مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۷
صفحه ۳۲-۲۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

کاربرد ژنتیک معکوس در مطالعه کارکرد ژن شبه استریکتوسیدین سینتاز- ۶ آرابیدوپسیس تالیانا در پاسخ به تنش شوری

Reverse Genetic Application in functional study of *Arabidopsis thaliana* strictosidine synthase Like-6 gene under salt stress

محدثه پورکریمی دریا کناری[۱]، محمد مهدی سوهانی*[۲] و امین عابدی[۳]

Mohadece Pourkarimi Daryakenari[1], Mohammad Mehdi Sohani[2*] and Amin Abedi[3]

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، ۲- دانشیار ۳- فارغ التحصیل دکتری گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

1- M.Sc. graduate student, 2-Associate Professor, 3- PhD graduate student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: msohani@guilan.ac.ir mhdsohani@gmail.com

(تاریخ دریافت۹۷/۲/۳- تاریخ پذیرش:۹۷/۵/۳۰)

چکیده

ژن‌های شبه استریکتوسیدین سینتاز (*SSL*) از خانواده‌های ژنی موجود در ژنوم آرابیدوپسیس هستند. اورتولوگ‌های این خانواده در سایر گیاهان نظیر پریوش (*Catharanthus roseus*) آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای مونوترپنوئیدی هستند. ژن *SSL6* آرابیدوپسیس، از اعضاء خانواده ژنی *SSL*، در پاسخ به انواع تنش‌ها و مولکول‌های پیام رسان به صورت معنی‌داری القاء می‌شود. در این مطالعه، از روش‌های ژنتیک معکوس (درج T-DNA) برای تعیین نقش کارکردی ژن *SSL6* در پاسخ به تنش شوری استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با دو فاکتور و در سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل دو ژنوتیپ (Col-0 و ssl6) و سه سطح تیمار NaCl (0 mM, 100 mM, 200 mM) بود. در مقایسه با گیاه تیپ وحشی، افزایش تجمع پرولین و محتوای آنتوسیانین و کاهش محتوای مالون دی-آلدئید (MDA) در پاسخ به تنش شوری معنی‌دار بود. بررسی Real Time-PCR مشخص کرد که افزایش بیان ژن‌های *SOS* در پاسخ به تیمار شوری ۱۵۰ میلی مولار NaCl در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از تیمار در گیاه *ssl6* در مقایسه با Col-0 معنی‌دار است. در مجموع این نتایج نشان داد که احتمالاً ژن *SSL6* نقش کنترل کننده منفی در پاسخ به تنش شوری در گیاه آرابیدوپسیس بر عهده دارد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن،

تنظیم کننده منفی،

ژن فاقد عملکرد،

لاین T-DNA

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

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

مقدمه

در میان آلکالوئیدهای گیاهی، مونوترپوئید اندول آلکالوئیدها به دلیل داشتن خواص درمانی ضد مالاریا کوینین (Quinine) ، ضد سرطان وین‌بلاستین (Vinblastine) و وین‌کریستین (Vincristine) یا ضد بیماری قلبی عروقی و همچنین روان‌گردان رسرپین (Reserpine) توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. این امر منجر به شناسایی آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها شد. تریپتوفان دکربوکسیلاز و استرکتوسیدین سینتاز (Strictocidine synthase) (STR)، دو آنزیم کلیدی در تولید این ترکیبات هستند (Kutchan, 1989). آنزیم استریکتوسیدین سینتاز اولین بار از گیاهان دارویی پریوش (*Catharanthus roseus*) و رائووالفا سرپنتینا (*Rauvolfia serpentina*) جداسازی شده است (Kutchan, 1989). آرابیدوپسیس توانایی تولید ترکیبات پیچیده آلکالوئیدی را ندارد، اما حاوی ژن‌هایی است که همولوژی بالایی با ژن *STR* پریوش داشته و بنابراین همولوگ ژن‌های فوق در آرابیدوپسیس شبه استرکتوسیدین سینتاز (*SSL*) نامیده شدند (Fabbri et al. 2000). تاکنون بر اساس مطالعات انجام گرفته ۱۵ ژن دارای دومین استریکتوسیدین سینتاز در آرابیدوپسیس شناسایی شده است که نقش و نوع فعالیت بسیاری از آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها و نیز در مراحل نموی مشخص نشده است(Fabbri *et al*. 2000). پروتئین-های حاوی دمین استریکتوسیدین سیتاز در جانوران و حشرات نیز یافت شده است. مطالعه پروتئین‌های حاوی دمین SSL در انسان نشان دهنده بیان بالای این ژن در مغز است. در اندام‌های انسانی انواع ایندول آلکالوئیدها نظیر رزرپین به محض تداخل با سیناپس انتقالی واسطه با دوپامین عمل می‌کنند (Fabbri *et al*. 2000). پروتئین همومیوسین یک پذیرنده لکتین بوده و در سیستم ایمنی مگس سرکه نقش دارد. همسانه سازی ژن همومیوسین و بررسی مولکولی آن مشخص کرد که این پروتئین یک گلیکوپروتئین متصل به غشاء بوده و دارای یک ناحیه کوتاه درون سلولی و دو ناحیه خارج سلولی است که شامل یک ناحیه مشابه با پروتئین‌های SSL گیاهی و یک ناحیه مشابه به میوسین در انسان است (Fabbri *et al*. 2000). بررسی روابط فیلوژنتیکی برخی از اعضاء خانواده ژنی *SSL* آرابیدوپسیس نشان داد که این ژن‌ها دارای رابطه تکاملی با پروتئین همومیوسین مگس سرکه می‌باشند، بنابراین یک کلاس خاص از ژن‌های *SSL* شبه همومیوسین (*HML*) نامیده شدند که شامل ژن‌های *AtSSL4-AtSSL7* می‌باشند (Sohani *et al*. 2009).

مطالعاتی که بر روی القاء بیان ژن‌های *AtSSL4-AtSSL7* آرابیدوپسیس صورت گرفت مشخص کرد که ژن‌های شبه همومیوسین در اثر زخم، تیمار با ویروس CMV و قارچ *Alternaria brassicicola* و نیز تیمار با ترکیبات فعال‌کننده پیام دفاعی نظیر سالسیلیک اسید، جاسمونات و اتیلن به صورت معنی‌دار افزایش می‌یابد که بیانگر نقش احتمالی این ژن‌ها در واکنش دفاعی القائی در گیاه است (Sohani *et al*. 2009)، همچنین میزان بیان این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های شوری، نور ماوراءبنفش و سالسیلیک اسید چند برابر شرایط شاهد است. القاء بیان ژن *SSL6* در پاسخ به محرک‌های زیستی و غیر زیستی، احتمال ایفاء نقش این ژن در شرایط تنش از جمله تنش شوری را افزایش می‌دهد (Kibble *et al*. 2009).

