ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰
صفحه ۴۱ - ۳۳

بررسی بیان ژن‌های *P5CS* و *PDH* و میزان پرولین در لاین‌های دابل‌هاپلوئید کلزا (*Brassica napus*) تحت تنش شوری

P5CS and *PDH* expression levels and proline content in rapeseed doubled haploid lines (*Brassica napus*) under salinity stress

احسان شهبازی*[۱]، زهرا خواجه[۲]، محمد مرادی[۳]

۱- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

۳- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

Shahbazi E*[1], Khajeh Z[2], Moradi M[3]

1- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University
2- MSc Graduated Student of Biotechnology, Faculty of Agricultural, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
3- Assistant Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, shoushtar, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: eh_shahbazi@sku.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

چکیده

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که باعث کاهش عملکرد اکثر گیاهان در سراسر جهان می‌شود. گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی از مکانیسم‌های مختلفی از جمله تغییر در بیان ژن‌هایشان و افزایش اسمولیت‌های سازگار مانند پرولین استفاده می‌کنند. در این مطالعه به‌منظور بررسی تاثیر تنش شوری بر بیان ژن‌های *P5CS* و *PDH* و میزان پرولین در گیاه کلزا، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل با سه تکرار در آزمایشگاه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. فاکتور اول شامل سه لاین دابل‌هاپلوئید (متحمل، نیمه متحمل و حساس) و فاکتور دوم دو زمان نمونه‌برداری بود. بعد از اینکه گیاهچه‌ها به مرحله ٤ برگی رسیدند تحت تاثیر شوری ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl قرار گرفتند و در زمان‌های ٦ و ٢٤ ساعت بعد از اعمال تنش نمونه‌برداری صورت گرفت. نتایج بیان ژن *P5CS* حاکی از بیان بیشتر این ژن در لاین حساس در ٦ ساعت بعد از تنش بود ولی در زمان ٢٤ ساعت بعد از تنش میزان بیان این ژن در لاین حساس کاهش یافت ولی بیان این ژن در لاین متحمل به‌شدت افزایش پیدا کرد. مقایسه میانگین نسبی بیان ژن *PDH* نشان داد که لاین حساس در هر دو زمان ٦ و ٢٤ ساعت بعد از تنش افزایش بیان داشت در حالی‌که در لاین نیمه متحمل کاهش بیان مشاهده شد. میزان پرولین در لاین متحمل بیشتر از دو لاین دیگر بود ولی بین لاین‌های نیمه متحمل و حساس از لحاظ میزان پرولین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق بیانگر این است که بیان ژن‌های *PDH* و *P5CR* به‌میزان تحمل گیاه و زمان تنش بستگی دارد. از آن‌جایی‌که در لاین متحمل افزایش نسبتاً بیشتر در بیان ژن *P5CS* و مهار بیشتر فعالیت *PDH* نسبت به لاین حساس مشاهده شد باعث تجمع بالاتر پرولین در رقم متحمل نسبت به حساس شد بنابراین شاید بتوان از پرولین به‌عنوان یک اسمولیت شاخص در شناسائی میزان تحمل به تنش شوری در کلزا استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پرولین دهیدروژناز
تنش شوری
کلزا
P5CS

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.6.4]

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napuse* از خانواده چلیپائیان یکی از محصولات تجاری دانه روغنی مهم جهان محسوب می‌شود . دانه کلزا حاوی حدود ۵۰-۳۵ درصد روغن و ٤٥-۳۵ درصد پروتئین می‌باشد بنابراین از لحاظ اقتصادی مورد توجه می‌باشد روغن کلزا همانند آفتابگردان، سویا و ذرت به‌خاطر داشتن اسیدهای چرب اشباع نشده و بدون کلسترول از ارزش تغذیه‌ای فراوانی برخوردار است (Sharieati and Ghazi-Shahanizadeh 2000; Saadia et al. 2012). شناخت ساختار ژنتیکی صفات مرتبط با عملکرد در کلزا و قابلیت ترکیب مربوط به آن‌ها موجب تسهیل گزینش‌ها و موفقیت پروژه‌های به‌نژادی می‌شود. با اصلاح ژنتیکی کلزا از لحاظ صفات زراعی مهم مانند عملکرد، میزان رشد رویشی، شاخص برداشت و مقاومت به تنش محیطی، این گیاه می‌تواند واجد کلیه عوامل لازم برای تداوم توسعه‌ی سطح زیر کشت و عملکرد در واحد سطح در بسیاری از کشورها و مناطق جهان باشد (Brandle 1989; Sharieati and Ghazi-Shahanizadeh 2000).

