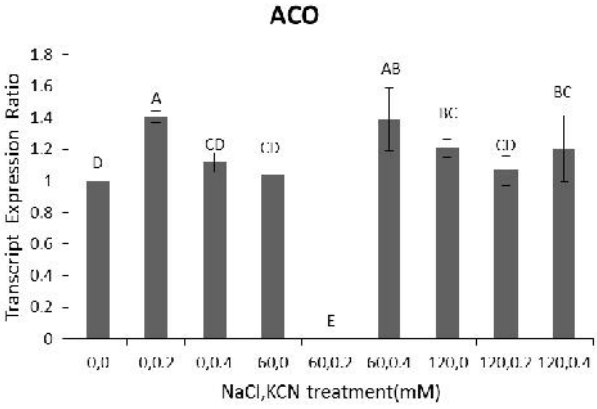
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]



نمودار۲– میزان بیان ژن کد کننده *AdoMet Synthase* در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار .

Graph 2- The expression level of AdoMet Synthase gene in different NaCl and KCN treatments



نمودار۳– میزان بیان ژن کد کننده‌ی ACC Oxidase(ACO) در غلظتهای مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار.

Graph 3- The expression level of ACC Oxidase gene in different NaCl and KCN treatments

بررسی تاثیر سیانید پتاسیم بر بیان ژن های درگیر در پالایش سیانید هیدروژن

افزایش غلظت سیانید پتاسیم به تنهایی و بدون اعمال سیانید پتاسیم، علاوه بر اینکه تاثیر معنی داری برافزایش بیان ژن های درگیر در حذف سیانید درون سلولی نداشت (نمودارهای ۴و۵و۶)، باعث کاهش رشد توده سلولی نیز شد (نمودار ۱).

بررسی تاثیر شوری بر بیان ژن های درگیر در پالایش سیانید هیدروژن

نتایج نشان داد افزایش غلظت شوری به تنهایی و بدون اعمال سیانید پتاسیم، تاثیر معنی داری بر بیان ژن های درگیر در پالایش سیانید (نمودارهای ۴و۵و۶) و همچنین رشد سلولی (نمودار ۱) ندارد. این نتایج نشان داد که سلول های آلروپوس در طول دوره این آزمایش امکان مدیریت شرایط شوری را فراهم کرده اند.

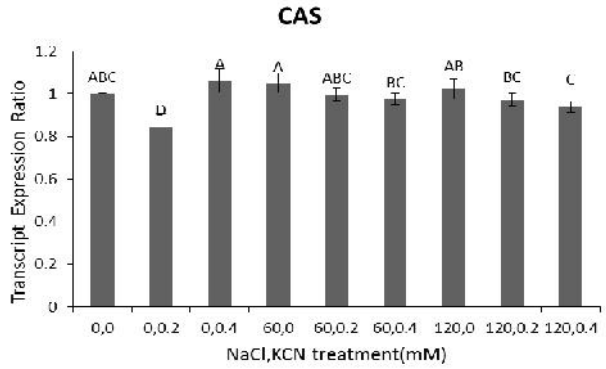
بررسی تاثیر برهم کنش سیانید پتاسیم و شوری بر بیان ژن های درگیر در پالایش سیانید هیدروژن

افزایش شوری در غلظت ۰/۴ میلی مولار سیانید پتاسیم (غلظت های ۰.۰/۴ و ۶۰.۰/۴ و ۱۲۰.۰/۴ میلی مولار NaCl, KCN)، تاثیر معنی داری در رشد سلولی داشت (نمودار ۱). طوری که تا بیش از ۴۰٪ امکان افزایش رشد را فراهم نمود. در این غلظت میزان بیان ژن CAS به طور معنی داری کاهش یافت (نمودار ۴).