شوری خاک از عوامل مهم محدود کننده عملکرد گیاهان است (Hanin *et al*. 2016). در سطح جهانی، تخمین زده می‌شود که حدود ۹۰۰ میلیون هکتار از زمین‌ها شور بوده و بیش از ۳۰ درصد از محصولات آبیاری شده تحت تأثیر نمک هستند (Schroeder *et al*. 2013). غلظت بالای NaCl مانع از جذب آب به وسیله گیاه شده و همچنین با تجمع Na^+ و Cl^- در سیتوسول منجر به سمیت یونی و در نتیجه باعث کاهش میزان فتوسنتز، هدر رفت انرژی و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود (Deinlein *et al*. 2014; Golldack *et al*. 2014; Julkowska and Testerink, 2015; Zhu, 2002).

بخش گسترده‌ای از تحمل به شوری در نتیجه عملکرد ژن‌هایی است که سرعت جذب نمک از خاک و انتقال آن به سراسر گیاه را محدود می‌کند و تعادل اسمزی و یونی را در ریشه‌ها و اندام-های هوایی برقرار می‌کند (Greenway and Munns, 1980) . مطالعات نشان داده است که افزایش در سطح بیان برخی ژن‌های دخیل در شوری منجر به بهبود عملکرد گیاه در تنش شوری شده است (Chinnusamy *et al*. 2006) . افزایش در سطح بیان ژن‌های

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

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

تنظیمی مانند فاکتورهای رونویسی و پروتئین کینازها در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی تحمل گیاه را نسبت به شوری افزایش داده است (Kasuga *et al.* 1999; Teige *et al.* 2004). شناسایی ژن-های دخیل در مقاومت گیاهان به تنش شوری می‌تواند نوید دهنده تولید گیاهان مقاوم به (Kovinich *et al.* 2015) این تنش از طریق انتقال ژن و مهندسی ژنتیک باشد.

برای مطالعه نقش کارکردی ژن هدف، از سه روش کلی استفاده از پایگاه‌های داده ژنومی و مطالعات بیوانفورماتیک، ژنتیک رو به جلو (Forward Genetics) و در نهایت ژنتیک معکوس (Reverse Genetics) استفاده می‌شود. از طریق پایگاه‌های داده-های بیوانفورماتیکی، می‌توان توالی نوکلئوتیدی یا آمینو اسیدی ژن هدف را با توالی‌های موجود در پایگاه‌های داده مقایسه و بر اساس میزان شباهت بین توالی و رسم درخت فیلوژنتیکی ارتباط دو توالی را مقایسه و در نهایت با توجه به عملکرد توالی موجود در پایگاه داده به عملکرد احتمالی توالی هدف دست یافت. در روش‌های ژنتیک رو به جلو هدف ایجاد جهش‌یافته‌هایی با فنوتیپ مطلوب بوده و پس از رسیدن به فنوتیپ مطلوب با بررسی‌های ژنومی، ترانسکریپتومی، پروتئومی و متابولیکی در نهایت می‌توان ژن مربوط به فنوتیپ مورد نظر و عملکرد آن را تعیین کرد. در روش‌های ژنتیک معکوس با فرابیان (Overexpression) یا سرکوب کردن (Knokout) و تولید لاین-های جهش یافته فاقد عملکرد (Loss-of-Function) و افزایش عملکرد (Gain-of-Function) و سپس به فنوتیپ و نقش متناظر با ژن هدف دست یافت. این رویه هدفمندتر از ژنتیک رو به جلو بوده و نیازی به ایجاد جهش فراگیر ندارد. ژنتیک معکوس برای بررسی خانواده‌های ژنی که عملکرد یک ژن منفرد ممکن است در ارتباط با اعضای دیگر خانواده‌اش باشد، مفید خواهد بود (Østergaard and Yanofsky, 2004). در روش‌های فاقد عملکرد از T-DNA برای سرکوب ژن هدف استفاده می‌شود (Kuromori *et al.* 2009).

هدف پژوهش حاضر مطالعه نقش ژن شبه استریکتوسیدین سینتاز ۶- (*SSL6*) آرابیدوپسیس در پاسخ این گیاه نسبت به تنش شوری با استفاده از لاین جهش‌یافته T-DNA آن (*ssl6*) است که طی آن تأثیر سرکوب ژن *SSL6* بر برخی از خصوصیات بیوشیمیایی نظیر محتوای آنتوسیانین و پرولین، پراکسیداسیون لیپیدها و همچنین الگوی بیان ژن‌های مسیر فوق حساس به شوری (Salt Overly Sensitive, SOS) در پاسخ به تنش شوری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از گیاه مادری (WT) آرابیدوپسیس اکوتیپ کلمبیا (Col-0) و لاین جهش‌یافته T-DNA ژن *SSL6* (*ssl6*) با شماره دسترسی (SALK-046142) استفاده شد که از مرکز منابع زیستی آرابیدوپسیس (Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC) تهیه شده بود. در لاین جهش‌یافته، T-DNA در ناحیه پروموتری و در نزدیک 5′ UTR درج شده است.

برای کشت گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای (*In vitro*) از محیط کشت MS ½ حاوی ۱٪ ساکارز استفاده شد. ضد عفونی بذرها با هیپوکلرید سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه و ۳ بار آبکشی با آب دو بار استریل شده صورت گرفت. بذرها به مدت ۳ روز در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا ورنالیزاسیون بذرها انجام شود. شرایط محیطی رشد گیاهان در کشت درون شیشه، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی/تاریکی ۸/۱۶ ، شدت نوری 120 mol/m2sec بود. پس از گذشت دو هفته گیاهچه‌های WT و*ssl6* به محیط حاوی MS ½ با غلظت‌های صفر و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl انتقال داده شدند، پس از چهار روز نمونه‌برداری برای مطالعات بعدی انجام شد (Yadav *et al.* 2016).

میزان آنتوسیانین

اندازه‌گیری آنتوسیانین به روش (Lange *et al.* 1971) انجام گرفت. مقدار ۰/۰۲ گرم بافت گیاه در ازت مایع خرد و سپس ۴ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد اسید کلریدریک در متانول به آن افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

نور در فاز رویی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۵۳۰ و ۷۵۷ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول A=A550 – (0.25 A657) میزان نسبی آنتوسیانین تعیین شد که در آن A میزان نسبی آنتوسیانین و A550 و A657 به ترتیب جذب نور نمونه در طول موج‌های ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر است.