شوری خاک یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که کشت و عملکرد گیاهان را به‌شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد (Ren et al. 2020) علاوه بر شوری اولیه که ناشی از فرآیندهای طبیعی می‌باشد اراضی کشاورزی در دهه‌های اخیر به شدت در معرض شوری ثانویه ناشی از کوددهی زیاد و طولانی مدت، آبیاری با آب شور و روش‌های نادرست آبیاری قرار گرفتند (Fan et al. 2017; da Silva et al. 2017)، به‌طوری که در جهان تقریباً ۲۰ درصد از اراضی کشاورزی و نزدیک به ۵۰ درصد اراضی آبیاری شده تحت تاثیر شوری بالا هستند (Fan et al. 2013; Siddiqui et al. 2017) کاهش باران، تبخیر تعرق بالا و عدم زهکشی مناسب از عوامل دیگری هستند که باعث افزایش شوری خاک می‌شوند (Siddiqui et al. 2017). شوری باعث کمبود آب، سمیت یونی و کمبود مواد مغذی برای گیاه می‌شود و این مواد باعث کاهش رشد و عملکرد گیاهان می‌شود و در موارد شدید می‌تواند منجر به مرگ گیاه شود (Ren et al. 2020; Kumar et al. 2003).

پاسخ گیاهان به شوری به نوع گیاه، مرحله‌ی نموی گیاه، شدت و مدت تنش بستگی دارد (Miura and Furumoto 2013). سازگاری گیاهان با تنش‌های محیطی مستلزم تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از جمله تجمع اسمولیت‌ها است که می‌توانند در زمان تنش اسمزی نقش سازگاری ایفا کنند. یکی از پاسخ‌های عمومی و رایجی که گیاهان در ارتباط با تنش اسمزی از خود نشان می‌دهند تجمع اسید آمینه پرولین است. پرولین به‌عنوان یک اسمولیت مهم و شناخته شده می‌باشد که طی تنش در بسیاری از اندام‌های گیاهی تجمع پیدا می‌کند (Lehmann et al. 2010) ولی نقش پرولین در تحمل به تنش‌های محیطی هنوز مشخص نشده است اگر چه مشخص شده است که تجمع پرولین در سلول با تحمل به تنش‌های خشکی و شوری رابطه دارد (Yoshiba et al. 1997). در شرایط تنش شوری تجمع پرولین بیش از سایر اسیدهای آمینه صورت می‌گیرد که احتمالاً می‌تواند در تنظیم اسمزی و حفظ فعالیت آنزیمی گیاه نقش داشته باشد (Ashraf and Foolad 2007). بعضی از محققین افزایش پرولین در شرایط تنش را یکی از معیارهای ایجاد تحمل در گیاه عنوان نمودند. به‌طوری که در شرایط تنش شوری برای ایجاد مقاومت در گیاه و شرکت در فرآیند تنظیم اسمزی میزان تولید پرولین افزایش می‌یابد و نقش حفاظتی را برای پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در شرایط وقوع تنش دارد. در واقع پرولین باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین شده و از به‌هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیم ممانعت می‌کند (Madan at al. 1995; Dar et al. 2016). در مطالعه دیگر نیز تجمع اسمولیت‌هایی نظیر پرولین را جهت افزایش تحمل به شوری در گیاهان خانواده براسیکا معرفی کرده‌اند (Ashraf and McNeilly 2004). ولی در مطالعه Rameeh et al. (2004) تجمع پرولین عامل تحمل نبود بلکه واکنش گیاه نسبت به شوری بود همچنین در مطالعه Poustini et al. (2007) بر اثر تنش شوری میزان پرولین در گندم افزایش یافت اما این افزایش در رقم حساس بیشتر از رقم مقاوم به شوری مشاهده شد که نتیجه گرفتند پرولین نمی‌تواند نقش محافظتی در مقابل تنش شوری داشته باشد.

مطالعه‌ی الگوی بیان ژن یکی از مراحل مهم زیست شناسی مولکولی مدرن است. تجزیه و تحلیل بیان ژن، سبب شناخت بهتر فرآیندهای بیولوژیکی پیچیده، مسیر متابولیکی و سیگنال‌ها می‌شود (Nakashima et al. 2009). در تحقیقی الگوی بیان ۷۰۰۰

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.6.4]