بررسی بیان ژن کلیدی ACO، مسئول مستقیم بیوسنتز سیانید درون سلولی

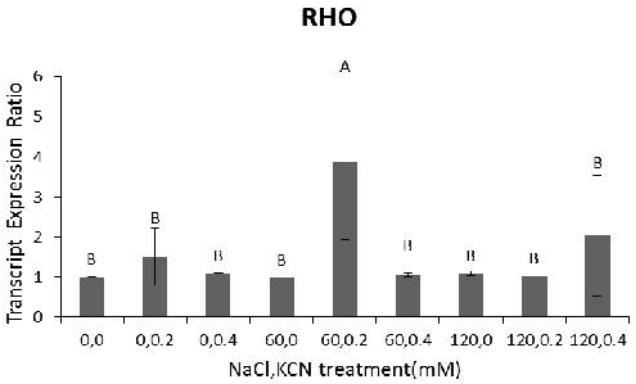
افزایش شوری در حضور غلظت ۰/۲ میلی مولار سیانید پتاسیم (غلظت های ۰.۰/۲ و ۶۰.۰/۲ و ۱۲۰.۰/۲ میلی مولار NaCl,KCN)، منجر به کاهش معنی دار بیان ژن ACO –ژن کلیدی بیوسنتز سیانید هیدروژن و اتیلن– شد (نمودار۳). همچنین در این دامنه غلظت، ما شاهد افزایش معنی دار رشد توده سلولی بودیم (نمودار ۱). با استناد بر آزمایشات صورت گرفته در این تحقیق و نیز با توجه به اثر مهاری اتیلن بر رشد گیاه (Siddikee et al., 2011)، می‌توان گفت احتمالا کاهش بیان ژن ACO در حضور غلظت ۰/۲ میلی مولار سیانید خارجی باعث کاهش تولید اتیلن و سیانید درون سلولی و به دنبال آن افزایش رشد شده است. نتایج به دست آمده نشان می دهد که علیرغم اثرات کاهنده سیانید بر رشد سلول، تیمار سیانید هیچ نقشی در القای ژن های درگیر در سمیت زدایی سیانید هیدروژن ندارد. این در حالی است که احتمالا به نظر می رسد اعمال سیانید در یک غلظت معین در حضور شوری می تواند در یک هماهنگی مولکولی امکان ارتقاء رشد سلولی را فراهم کند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]



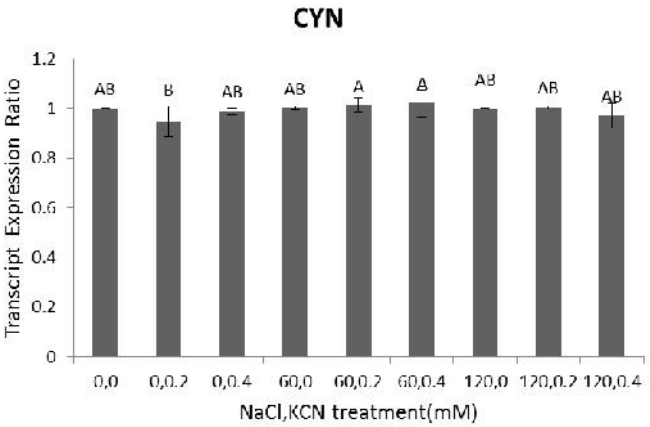
نمودار۴- میزان بیان ژن کد کننده *β. Cyanoalanine Synthase (CAS)* در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار.

Graph 4- The expression level of *β. Cyanoalanine Synthase (CAS)* gene in different NaCl and KCN treatments.



نمودار۵- میزان بیان ژن کد کننده‌ی *Rhodanese (RHO)* در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار

Graph 5- The expression level of *Rhodanese (RHO)* gene in different NaCl and KCN treatments.



نمودار۶- میزان بیان ژن کد کننده‌ی *Cyanase (CYN)* در غلظت های مختلف شوری، سیانید پتاسیم و برهمکنش های این دو تیمار

Graph 6- The expression level of *Cyanase (CYN)* gene in different NaCl and KCN treatments.

منابع

Abeles, F.B., Morgan, P.W., and Saltveit, M.E. Jr. 1992. Ethylene in Plant Biology. San Diego,CA, Academic.