پراکسیداسیون لیپیدها

برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، غلظت مالون-دی‌آلدئید حاصل از این واکنش اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدئید به روش (Heath and Packer, 1968) انجام گرفت. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تازه برگی با استفاده از ازت مایع خرد شده در هاون چینی خرد شده و سپس ۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (TCA) ۰/۱٪ به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. ۴/۵ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰ ٪ (دارای ۵ گرم اسید تیوباربیتوریک (TBA) در ۱۰۰ گرم) به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز MDA-TBA است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد.

محتوای پرولین

گیاهچه‌ها برای تخمین محتوای پرولین طبق روش بیتس مورد استفاده قرار گرفتند(Bates *et al.* 1973). برای تهیه معرف ناین هیدرین، ۱/۲۵گرم ناین هیدرین به ۳۰ میلی‌لیتر گلاشیال استیک اسید اضافه و در حرارت ملایم حل شد . سپس ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار به آن اضافه و کاملاً به هم زده شد. این محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت پایدار است. برای سنجش محتوای پرولین ۰/۵ گرم بافت تر گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ ٪ در هاون چینی همگن شد تا کاملاً یکنواخت شود. عصاره حاصل با کاغذ واتمن شماره ۲ صاف و حجم آن یادداشت شد.۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده با ۲ میلی‌لیتر محلول ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر گلاشیال استیک اسید مخلوط شده و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. پس از آن با قرار دادن لوله‌های آزمایش در حمام یخ واکنش مذکور متوقف شد. سپس ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محتویات هر لوله اضافه و به مدت۲۰–۱۵ ثانیه به شدت به هم زده شد. فاز رویی که شامل تولوئن و پرولین بود از فاز آبی جدا و جذب آن به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد. در این سنجش از تولوئن به عنوان شاهد بوده و غلظت پرولین در هر نمونه بر اساس جذب و غلظت‌های معین موجود در منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم در گرم وزن‌تر محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های شرح داده شده با سه تکرار و در سه سطح تیماری صفر ،۱۰۰ و ۲۰۰میلی‌مولار NaCl در قالب طرح کامل تصادفی انجام گرفت. مقایسه میانگین به روش LSD و تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم با نرم‌افزار SAS و Excel انجام شد.

بررسی الگوی بیان ژن‌های *SOS* در تیمار NaCl

برای بررسی بیان نسبی ژن‌های مارکر شوری SOS در تیمار شوری، بذرهای دو ژنوتیپ WT و *ssl6* در شرایط درون شیشه کشت و به مدت دو هفته رشد داده شدند. برای اعمال تیمار تنش شوری، کاغذهای واتمن در محیط MS ½ حاوی یک درصد ساکارز و ۱۵۰ میلی مولار NaCl اشباع شده و به پتری منتقل شدند. گیاهچه‌ها با احتیاط از محیط کشت جدا و به محیط تیمار انتقال یافتند. نمونه‌برداری در زمان‌های صفر،۳ و ۶ ساعت بعد از تیمار انجام گرفت. نمونه‌ها برای انجام مطالعات بعدی در فریزر ۷۰– قرار گرفتند (Dong and Liu, 2010).

استخراج RNA تام با کیت RNXPlus شرکت سینا کلون انجام و کیفیت و کمیت RNA استخراجی با الکتروفورز و نانودراپ (Thermo scientific, USA) بررسی شد. جهت حذف آلودگی DNA ژنومی احتمالی، RNA استخراج شده با DNaseI (Thermo scientific) تیمار و سپس برای سنتز cDNA با استفاده از Oligo dT و کیت سنتز cDNA (Thermo scientific) استفاده شدند. آغازگر ژن‌های *SOS1*،*SOS2*،*SOS3* و *Act-2* با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (http://primer3.ut.ee/) طراحی شدند (جدول

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

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

۱). واکنش qRT-PCR با استفاده از کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix شرکت Thermo fisher انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱ میکرولیتر از cDNA رقیق شده (۱ به ۱۰) به همراه ۶/۲۵ مسترمیکس(Master Mix qPCR)، ۰/۳ میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی و۴/۶۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر بود.

پس از انجام واکنش اختصاصی بودن تکثیر بر اساس منحنی و پیک ذوب مشخص شد. ژن *Act-2* جهت نرمال سازی داده‌های واکنش استفاده شد. مقدار نرمال شده Ct شاهد (تیمار نشده) از مقدار نرمال شده Ct نمونه هدف کسر و تفاوت نسبی نمونه هدف در برابر نمونه تیمار نشده با معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001).

جدول ۱- لیست آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real Time PCR.

Table 1. List of primers used in the Real Time PCR

ژن	شماره دسترسی	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (C°)
SOS1	At2g01980	ACACCACCACGTAGCTCAAG	TGCCGAAAATGCTGAGTTGC	۱۶۶	۵۷/۲
SOS2	At5g35410	ACCGTGACCTAAAGCCAGAA	TGCTGAACCATCGTAACCCT	۱۷۶	۵۷/۲
SOS3	At5g24270	AGGTGTCTTCCATCCAAGCG	GCACGAAAGCCTTATCCACC	۱۸۸	۵۷/۲
Act2	At3g18780	CTTGTTCCAGCCCTCGTTTG	CGATACCTGAGAACATAGTGG	۱۴۹	۵۷/۲

نتایج و بحث

تنش شوری مهم‌ترین عامل محدود کننده میزان تولید گیاهان زراعی بشمار می‌رود (Amirjani, 2011). کاربرد روش‌های مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی به‌منظور تولید گیاهان مقاوم به شوری برای فراهم کردن نیاز غذایی جمعیت در حال افزایش جهان از اهمیت بالایی برخوردار است. یک رویکرد مهم برای تولید گیاهان زراعی مقاوم به شوری انتقال ژن‌های عامل تحمل به این تنش به گیاهان زراعی هست (Hasegawa *et al.* 2000). لازمه این کار شناسایی و مطالعه کارکردی ژن‌های دخیل در پاسخ گیاه به تنش شوری با استفاده از روش‌های ژنتیک پیشرو و معکوس است. در این مطالعه به‌منظور بررسی نقش کارکردی ژن *SSL6* در پاسخ آرابیدوپسیس به تنش شوری از لاین سرکوب شده T-DNA این ژن استفاده شد.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، میزان آنتوسیانین در مورد تیمار شوری و اثر متقابل در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول۲). مقایسه میانگین نشان داد که در سطح صفر اختلاف معنی‌دار در میزان آنتوسیانین بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد، در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار میزان آنتوسیانین در ژنوتیپ *ssl6* به ترتیب به مقدار ۰/۲۴۹و ۰/۳۱ و در ژنوتیپ Col-0 به ترتیب به مقدار ۰/۱۷و ۰/۲۴۱ بوده و بین دو ژنوتیپ اختلاف معنی‌دار وجود داشته و با افزایش شدت تنش میزان آنتوسیانین افزایش نشان می‌دهد (جدول۳).