ژن را در پاسخ به تنش خشکی، شوری شدید و سرما در گیاه آرابیدوپسیس مورد بررسی قرار دادند در این بررسی آن‌ها موفق به شناسایی۲۷۷ ژن القا شونده با تنش خشکی، ۵۳ ژن القا شونده با تنش سرما و ۱۹٤ ژن القا شونده با تنش شوری شدند که بیان آن‌ها تحت شرایط تنش بیشتر از ۵ برابر شده بود (Seki et al. 2002). در مطالعه‌ای بیان ژن‌های *OsVP1* و *OsABF1* تحت تیمار آبسزیک اسید در دانه‌ها و گیاهچه‌های جوان برنج القا شد و افزایش بیان این ژن‌ها با تنش در برنج متناسب بود (Shobbar et al. 2008). این نتایج بر نقش مهم آبسزیک اسید در پیام‌رسانی تنش‌های شوری، خشکی و سرما که یکی از نتایج آن توقف رشد است، تأکید می‌کند و به همپوشانی‌های مسیرهای پیام رسانی این تنش‌های شایع محیطی به یکدیگر اشاره می‌نماید. در تحقیقی مشخص شد ژنوم آرابیدوپسیس شامل ٦ ژن *DREB1/CBF* و ۸ ژن *DREB2* است، که ژن‌های *DREB2A* و *DREB2B* در تنش شوری و دهیدراته شدن القا می‌شوند (Nakashima et al. 2009). در گیاهان دو مسیر جهت سنتز پرولین وجود دارد. اولین مسیر از طریق گلوتامات است که گلوتامیک اسید توسط آنزیم پرولین -۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) به گلوتامات سمی‌آلدهاید (GSA) تبدیل شده و این ماده به‌صورت خودبخودی به پرولین -۵-کربوکسیلات (P5C) تبدیل می‌شود در مرحله دوم P5C توسط پرولین-۵-کربوکسیل ردوکتاز (P5CR) به پرولین تبدیل می‌شود (Verbruggen and Hermans 2008). مسیر دوم سنتز پرولین از ارنتین (Orn) توسط آنزیم ارنتین-δ-آمینوترانسفراز (OAT) انجام می شود. اگر چه مسیر اصلی سنتز پرولین در شرایط تنش اسمزی مسیر گلوتامات اسید ولی در گیاهان آرابیدوپسیس تحت تنش شوری فعالیت ارنتین- δ- آمینوترانسفراز نیز افزایش یافت (Roosens et al. 1998; Verbruggen and Hermans 2008). Saadia et al. (2012) با مطالعه دو رقم حساس (Cyclone) و مقاوم (Dunkled) کلزا از نظر بیان ژن‌های ویژه در متابولیسم پرولین، در بافت ریشه و ساقه توسط تیمار با NaCl در دوره‌های متفاوت رشد و از طریق تکنیک RT-PCR دریافتند که هر دو رقم افزایشی در بیان ژن *P5CS1* بعد از القای تنش شوری نشان دادند، به‌نحوی که در رقم مقاوم بیان بالایی را در بافت ریشه ولی در رقم حساس بیان بالایی را در بافت ساقه مشاهده نمودند و کاهش بیان پرولین - دهیدروژناز در هر دو بافت ریشه و ساقه رقم‌های کلزا مشاهده شد، به‌صورتی که کاهش بیان *PDH* در بافت ساقه نسبت به ریشه آشکارتر بود.

با توجه به اینکه عملکرد و زنده ماندن گیاهان همیشه تحت تاثیر تنش‌های محیطی قرار دارد بنابراین تحقیقات در ارتباط با پاسخ گیاهان از نظر ژنتیکی و فیزیولوژیکی و ایجاد گیاهان متحمل به تنش ضروری می‌باشد و از طرفی جهت اصلاح گیاهان نیازمند فهم عمیقی از مکانیسم‌های سلولی و مولکولی و ارتباط آن‌ها با صفات مرتبط با تحمل می‌باشد. با توجه به نقش گیاه کلزا در تامین روغن جهان و از طرفی با توجه به اینکه بیش از ۹۰ درصد روغن خام مورد نیاز کشور به‌صورت واردات تامین می‌شود در این مطالعه به بررسی اثر تنش شوری بر میزان پرولین و بیان ژن‌های پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (*P5CS*) و پرولین دهیدروژناز (*PDH*) در گیاه کلزا به‌وسیله‌ی تکنیک RT-PCR پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای ۱۰۰ لاین دابل‌هاپلوئید کلزا در پتری دیش تحت شرایط اتاقک رشد (١٦ساعت نور/۸ ساعت تاریکی) و با اعمال دو سطح تنش شوری (۵۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) به مدت دو هفته از نظر تحمل به تنش شوری در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند و نهایتاً سه لاین بر اساس صفات مورد بررسی به‌عنوان لاین متحمل(DH-T)، لاین نیمه متحمل (DH-ST) و لاین حساس (DH-S) انتخاب شدند (داده‌ها نشان داده نشده است). لاین‌های انتخابی تحت شرایط گلخانه در دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان در گلدان‌های پنج لیتری حاوی مخلوط خاک، ماسه و کود دامی پوسیده (۱:۱:۲) کشت شدند پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله چهاربرگی و در زمان نیاز آبی، تیمارهای شوری اعمال شد به‌طوری‌که گلدان‌های شاهد با آب‌مقطر و گلدان‌های تیمار با آب حاوی شوری ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl آبیاری شد. سپس در زمان شش و بیست و چهار ساعت پس از اعمال تنش نمونه‌گیری از برگ گیاهان

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.6.4]

صورت گرفت. نمونه‌ها در داخل فویل آلومینیمی قرار گرفته و پس از انجماد در نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- انتقال داده شد.

جهت استخراج کل محتوی RNA از کیت مخصوص استخراج RNA ساخت شرکت GenALL کره جنوبی استفاده شد. مراحل استخراج طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. به‌منظور حذف آلودگی احتمالی ناشی از DNA ژنومی نمونه‌ها با آنزیم DNaseI (فرمنتاز) تیمار شدند.

جهت تعیین کیفیت وکمیت RNA استخراج شده از دو روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد ونانودراپ مدل Thermo NanoDrop 2000c Spectrophotometer استفاده شد.

سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand Cdna Synthesis Kit #K 1622 ساخت شرکت فرمنتاز و طبق دستورالعمل انجام شد. برای اطمینان از ساخت cDNA، واکنشPCR با استفاده از cDNAهای ساخته شده و آغازگرهای ژن مرجع اکتین، انجام شد. برای بررسی میزان بیان ژن‌ها با استفاده از روش Real time PCR طراحی آغازگر مناسب برای ژن‌های مورد نظر از برنامه Primer Quest استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده برای ژن *P5CS*، *PDH*، و ژن کنترل داخلی اکتین (ACT) درجدول ۱ آورده شده است.

اجزای واکنش RT-PCR شامل ٤ میکرولیتر سایبرگرین (HiFi SYBER Mix Plus)، ۲ میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها اختصاصی با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر و ۱۲میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز بود. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر ژن شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ٤۰ چرخه که هر چرخه شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشت)، ۲۰ ثانیه در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد (اتصال پرایمرها) و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (سنتز) بود. پس از انجام واکنش تکثیر داده‌ها به‌صورت Ct (Thershild cycle) استخراج شد و از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به‌منظور محاسبه و مقایسه بیان نسبی ژن‌های مورد نظر استفاده شد (Livak and Schmittgen 2001). به‌منظور استخراج و سنجش پرولین آزاد موجود در نمونه‌ها، برگ‌های گیاهان تحت تنش شوری بعد از ٦ و ٢٤ ساعت جمع‌آوری و استخراج پرولین طبق روش (1973) .Bates et al انجام گرفت. بدین منظور نمونه‌های برگی ابتدا توسط ازت مایع پودر و سپس توسط محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید (مرک، آلمان) به مدت ۵ دقیقه هموژنیزه شد. سپس محلول حاصل به منظور جداسازی مواد رویی با دور rpm ۳۰۰۰ و زمان ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۱ میلی‌لیتر از عصاره رویی با ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال (سیگما آلدریچ، آمریکا) و ۲ میلی‌لیتر اسید نین هیدرین (مرک، آلمان) ۲/۵ درصد به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس بلافاصله به حمام یخ منتقل شد. در نهایت به محلول واکنش ٤ میلی‌لیتر تولوئن (مرک، آلمان) اضافه شد و جذب آن در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان پرولین بر حسب میکروگرم پرولین به ازای گرم وزن تر محاسبه شد.

نتایج

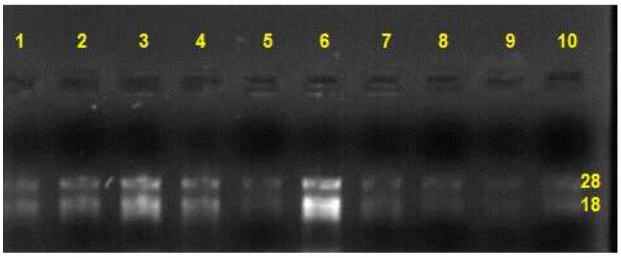
پس از استخراج RNA، جهت تأیید استخراج و سنجش کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی DNA safe stain استفاده شد. حضور باندهای ۱۸S و ۲۸S مربوط به RNA ریبوزومی نشان از صحت استخراج RNA کل بود (شکل ۱). حداکثر مقدار جذب برای نمونه‌ها در طول موج ۲٦۰ نانومتر بود که کیفیت مناسب RNA استخراج شده را نشان می‌داد. محدوده‌ی غلظت نمونه‌های استخراج شده، بین ۳۹۰ تا ۸۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های RT-PCR

شماره دسترسی	ژن	Forward Primer	Reverse Primer	اندازه محصول (bp)
AF314811.1	*P5CS*	CCAGGAGATCAAATGCTATCTTACA	GAACGACCGTGCTTCTGGTA	٤۵۸
EU375567.1	*PDH*	GATAGGTCCCATGGTGGATG	ATCGAAGCAAATCGCTCACT	۳۷۱
FJ529167.1	*ACT*	TGCAGACCGTATGAGCAAAG	AATGCTTGGAGTCCTGCTTG	۱۱۵

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.6.4]



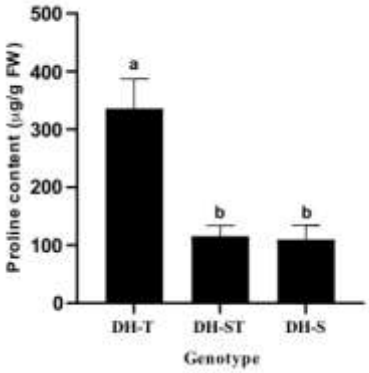
شکل ۱- بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد.

نتایج جدول تجزیه واریانس در سطح شوری ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl نشان داد که اثر لاین و زمان نمونه‌برداری(۸ و ۲٤ ساعت) برای میزان پرولین و بیان ژن‌های *P5CR* و *PDH* در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). همچنین اثرمتقابل لاین × زمان نیز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد که بیانگر این است که بیان ژن‌های *P5CR* و *PDH* در زمان‌های مختلف در لاین‌های مورد بررسی متفاوت بوده است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین بین لاین‌های مختلف نشان داد که لاین متحمل به‌طور متوسط دارای بیشترین میزان پرولین بود (۳۳۵/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) که با دو لاین دیگر تفاوت معنی‌داری داشت و کمترین مقدار پرولین در لاین حساس با ۱۰۹/۸۳ میکروگرم بر گرم وزن تر مشاهده شد و با لاین نیمه متحمل تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲). با توجه به شکل ۳ پاسخ لاین‌های مختلف به تنش شوری در دو زمان ٦ و ۲٤ ساعت متفاوت بود به‌طوری که در لاین متحمل و نیمه متحمل از زمان ٦ به زمان ۲٤ ساعت میزان تجمع پرولین افزایش یافت در حالی‌که در لاین حساس با گذشت زمان از ٦ به ۲٤ ساعت میزان پرولین کاهش معنی‌داری نشان داد.