Ahmad R., S.H. Zaheer and S. Ismail. 1992. Role of ssilicon in salt tolerance of wheat (*Triticum aestuvum* L.) Plant Science 85(1), 43-50.

Bogatek R, Coˆme D, Corbineau F, Picard MA, Z_ arska- Maciejewska B, Lewak S. 1999. Sugar metabolism as related to the cyanide-mediated elimination of dormancy in apple embryos. Plant Physiology and Biochemistry 37, 577–585.

Bogatek R, Lewak S. 1991. Cyanide controls enzymes involved in lipid and sugar catabolism in dormant apple embryos during culture. Physiologia Plantarum 83, 422–426.

Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. J.Exp.Bot, 55, 307-319.

Fowler, S. and Thomashow, M.F .2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. Plant Cell 14, 1675-90.

Gorham J, Bridges J, Dubcovsky J, Dvorak J, Hollington PA, Luo MC, Khan JA .1997. Genetic analysis and physiology of a trait for enhanced K+/Na+ discrimination in wheat. New Phytol 137, 109-116.

Hall M. A., Smith A.R. 1995. Ethylene and the responses of plants to stress, BULG. J. PLANT PHYSIOL., 1995, 21, 71–79.

Oracz K., Hayat El-Maarouf-Bouteau, Renata Bogatek, Francxoise Corbineau and Christophe Bailly .2008. Release of sunflower seed dormancy by cyanide: cross-talk with ethylene signalling pathway, Journal of Experimental Botany, 59(8), 2241–2251.

Petruzzelli L, Coraggio I, Leubner-Metzger G .2000. Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid oxidase. Planta 211, 144–149.

Pfaffl Michael W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR, Nucleic Acids Research, 29(9).

Pirrung MC, Brauman JI. 1987. Involvement of cyanide in the regulation of ethylene biosynthesis. Plant Physiology and Biochemistry 25, 55–61.

Smith JM, Arteca RN. 2000. Molecular control of ethylene production by cyanide in Arabidopsis thaliana. Physiologia Plantarum 109, 180–187.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol4, Number1, Spring and summer 2015, Bi-seasonal

Study of Hydrogen Cyanide Effects on Salt Stress Induction in *Aeluropus littoralis*

Ahmadi N. Milad [1]*, Askari H[1].,Soltani N. Masood[2]

1. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

2. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

* Corresponding Author, Email: milad.ah2005@gmail.com

A B S T R A C T

Salt stress is a serious problem for plant growth and development. To analyze salt stress resistance and physiological behavior of plants, the halophyte *Aeluropus littoralis* was studied. Salt stress augments ethylene hormone production in plant tissue and this leads to increased hydrogen cyanide levels. In the other hand, there is a cyanide purge mechanism involving three enzymes: Cyanase, Rhodanese and β-cyanoalanine synthase. To study plant cell growth and development under salt stress conditions, an analysis of differential expression of genes involved in biosynthesis and purge of cyanide is needed. In this study, *Aeluropus littoralis* cell suspensions were subjected to different concentrations of salt and potassium cyanide in the medium. Factorial analysis of NaCl and KCN in 0, 0/0.2, 0/0.4, 60/0, 60/0.2, 60/0.4, 120/0, 120/0.2 and 120/0.4 mM concentrations were assessed. Our study demonstrated that KCN treatment significantly reduced production of dry material. The results showed that, although cyanide has negative effect on cell growth, the cyanide detoxification gene network was not activated in these conditions. In addition, the interaction between cyanide and salinity indicated that salt stress in the presence of 0.4 mM KCN increases cell growth by 40 percent because expression of the CAS gene was reduced enormously. An increase of salinity in the presence of 0.2 mM KCN, however, reduced expression of ACO, a key gene in HCN and ethylene production. As intracellular level of HCN declined, cell growth rose. Thus external treatment of cyanide increases plant dry material and plant resistance in salt stress conditions.

Key Words

Aeluropus littoralis, Ethylene,Salt stress, Hydrogen Cyanide, qRT-PCR

E

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.2.0]