جدول ۲-تجزیه واریانس برخی از صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در تیپ وحشی Col-0 و لاین جهش یافته ssl6 در پاسخ به تنش شوری

Table 2. Analysis of variance of biochemical and physiological traits in wild-type Col-0 and ssl6 mutant line under salt stress.

منابع تغییر	درجه آزادی	Anthocyanin	Proline	MDA
ژنوتیپ	۱	۰/۰۰۴ ^{ns}	۶/۷۵ **	۱۶/۸۲ **
تیمار	۲	۰/۰۲۷ **	۸/۹۷ ^{ns}	۱۰/۸۷ **
ژنوتیپ*تیمار	۲	۰/۰۰۷ **	۱/۶۷ ^{ns}	۲/۹۶ **
خطا	۱۲	۰/۰۰۰۲	۰/۲۷	۰/۰۹

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی دار در سطح ۵ درصد و ۱ درصد

ns, * and ** indicating non-significant and significant at 5 and 1% levels of probability, respectively

بر اساس داده‌های حاصل از تجزیه واریانس (جدول۲)، میزان مالون دی‌آلدئید در مورد ژنوتیپ، تیمار و اثر متقابل ژنوتیپ و تیمار در سطح یک درصد معنی‌دار است. داده‌های مقایسه میانگین نشان داد که اگرچه افزایش شدت تنش موجب افزایش میزان مالون دی‌آلدئید می‌شود اما شدت افزایش در لاین جهش یافته *ssl6* کمتر است. بنابراین در محیط فاقد نمک، میزان مالون دی آلدئید در گیاه مادری و لاین *ssl6* تفاوت معنی‌دار وجود ندارد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

همچنین میزان مالون دی‌آلدئید در سطح ۱۰۰میلی مولار برای Col-0 و *ssl6* به ترتیب ۴/۸۳ و ۲/۳۳ بوده و تفاوت معنی‌دار دارند. میزان مالون دی‌آلدئید در سطح ۲۰۰میلی مولار نیز در لاین جهش یافته *ssl6* کمتر بوده و تفاوت بین این لاین با گیاه مادری معنی‌دار است (جدول۳).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای پرولین نشان می‌دهد که در مورد تیمار شوری در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار بوده (جدول۲) و مقایسه میانگین اثرات ساده نشان داد که محتوای پرولین در ژنوتیپ *ssl6* بیشتر از ژنوتیپ Col-0 بوده و تفاوت معنی‌دار است. در بین سطوح مختلف تنش شوری اختلاف معنی-داری بین سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار با سطح صفر وجود دارد. در واقع، افزایش شدت تنش باعث افزایش میزان پرولین شده است (جدول۴).

محافظت کننده‌های اسمزی مولکول‌های کوچک، خنثی و غیر سمی هستند که پروتئین‌های غشاء را در برابر تاثیرات مخرب محلول نمک در غلظت بالا و سایر محلول‌های زیان‌آور پایدار می‌کنند (Munns, 2002). در گیاهان مهم‌ترین محلول حمایت کننده اسمزی سازگار گلیسین بتائین، پرولین و پلی آل‌ها هستند (Rontein *et al*. 2002). به طور معمول سطح حمایت کننده‌های اسمزی در شرایط تنش اسمزی بالاست (Bohnert *et al*. 1995). تجمع پرولین رابطه مثبت و مستقیم با افزایش مقاومت به کم آبی در تنش‌های کم آبی و شوری ایجاد شده در گیاه دارد (Saneoka *et al*. 2004). تجمع پرولین در سیتوپلاسم مانند یک اسموتیکوم در حفاظت ساختمان ماکرومولکول‌ها در محیطی که تعادل یونی آن بهم خورده‌است عمل می‌کند (Nayyar, 2003). افزایش پرولین منجر به حفظ تورم و کاهش خسارت غشاء در گیاهان می‌شود. بدین ترتیب با تنظیم اسمزی، سازگاری به تنش کم آبی و شوری افزایش می‌یابد (Pandey and Agarwal, 1998). پرولین همچنین بعنوان یک چاپرون ساختار پروتیئن‌ها را حفظ کرده و نیز بعنوان یک جمع آوری کننده ROSها مطرح است (Liu *et al*. 2014). طبق نتایج به دست آمده میزان پرولین در شرایط تنش در ژنوتیپ*ssl6* افزایش معنی‌داری داشته و بنابراین در مقاومت بیشتر این لاین نسبت به تنش شوری می‌تواند نقش مهمی داشته باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش شوری بر روی محتوای MDA و آنتوسیانین در تیپ وحشی Col-0 و لاین جهش یافته *ssl6*

Table 3. Mean comparison of interaction effect of salt stress in MDA and anthocyanin content in wild-type Col-0 and *ssl6* mutant line

سطوح شوری	ژنوتیپ	Anthocyanin (µmol/g.FW)	MDA (nmol/g.FW)
صفر	Col-0	^{c}۰/۱۶	^{e}۱/۴۶۶
	ssl6	^{d}۰/۱۱	^{de}۱/۸۶۰
۱۰۰ میلی-مولار	Col-0	^{c}۰/۱۷	^{b}۴/۸۳
	ssl6	^{b}۰/۲۴	^{cd}۲/۳۳
۲۰۰ میلی-مولار	Col-0	^{b}۰/۲۴	^{a}۵/۷۰
	ssl6	^{a}۰/۳۱	^{c}۲/۷۳

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی-داری ندارند.

Means with similar letters in each column are not significantly different using LSD test.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات اصلی تنش شوری بر روی محتوای پرولین در تیپ وحشی Col-0 و لاین جهش یافته *ssl6*

Table 4. Mean comparison of simple effect of salt stress in proline content in wild-type Col-0 and *ssl6* mutant line

منابع تغییر	سطوح	پرولین(µmol/gFW)
ژنوتیپ	Col-0	^{b}۲/۲۶۶۰
	ssl6	^{a}۳/۴۹۱۰
تیمار شوری	صفر	^{b}۱/۴۶۸۹
	۱۰۰ میلی‌مولار	^{a}۳/۵۰۷
	۲۰۰ میلی‌مولار	^{a}۳/۶۶۰

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with similar letters in each column are not significantly different using LSD test.