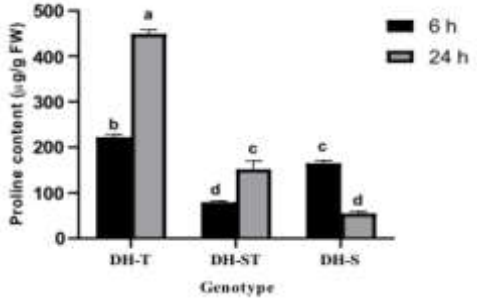
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس برای میزان پرولین و بیان ژن‌های *P5CR* و *PDH* در سطح شوری ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پرولین	ژن *P5CR*	ژن *PDH*
لاین	۲	۹۹۵۹۷**	۱۵۳/۹**	۲۹/۷٦**
زمان	۱	۱۷۹۳٦**	۱٤/۸۲**	۱٤/۸۳**
لاین × زمان	۲	٤۲۷۷٦**	۲٦۰/٥٤**	۱٥/۷۹**
خطا	۱۲	۲٦۱	۰/٦٤	۰/۱۱

**معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد.



شکل ۲- میزان پرولین در سه لاین، متحمل (DH-T)، نیمه متحمل (DH-ST) و حساس (DH-S) کلزا تحت شرایط تنش ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl. میانگین‌های دارای حرف مشترک با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ٥ درصد با هم اختلاف معنی‌درای ندارند.

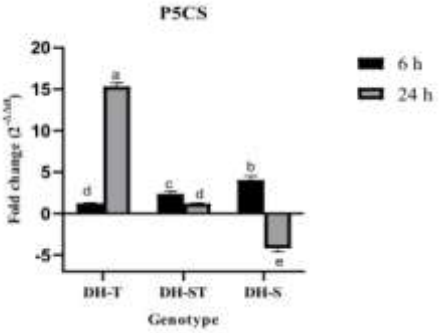


شکل ۳- میزان پرولین در سه لاین، متحمل (DH-T)، نیمه متحمل (DH-ST) و حساس (DH-S) کلزا در زمان‌های ٦ و ۲٤ ساعت پس از تنش ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl. میانگین‌های دارای حرف مشترک با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ٥ درصد با هم اختلاف معنی‌درای ندارند.

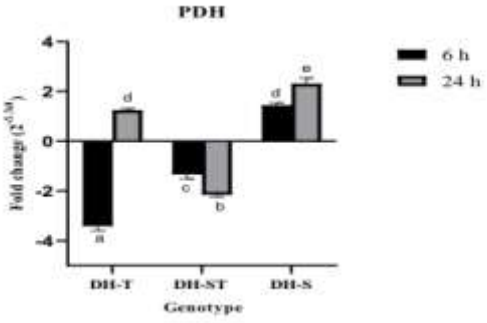
مقایسه میانگین بین لاین‌های مختلف در زمان‌های مختلف برای بیان ژن *P5CS* نشان داد که بیان ژن در لاین متحمل (DH-T) در زمان ۲٤ ساعت پس از تنش نسبت به ٦ ساعت بعد از تنش به‌صورت بسیار معنی‌داری افزایش یافت به‌طوری که میزان بیان این ژن در لاین متحمل در زمان ۲٤ ساعت بعد از تنش ۱٥/۳۳ برابر شد (شکل ٤). در زمان ٦ ساعت بعد از تنش لاین حساس(DH-S) دارای بیشترین بیان ژن بود که با دو لاین دیگر اختلاف معنی‌داری داشت ولی ۲٤ ساعت بعد از تنش بیان این ژن در لاین حساس به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. لاین نیمه حساس (DH-ST) به‌ترتیب ۲/۳٦ و ۱/۲ برابر در زمان‌های ٦ و ۲٤ ساعت بعد از تنش افزایش بیان برای ژن *P5CS* نشان داد

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.6.4]

(شکل ٤). شکل ٥ بیان ژن *PDH* در لاین‌های مختلف کلزا در زمان ٦ و ٢٤ ساعت پس از تنش شوری را نشان می‌دهد. همان‌طورکه در شکل مشخص است پاسخ لاین‌ها به تنش شوری متفاوت بود. در زمان ٦ ساعت بعد از تنش بیان این ژن در لاین متحمل به شدت کاهش یافت همچنین لاین نیمه متحمل نیز کاهش بیان نشان داد ولی در لاین حساس بیان این ژن افزایش یافت.