مالون دی‌آلدئید به عنوان یک معرف برای بررسی میزان صدمات غشاء در شرایط تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد (*Jaleel et al*. 2007; Katsuhara *et al*. 2005). هنگامی که گیاهان در معرض تنش شوری قرار می‌گیرند، تولید ترکیبات اکسیژن فعال موجب تغییر ساختار لیپیدهای غشا و آسیب دیدگی آن‌ها از طریق تولید رادیکال سوپراکسید می‌شود (Mittler *et al*. 2004). پراکسیداسیون القاء شده در غشاهای لیپیدی توسط تنش شوری

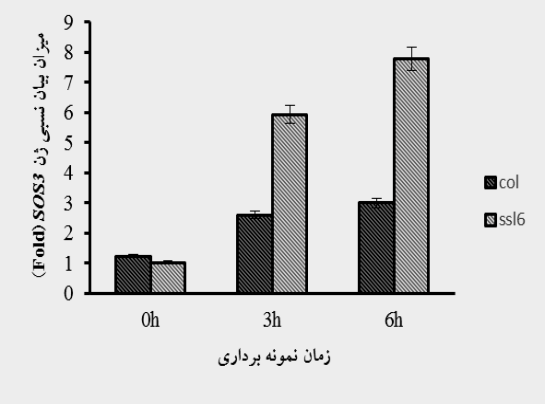
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

نشان دهنده آسیب در سطح سلولی بوده و سطح مالون دی آلدئید تولید شده در طی این فرآیند به عنوان یک شاخص از آسیب اکسیداتیو در نظر گرفته شده است (Fadzilla *et al.* 1997). در این آزمایش تفاوت معنی‌داری در مقدار مالون دی آلدئید در گیاه مادری و لاین جهش‌یافته مشاهده شد. میزان افزایش MDA در گیاه مادری بیشتر است که نشان دهنده آسیب بیشتر سلول‌های آن در مقایسه با لاین جهش یافته در پاسخ به تنش شوری است.

آنتوسیانین‌ها در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی نظیر خشکی، شوری، سرما و شدت نور بالا در گیاهان تجمع یافته و کارکردهای متفاوتی نظیر مولکول‌های پیام رسان، حفاظت در برابر شدت نور بالا و جمع آوری کننده ROS بر عهده دارند (Kovinich *et al.* 2015). تجمع آنتوسیانین در طی تنش شوری در بسیاری از گیاهان نظیر گوجه فرنگی، ذرت، نیشکر و آرابیدوپسیس گزارش شده است. در تمامی این مطالعات مشخص شده است که تجمع آنتوسیانین با میزان تحمل گیاه علیه تنش رابطه مستقیم دارد(Lotkowska *et al.* 2015). در مطالعه حاضر سرکوب ژن *SSL6* موجب تجمع معنی‌دار آنتوسیانین در لاین جهش یافته نسبت به گیاه مادری شده است. بنابراین به نظر می‌رسد بین این ژن و مسیر بیوسنتز آنتوسیانین یک رابطه منفی وجود داشته باشد. باید توجه کرد از جمله نقش‌های مهم پرولین و آنتوسیانین جمع آوری ROSها در شرایط تنش بوده و همچنین میزان MDA بعنوان یک شاخص در افزایش فعالیت ROSها درنظر گرفته می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد سرکوب ژن *SSL6* می‌تواند از طریق کاهش تولید یا القاء مسیرهای جمع آوری ROSها موجب افزایش مقاومت گیاه به تنش شوری شود.

با بررسی بیان ژن‌های *SOS* ، میزان حساسیت Col-0 و *ssl6* نسبت به شوری مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژن *SOS3*، ۳ ساعت پس از تیمار شوری در جهش‌یافته *ssl6* ۵/۹۲ و برای گیاه مادری ۲/۵۹ می‌باشد. ۶ ساعت پس از تیمار شوری بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ افزایش یافته است. این افزایش در جهش‌یافته و گیاه مادری به ترتیب ۷/۷۸ و۲/۹۹برابر زمان صفر است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود شدت القاء ژن *SOS3* در لاین جهش‌یافته بیشتر بوده، اما در گیاه مادری ژن مذکور ابتدا القاء شده و سپس افزایش معنی‌داری نداشته است. بنابراین بیان ژن *SOS3* در لاین جهش‌یافته نسبت به گیاه مادری در هر دو زمان ۳ و ۶ ساعت پس از تیمار به ترتیب ۲/۲۸ و ۲/۶۰ برابر بیشتر است (شکل ۱).



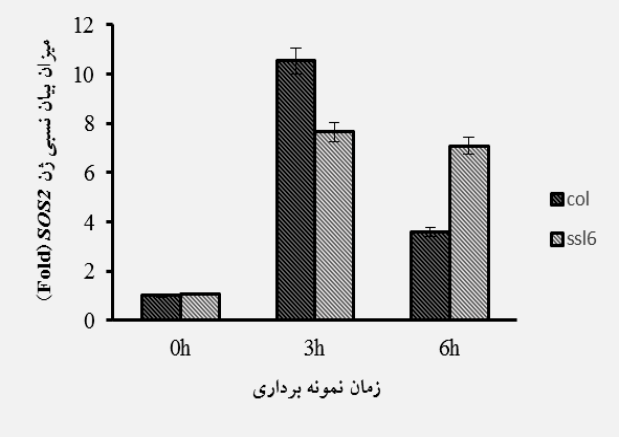
شکل ۱- الگوی بیان نسبی ژن SOS3 در پاسخ به تنش شوری با استفاده از qRT-PCR. RNA تام از گیاهچه‌های دو هفته‌ای Col-0 و ssl6 تیمار شده با ۱۵۰ میلی مولار NaCl به مدت صفر، ۳ و ۶ ساعت استخراج شد. از ژن Act-2 بعنوان کنترل استفاده شد.

Figure 1. The expression level of *SOS3* gene in response to salt stress was analysed by qRT-PCR. Total RNA was isolated from tow week old Col0, and *ssl6* seedlings treated with 150 mM NaCl for 0 h, 3 h, and 6 h. In all experiments, the expression of the constitutive *Act-2* gene was used as the control.

بیان ژن *SOS2*، 3 ساعت پس از تیمار شوری این افزایش در لاین جهش‌یافته و گیاه مادری به ترتیب ۷/۶ و ۱۰/۵۸ برابر بوده و ۶ ساعت پس از تیمار شوری برای لاین جهش‌یافته ۷/۰۸ و برای گیاه مادری ۳/۶۰ برابر است (شکل۲). بیان این ژن اگرچه افزایشی هست با این حال، الگوی آن در لاین جهش یافته و گیاه مادری متفاوت است. در زمان ۳ ساعت پس از تیمار در هر دو گیاه مادری و لاین جهش یافته بیان القاء شده است. اما در لاین جهش یافته و ۶ ساعت پس از تیمار کاهش غیر معنی‌داری مشاهده می‌شود. در گیاه مادری این الگو متفاوت بوده و در زمان ۶ ساعت پس از تیمار نزدیک به ۳ برابر سرکوب شده است.

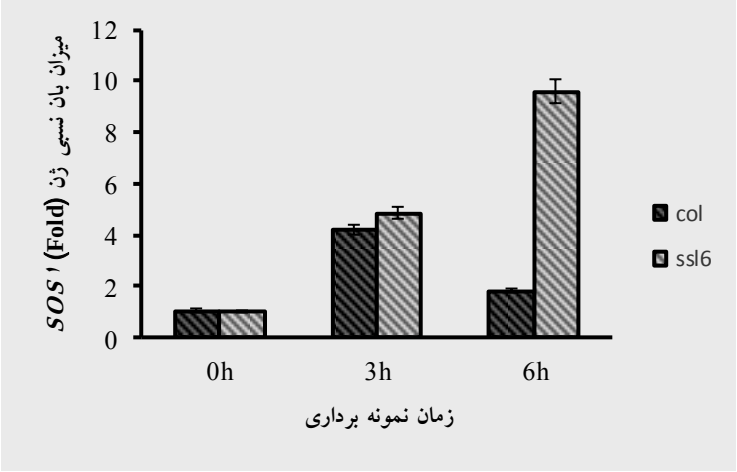
همان‌گونه که مشاهده می‌شود شدت القا ژن *SOS1* در لاین جهش یافته بیشتر بوده، اما درگیاه مادری ژن مذکور ابتدا القا شده و سپس کاهش نشان می‌دهد. بیان ژن SOS1 در لاین جهش یافته نسبت به گیاه مادری در هر دو زمان ۳ و ۶ ساعت پس از تیمار شوری به ترتیب ۱/۴ و ۵/۳۳ برابر بیشتر است (شکل ۳).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]



شکل ۲- الگوی بیان نسبی ژن SOS2 در پاسخ به تنش شوری با استفاده از qRT-PCR. RNA تام از گیاهچه‌های دو هفته‌ای Col-0 و ssl6 تیمار شده با ۱۵۰ میلی مولار NaCl به مدت صفر، ۳ و ۶ ساعت استخراج شد. از ژن Act-2 بعنوان کنترل استفاده شد.

Figure 2. The expression level of *SOS2* gene in response to salt stress was analysed by qRT-PCR. Total RNA was isolated from tow week old Col0, and *ssl6* seedlings treated with 150 mM NaCl for 0 h, 3 h, and 6 h. In all experiments, the expression of the *Act-2* gene was used as the control.



شکل ۳- الگوی بیان نسبی ژن SOS1 در پاسخ به تنش شوری با استفاده از qRT-PCR. RNA تام از گیاهچه‌های دو هفته‌ای Col-0 و ssl6 تیمار شده با ۱۵۰ میلی مولار NaCl به مدت صفر، ۳ و ۶ ساعت استخراج شد. از ژن Act-2 بعنوان کنترل استفاده شد.

Figure 3. The expression level of *SOS1* gene in response to salt stress was analysed by qRT-PCR. Total RNA was isolated from tow week old Col0, and *ssl6* seedlings treated with 150 mM NaCl for 0 h, 3 h, and 6 h. In all experiments, the expression of the *Act-2* gene was used as the control.

ژن‌های مسیر *SOS* در بسیاری از گونه‌های گیاهی حفاظت شده می‌باشند (Martínez-Atienza *et al*. 2007; Olias *et al*. 2009; Tang *et al*. 2003; Wu *et al*. 2007; Xu *et al*. 2011) و فرابیان آن‌ها در آرابیدوپسیس و سایر گونه‌ها موجب افزایش تحمل به تنش شوری شده است (Shi *et al*. 2003; Yang *et al*. 2009; Zhang and Blumwald, 2001). SOS1 mRNA در شرایط رشد طبیعی ناپایدار است، اما توسط نمک و کم آبی تثبیت می‌شود (Chung *et al*. 2008; Shi *et al*. 2003). تثبیت *SOS1* mRNA همچنین توسط میانکنش ROS ها با *SOS1* رخ می‌دهد، که یک جز در استرس اکسیداتیو سیگنالینگ است (Chung *et al*. 2008; Katiyar-Agarwal *et al*. 2006). فرابیان ژن *SOS1* تحمل به تنش شوری در تراریخته‌های آرابیدوپسیس (Shi *et al*. 2003) و توتون (Yue *et al*. 2012) افزایش داده است. گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تراریخته در مقایسه با گیاهچه‌های کنترل رشد زودرس گیاهچه و افزایش رشد ریشه تحت تنش را داشته‌اند (Shi *et al*. 2003). در توتون، تراریخته‌های فرابیان *SOS1* در تست جوانه‌زنی نسب به

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

گیاهچه‌های کنترل افزایش جوانه زنی وهمچنین افزایش در میزان کلروفیل در گیاهچه‌های تراریخته نسبت به کنترل داشتند، نسبت سدیم به پتاسیم نیز در گیاهچه های فرابیان بیشتر از کنترل بود (Yue *et al*. 2012).

SOS2 ممکن است در مسیر ROS شرکت کند (Verslues *et al*. 2007). در مطالعه‌ای که در گیاه صنوبر بر ژن*PtSOS2TD* انجام شد، در حضور H_2O_2 میزان کلروفیل در گیاهان فرابیان نسب به وحشی کاهش معنی‌داری داشته است. میزان MDA نیز در نمونه وحشی افزایش داشته است که نشان دهنده تاثیر مثبت فرابیان ژن SOS2 بر مقاومت صنوبر در مقابل تنش شوری است (Yang *et al*. 2015).

ژن‌های *SOS1* و *SOS3* و ژن‌های مارکر شوری در ژنوتیپ‌های *atmyb73 ko* و *atmyb73 eko* افزایش بیان داشته است. *AtMyb73* یک ژن اختصاصی در شرایط تنش شوری است.پس از شش ساعت تیمار NaCl دو ژنوتیپ موتانت فوق در مقایسه به گیاه مادری افزایش سطح بیان در ژن های *SOS1* و *SOS3* داشتند و بیانگر نقش منفی ژن *AtMyb73* در تنش شوری است (Kim *et al*. 2013).