شکل ٤- میزان نسبی بیان ژن *P5CS* در سه لاین، متحمل (DH-T)، نیمه متحمل (DH-ST) و حساس (DH-S) کلزا در زمان‌های ٦ و ٢٤ ساعت پس از تنش ١٥٠ میلی‌مولار NaCl. میانگین‌های دارای حرف مشترک با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ٥ درصد با هم اختلاف معنی‌درای ندارند.



شکل ٥- میزان نسبی بیان ژن *PDH* در سه لاین، متحمل (DH-T)، نیمه متحمل (DH-ST) و حساس (DH-S) کلزا در زمان‌های ٦ و ٢٤ ساعت پس از تنش ١٥٠ میلی‌مولار NaCl. میانگین‌های دارای حرف مشترک با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ٥ درصد با هم اختلاف معنی‌درای ندارند.

در زمان ٢٤ ساعت بعد از تنش در لاین متحمل بیان ژن *PDH* افزایش یافت همچنین در لاین حساس این افزایش بیان ادامه پیدا کرد ولی لاین نیمه حساس همانند ٦ ساعت بعد از تنش در ٢٤ ساعت بعد از تنش نیز کاهش بیان نشان داد (شکل ٥).

بحث

در بسیاری از آزمایشات در طی تنش شوری و خشکی تغییر در میزان اسید آمینه پرولین گزارش شده است، با این حال هنوز رابطه نزدیک و کاملاً مشخصی بین میزان پرولین و تحمل به تنش‌ها در همه گیاهان مشاهده نشد. در این آزمایش در لاین متحمل در اثر تنش شوری (NaCl) میزان بیشتری پرولین تجمع پیدا کرد. در مطالعه Moradi et al. (2016) میزان بیشتر پرولین در رقم هایولا ٤٠١ (رقم متحمل) نسبت به رقم حساس (RGS003) کلزا مشاهده نمودند و با توجه به همبستگی مثبت بین میزان پرولین و صفاتی نظیر فتوسنتز و وزن خشک بوته نتیجه‌گیری کردند که شاید بتوان از پرولین به‌عنوان یک اسمولیت مطرح در تحمل به تنش شوری کلزا استفاده نمود. علاوه بر این محققین دیگری نیز گزارش نمودند در اثر تنش شوری میزان پرولین افزایش می‌یابد (Kumar et al. 2009).

در این آزمایش پاسخ لاین‌های مختلف نسبت به بیان ژن *P5CS* درطی تنش متفاوت بود به‌طوری که لاین حساس در زمان ٦ ساعت بعد از تنش بیشترین بیان را داشت در نتیجه بیان کننده واکنش سریعتر رقم حساس در مواجه با تنش شوری می‌باشد ولی ٢٤ ساعت بعد از تنش بیان این ژن در لاین حساس به شدت کاهش یافت (شکل ٣). بیان ژن *P5CS* در لاین متحمل در هر دو زمان (٦ و ٢٤ ساعت بعد از تنش) افزایش یافت که شدت بیان در زمان ٢٤ ساعت اختلاف بسیار معنی‌داری با سایر لاین‌ها داشت. در مطالعه‌ی دیگر افزایش شش برابری در فراوانی نسبی mRNA ردوکتاز در ریشه‌های گیاهچه‌های سویا در معرض تنش کوتاه مدت شوری مشاهده شده است (Delauney 1990). علاوه بر این فعالیت ژن *P5CR* در لاین‌های *B. juncea* تحت شرایط تنش محیطی در لاین‌های متحمل افزایش یافت (Madan et al. 1995). همچنین در تحقیق Kumar et al. (2003) فعالیت ژن *P5CR* در هر دو رقم متحمل و حساس توت سفید افزایش یافت ولی این افزایش در رقم متحمل بیشتر بود و تجمع بالاتری از پرولین در لاین متحمل مشاهد شد.

Sripinyowanich et al. (2013) نشان دادند که افزایش بیان ژن‌های *P5CS* و *P5CR* در رقم برنج هندی موجب مقاومت آن به تنش شوری می‌شود. مکانیسم این تحمل انباشت پرولین در

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.6.4]

سلول‌ها و نقش محافظت کنندگی اسمزی آن است. در پژوهش دیگری تحت شرایط دهیدراسیون بیان دو ژن *P5CS* و *P5CR* در آرابیدوپسیس بررسی شد. با بررسی mRNA ژن *P5CR* پس از اعمال تنش افزایش قابل ملاحضه‌ای مشاهده نشد و سطح بیان ژن *P5CR* در مقایسه با ژن *P5CS* خیلی پایین بود. این نتایج پیشنهاد می‌دهد که ژن *P5CS* نقش اساسی‌تری نسبت به *P5CR* در تجمع پرولین تحت شرایط دهیدراسیون در آرابیدوپسیس ایفا می‌نماید نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی ناشی از تنش شوری و خشکی توسط محققین در گیاهان مختلف مانند یونجه و آرابیدوپسیس گزارش شده است (Lehmann et al. 2010; Dar et al. 2016). Yooyongwech et al. (2012) همبستگی مثبتی بین محتوی پرولین و تنظیم ژن *P5CS* مشاهده کردند، در حالی که چنین همبستگی‌ای بین *P5CR* و محتوی پرولین یافت نشد.

عامل مهم دیگری که سطح پرولین در گیاهان را کنترل می‌کند، مسیر کاتابولیکی است. اکسیداسیون پرولین می‌تواند توسط دو آنزیم پرولین اکسیداز و پرولین دهیدروژناز کاتالیز شود (Lehmann et al., 2010; Dar et al. 2016). مهار قابل توجه فعالیت‌های پرولین اکسیداز و پرولین دهیدروژناز تحت شرایط تنش شوری گزارش شده است (Sudhakar et al. 1993; Mattioni et al. 1997). در این مطالعه، بیان ژن *PDH* در لاین حساس در هر دو زمان افزایش یافت و لذا با توجه به افزایش بیان ژن *P5CR* در زمان ٦ ساعت بعد از تنش احتمالاً پرولین سنتز شده توسط ژن *PDH* تجزیه شد و باعث کاهش پرولین در لاین حساس نسبت به سایر لاین‌ها شد. این آنزیم تحت تنظیم غلظت بالای پرولین قرار داشته و افزایش غلظت سوبسترا موجب افزایش بیان آن در سطح سلولی می‌شود، در تنش شوری میزان پرولین به شدت افزایش یافته و به‌نظر می‌رسد این افزایش موجب افزایش بیان ژن رمزکننده پرولین دهیدروژناز در سلول شده است (Kishitani et al. 2003). بعضی از تحقیقات دیگر عدم همبستگی بین تجمع پرولین و بیان ژن پرولین دهیدروژناز را گزارش نمودند (Treichel 1986; Lutts et al. 1999). بیان ژن *PDH* در لاین متحمل در زمان ٦ ساعت بعد از تنش کاهش یافت که احتمالاً به‌خاطر سیستم دفاعی لاین متحمل در مقابل تنش NaCl می‌باشد همچنین بیان ژن *PDH* در لاین نیمه متحمل در هر دو زمان کاهش یافت. به‌طور مشابه در مطالعه دیگر فعالیت پرولین دهیدروژناز در هر دو رقم متحمل و حساس تحت تنش شوری کاهش می‌یابد ولی درجه‌ی کاهش در فعالیت دهیدروژناز در رقم متحمل نسبت به حساس نسبتاً بالاتر بود (Kumar et al. 2003). نتایج حاصل تایید کننده این مطلب می‌باشد که با کاهش میزان بیان پرولین دهیدروژناز مقاومت به تنش شوری از طریق تجمع پرولین در گیاه افزایش می‌یابد ولی با افزایش میزان پرولین دهیدروژناز مقاومت به تنش شوری از طریق حذف پرولین در گیاه کاهش می‌یابد. در اغلب پژوهش‌ها در ابتدای اعمال تنش بیان این ژن کاهش یافته ولی با ادامه تنش گیاه برای جلوگیری از اثرات سمی انباشت پرولین به بیان ژن پرولین دهیدروژناز اقدام می‌کند، با این حال بیان این ژن در ابتدای اعمال تنش کاهش می‌یابد تا امکان تجمع پرولین فراهم شود که این امر مؤید نتایج این پژوهش در ارتباط با لاین متحمل می‌باشد. Zhang et al. (2010) نیز در پژوهش خود بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم پرولین را در جو بررسی کردند این پژوهشگران نیز کاهش بیان ژن *PDH* را در ابتدای اعمال تنش مشاهده کردند ولی با افزایش زمان اعمال تنش و غلظت پرولین آزاد، بیان این ژن افزایش یافت.

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بیان ژن‌های *PDH* و *P5CR* علاوه بر اینکه به میزان تحمل گیاه بستگی دارد به زمان تنش نیز بستگی دارد. به‌طور کلی در لاین متحمل افزایش نسبتاً بیشتر در بیان ژن *P5CS* (افزایش سرعت سنتز پرولین) و مهار بیشتر فعالیت پرولین دهیدروژناز (مقدار نسبتاً پایین‌تر اکسیداسیون پرولین) مشاهده شد ولی در لاین حساس بیان ژن پرولین دهیدروژناز افزایش یافت که بیانگر تجمع بالاتر پرولین آزاد در رقم متحمل نسبت به حساس است بنابراین شاید بتوان از پرولین به‌عنوان یک اسمولیت مطرح در تحمل به تنش شوری کلزا استفاده نمود.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.6.4]

منابع

Ashraf M, McNeilly T (2004) Salinity tolerance in Brassica oilseeds. Critical Reviews in Plant Sciences 23: 157-74.

Ashraf MF, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-16.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Brandle JE, McVetty PB (1989) Heterosis and combining ability in hybrids derived from oilseed rape cultivars and inbred lines. Crop Science 29: 1191-4.

Da Silva CJ, Fontes EP, Modolo LV (2017) Salinity-induced accumulation of endogenous H_2S and NO is associated with modulation of the antioxidant and redox defense systems in *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana. Plant Science 256: 148-59.

Dar MI, Naikoo MI, Rehman F, Naushin F, Khan FA (2016) Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies (pp. 155-166). Springer, New Delhi.

Delauney AJ, Verma DP (1990) A soybean gene encoding Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. Molecular and General Genetics MGG 221: 299-305.