مسیر سیگنالینگ SOS که نقش تنظیم هموستازی یونی را بر عهده دارد، توجه زیادی رو به خود جلب کرده است. *SOS1* یک آنتی پورترNa/H غشایی است که سدیم را به خارج از ریشه جریان می‌دهد و یون‌های سدیم را در زایلم هدایت می‌کند (Munns, 2005; Olias *et al*. 2009; Shi *et al*. 2003; Zhu, 2003). دومین پروتئین جز سرین/ترئونین پروتئین کیناز SOS2 است و سومین پروتئین اتصال دهنده کلسیم SOS3 است. مسیر SOS به وسیله SOS3درک می‌شود و کمپلکس SOS3-SOS2 که با فعالیت ترانسپورتری SOS1 فسفوریلیه و فعال می‌شود. فعال شدن کمپلکس SOS3-SOS2 همچنین باعث القاء سایر ژن‌های درگیر و فعال‌سازی رونویسی SOS1 و تثبیت سطح سلولی mRNA SOS1 می‌شود (Ji *et al*. 2013; Zhu, 2003). بیان *SOS1*، *SOS2* و *SOS3* در ژنوتیپ *ssl6* بیشتر از Col-0 بود و بنابراین می‌توان گفت نقش مثبتی در مقاومت لاین جهش یافته به تنش شوری ایفا می‌کنند. همانگونه که مشاهده شد سرکوب ژن *SSL6* آرابیدوپسیس موجب افزایش بیان ژن‌های *SOS* و همچنین افزایش محتوای پرولین و آنتوسیانین و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در لاین جهش یافته شده است. بنابراین می‌توان گفت ژن *SSL6* نقش کنترلی منفی در پاسخ آرابیدوپسیس به تنش شوری دارد.

نتیجه گیری نهایی

در این مطالعه نقش احتمالی ژن *SSL6* در پاسخ به تنش شوری با استفاده از لاین جهش‌یافته آن بررسی شد. اندازه‌گیری آنتوسیانین ، مالون دی آلدئید و پرولین در شرایط تنش، بیانگر واکنش بهتر جهش‌یافته نسبت به گیاه مادری بود. در واقع سرکوب این ژن با فعال کردن بخش‌های دفاعی گیاه بویژه سیستم‌ها و ترکیبات جمع آوری کننده ROSها پاسخ بهتری نسبت به تنش شوری داشته است. میزان بیان ژن‌های *SOS1*، *SOS2* و *SOS3* در ژنوتیپ جهش یافته بیشتر از گیاه مادری هستند. این سه ژن نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش شوری داشته و افزایش بیان آن‌ها موجب افزایش مقاومت گیاه جهش یافته در تنش شوری شده است. با نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان اینگونه استنباط کرد که ژن *SSL6* آرابیدوپسیس در پاسخ این گیاه نسبت به تنش شوری ، تأثیر منفی دارد. به نظر می‌رسد که ژن *SSL6* در بالادست مسیر پاسخ به تنش شوری و در رقابت با آن باشد که سرکوب آن موجب بهبود پاسخ بیوشیمیایی و مولکولی گیاه جهش یافته در پاسخ به تنش شوری شده است. برای درک کامل نقش این ژن، فرابیان ژن *SSL6* و بررسی سایر مسیرهای پاسخ به تنش شوری در لاین‌های جهش یافته ژن *SSL6*، نظیر تأثیر این ژن بر روی فعالیت هورمون ABA و سیستم آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند مفید باشد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

منابع

Amirjani M R. 2011. Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. International Journal of Botany 7: 73-81.

Bates L, Waldren R, Teare I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil 39, 205-207.

Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. The plant cell 7:1099.

Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. 2006. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. In: Setlow JK (Ed.) Genetic engineering Principles and Methods, Springer, Boston, 141-177.

Chung JS, Zhu JK, Bressan, RA, Hasegawa PM, Shi H. 2008. Reactive oxygen species mediate Na+-induced SOS1 mRNA stability in Arabidopsis. The Plant Journal 53: 554-565.

Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder JI. 2014. Plant salt-tolerance mechanisms. Trends in plant science 19: 371-379.

Dong CJ, Liu JY. 2010. The Arabidopsis EAR-motif-containing protein RAP2. 1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. BMC plant biology 10: 47.

Fabbri M, Delp G, Schmidt O, Theopold U. 2000. Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid-synthesizing enzymes. Biochemical and biophysical research communications 271: 191-196.

Fadzilla NAM, Finch RP, Burdon RH. 1997. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. Journal of Experimental Botany 48: 325-331.

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N. 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. Frontiers in Plant Science 5.

Greenway H, Munns R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Annual review of plant physiology 31: 149-190.

Hanin M, Ebel C, Ngom M, Laplaze L, Masmoudi K. 2016. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. Frontiers in plant science 7.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual review of plant biology 51: 463-499.

Heath RL, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics 125: 189-198.

Jaleel CA, GopiR, Sankar B, Manivannan P, Kishorekumar A, Sridharan R, Panneerselvam R. 2007. Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in Catharanthus roseus seedlings under salt stress. South African Journal of Botany 73: 190-195.

Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li X. 2013. The Salt Overly Sensitive (SOS pathway: established and emerging roles. Molecular plant 6: 275-286.

Julkowska, M. M., and Testerink, C. 2015. Tuning plant signaling and growth to survive salt. Trends in Plant Science 20: 586-594.

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature biotechnology 17: 287-291.

Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Kim K, Agarwal M, Fu X, Huang A, Zhu JK. 2006. The plasma membrane Na+/H+ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 18816-18821.

Katsuhara M, Otsuka T, Ezaki B. 2005. Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in Arabidopsis. Plant Science 169: 369-373.

Kibble NA, Sohani MM, ShirleyN, Byrt C, Roessner U, Bacic A, Schmidt O, Schultz CJ. 2009. Phylogenetic analysis and functional characterisation of strictosidine synthase-like genes in Arabidopsis thaliana. Functional Plant Biology 36: 1098-1109.

Kim JH, Nguyen NH, Jeong CY, Nguyen NT, Hong SW, Lee H. 2013. Loss of the R2R3 MYB, AtMyb73, causes hyper-induction of the SOS1 and SOS3 genes in response to high salinity in Arabidopsis. Journal of plant physiology 170: 1461-1465.

Kovinich N, Kayanja G, Chanoca A, Otegui MS, Grotewold E. 2015. Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in Arabidopsis. Plant signaling & behavior 10: e1027850.

Kuromori T, Takahashi S, Kondou Y, Shinozaki K, Matsui M. 2009. Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. Plant and cell physiology 50: 1215-1231.