Fan H, Ding L, Xu Y, Du C (2017) Seed germination, seedling growth and antioxidant system responses in cucumber exposed to Ca $(NO_3)_2$. Horticulture, Environment, and Biotechnology 58: 548-59.

Fan HF, Du CX, Ding L, Xu YL (2013) Effects of nitric oxide on the germination of cucumber seeds and antioxidant enzymes under salinity stress. Acta Physiologiae Plantarum 35: 2707-19.

Jones RW Storey R in: LG Paleg A (1981) Aspinall (Eds.), The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants, Academic Press, Sydney pp. 171–204.

Kishitani S, Takanami T, Suzuki M, Oikawa M, Yokoi S, Ishitani M, Alvarez-Nakase AM, Takabe T, Takabe T (2000) Compatibility of glycinebetaine in rice plants: evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley. Plant, Cell & Environment 23: 107-14.

Kumar G, Purty RS, Sharma MP, Singla-Pareek SL, Pareek A (2009) Physiological responses among Brassica species under salinity stress show strong correlation with transcript abundance for SOS pathway-related genes. Journal of Plant Physiology 166: 507-520.

Kumar SG, Reddy AM, Sudhakar C (2003) NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. Plant Science 165: 1245-51.

Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D (2010) Proline metabolism and transport in plant development. Amino Acids. 39: 949-62.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method 25: 402-408.

Lutts S, Majerus V, Kinet J M (1999) NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. Physiologia Plantarum 105: 450-458.

Madan S, Nainawatee HS, Jain RK, Chowdhury JB (1995) Proline and proline metabolising enzymes in *in-vitro* selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. Annals of Botany 76: 51-57.

Mattioni C, Lacerenza NG, Troccoli A, DeLeonardis M, Di Fonzo N (1997) Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. Physiologia Plantarum 101: 787-792.

Miura K, Furumoto T (2013) Cold signaling and cold response in plants. International Journal of Molecular Sciences 14: 5312-5337.

Moradi M, Ebrahimei A, Ghodrati G (2016) Evolution effect of salt stress, growth, physiological characteristic and seed yield of spring canola cultivars (*Brassica napus* L). Quarterly Journal of Plant Production Science 2: 1-12. (In Farsi).

Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. Plant Physiology 149: 88-95.

Poustini K, Siosemardeh A, Ranjbar M (2007) Proline accumulation as a response to salt stress in 30 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt tolerance. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 925-34.

Rameeh V, Rezai A, Saeidi G (2004) Study of salinity tolerance in rapeseed. Communications in Soil Science and Plant Analysis 35: 2849-66.

Ren Y, Wang W, He J, Zhang L, Wei Y, Yang M (2020) Nitric oxide alleviates salt stress in seed germination and early seedling growth of pakchoi (*Brassica chinensis* L.) by enhancing physiological and biochemical parameters. Ecotoxicology and Environmental Safety 187: 1-10.

Roosens NH, Thu TT, Iskandar HM, Jacobs M (1998) Isolation of the ornithine-δ-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 117: 263-71.

Saadia M, Jamil A, Akram NA, Ashraf M A (2012) study of proline metabolism in canola (*Brassica napus* L.) seedlings under salt stress. Molecules 17: 5803-15.

Seki, M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. The Plant Journal 31: 279-292.

Shariati SH, Ghazi-Shahanizadeh P (2000) Rapeseed. Agricultural Education Press, Tehran, Iran.

Shobbar ZS, Oane R, Gamuyao R, De Palma J, Malboobi MA, Karimzadeh G, Javaran MJ, Bennett J (2008) Abscisic acid regulates gene expression in cortical fiber cells and silica cells of rice shoots. New Phytologist. 178: 68-79.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.6.4]

Siddiqui MH, Alamri SA, Al-Khaishany MY, Al-Qutami MA, Ali HM, Hala AR, Kalaji HM (2017) Exogenous application of nitric oxide and spermidine reduces the negative effects of salt stress on tomato. Horticulture, Environment, and Biotechnology 58: 537-47.

Sripinyowanich S, Klomsakul P, Boonburapong B, Bangyeekhun T, Asami T, Gu H, Buaboocha T, Chadchawan S (2013) Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): the role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environmental and Experimental Botany 1: 94-105.

Sudhakar C, Reddy PS, Veeranjaneyulu K (1993) Effect of salt stress on the enzymes of proline synthesis and oxidation in green gram (*Phaseolus aureus* Roxb.) seedlings. Plant physiology 141: 621-623.

Treichel S (1986) The influence of NaCl on Δ1-pyrroline-5-carboxylate reductase in proline accumulating cell suspension cultures of Mesembryanthemum nodiflorum and other halophytes. Physiologia Plantarum 67: 173-181.

Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. Amino acids 35: 753-759.

Yooyongwech S, Cha-um S, Supaibulwatana K (2012) Proline related genes expression and physiological changes in indica rice response to water-deficit stress. Plant Omics 5: 597.

Yoshiba Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki, K, Shinozaki, K (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. Plant and Cell Physiology 38: 1095-1102.

Zhang H, Irving LJ, McGill C, Matthew C, Zhou D, Kemp P (2010) The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator. Annals of Botany 106: 1027-1035.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.6.4]