Kutchan T. 1989. The cDNA Clone for Strictosidine Synthase from Rauwolfia serpentina: Nucleotide Sequence Determination and Expression in Escherichia coli. Planta Medica 55: 593-594.

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

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

Lange H, Shropshire W, Mohr H. 1971. An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. Plant Physiology 47, 649-655.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods 25: 402-408.

Liu R, Liu Y, Ye N, Zhu G, Chen M, Jia L, Xia Y, Shi L, Jia W, Zhang J. 2014. AtDsPTP1 acts as a negative regulator in osmotic stress signalling during Arabidopsis seed germination and seedling establishment. Journal of experimental botany 66: 1339-1353.

Lotkowska ME, Tohge T, Fernie AR, Xue GP, Balazadeh S, Mueller-Roeber B. 2015. The Arabidopsis transcription factor MYB112 promotes anthocyanin formation during salinity and under high light stress. Plant physiology, 169: 1862-1880.

Martínez-Atienza J, Jiang X, Garciadeblas B, Mendoza I, Zhu JK, Pardo JM, Quintero F J. 2007. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. Plant physiology 143: 1001-1012.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant science 7: 405-410.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in plant science 9: 490-498.

Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant, cell & environment 25: 239-250.

Munns R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. New phytologist 167: 645-663.

Nayyar H. 2003. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. Environmental and experimental botany 50: 253-264.

Olias R, Eljakaoui Z, Li J, DE MORALES PA, MARÍN-MANZANO MC, Pardo JM, Belver A. 2009. The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na^+ between plant organs. Plant, Cell & Environment 32: 904-916.

Østergaard L, Yanofsky MF. 2004. Establishing gene function by mutagenesis in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 39: 682-696.

Pandey R, Agarwal R. 1998. Water stress-induced changes in proline contents and nitrate reductase activity in rice under light and dark conditions. Physiology and Molecular Biology of Plants 4: 53-57.

Rontein D, Basset G, Hanson AD. 2002. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. Metabolic engineering 4: 49-56.

Saneoka H, Moghaieb RE, Premachandra GS, Fujita K. 2004. Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in Agrostis palustris Huds. Environmental and Experimental Botany 52: 131-138.

Schroeder JI, Delhaize E, Frommer WB, Guerinot ML, Harrison MJ, Herrera-Estrella L, Horie T, Kochian LV, Munns R, Nishizawa NK. 2013. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. Nature 497: 60-66.

Shi H, Kim Y, Guo Y, Stevenson B, Zhu JK. 2003. The Arabidopsis SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. The Plant Cell 15: 19-32.

Sohani M, Schenk P, Schultz CJ, Schmidt O. 2009. Phylogenetic and transcriptional analysis of a strictosidine synthase-like gene family in Arabidopsis thaliana reveals involvement in plant defence responses. Plant Biology 11: 105-117.

Tang J, Scarth R, Fristensky B. 2003. Effects of genomic position and copy number of Acyl-ACP thioesterase transgenes on the level of the target fatty acids in Brassica napus L. Molecular Breeding 12: 71-81.

Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. Molecular cell 15: 141-152.

Verslues PE, Batelli G, Grillo S, Agius F, Kim YS, Zhu J, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu JK. 2007. Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H2O2 signaling in Arabidopsis thaliana. Molecular and Cellular Biology 27: 7771-7780.

Wu Y, Ding N, Zhao X, Zhao M, Chang Z, Liu J, Zhang L. 2007. Molecular characterization of PeSOS1: the putative Na+/H+ antiporter of Populus euphratica. Plant molecular biology 65: 1.

Xu GY, Rocha PS, Wang ML, Xu ML, Cui YC, Li LY, Zhu YX, Xia X. 2011. A novel rice calmodulin-like gene, OsMSR2, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in Arabidopsis. Planta 234: 47-59.

Yadav D, Ahmed I, Shukla P, Boyidi P, Kirti PB. 2016. Overexpression of Arabidopsis AnnAt8 alleviates abiotic stress in transgenic Arabidopsis and tobacco. Plants 5: 18.

Yang Q, Chen ZZ, Zhou XF, Yin HB, Li X Xin XF, Hong XH, Zhu JK, Gong Z. 2009. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis. Molecular Plant 2: 22-31.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]

Yang Y, Tang RJ, Jiang CM, Li B, Kang T, Liu H, Zhao N, Ma XJ., Yang L, Chen SL. 2015. Overexpression of the PtSOS2 gene improves tolerance to salt stress in transgenic poplar plants. Plant biotechnology journal 13: 962-973.

Yue Y, Zhang M, Zhang J, Duan L, Li Z. 2012. SOS1 gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K^+/Na^+ ratio. Journal of plant physiology 169: 255-261.

Zhang HX, Blumwald E. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nature biotechnology 19: 765-768.

Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual review of plant biology 53: 247-273.

Zhu JK. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. Current opinion in plant biology 6: 441-445.

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 7, Number 1

Reverse Genetic Application in functional study of *Arabidopsis thaliana* strictosidine synthase Like-6 gene under salt stress

Mohadece Pourkarimi Daryakenari[1], Mohammad Mehdi Sohani[2*] and Amin Abedi[3]

1- M.Sc. graduate student, 2-Associate Professor, 3- PhD graduate student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

*Corresponding Author: msohani@guilan.ac.ir mhdsohani@gmail.com

Abstract

Strictosidine synthase-like (*SSL*) is a group of gene family in the *Arabidopsis thaliana* genome, which their orthologous in other plants, such as *Catharanthus roseus*, are key enzymes in the monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis pathway. Arabidopsis *SSL6* gene, a member of *SSL* family, has been induced significantly by various stresses and signaling molecules. In this study, the reverse genetics approaches (T-DNA insertion) are used to determine the function of the *SSL6* gene in response to the salt stress. The experiment was conducted using a factorial experiment based on the completely randomized design with two factors and three replications. These factors were included two genotypes (Col-0 and *ssl6*) and three NaCl treatments (0 mM, 100mM and 200 mM). Compared with the wild-type, the *ssl6* mutant shows significantly increased proline accumulation, anthocyanin content and reduced malondialdehyde (MDA) content in response to the salt stress. Real-Time PCR analysis revealed that the expression levels of SOS genes were upregulated significantly in *ssl7* compared with the expression in Col-0 in response to 150 mM NaCl at 3 h and 6 h after the treatment. Totally, these results suggest that *SSL6* might have a negative regulatory role in response to salt stress in Arabidopsis.

Key words: Gene Expression, Negatively Regulator, Loss of Function Gene, T-DNA Line

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

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.4.3]