

پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی دو رقم بومی کشت شده (لندریس) گندم نان به تنش شوری در دوره‌های زمانی مختلف

نرجس فتاحی^۱، حمید سبحانین^{۲*}، خدیجه رضوی^{۳*}، تهمنه لهراسبی^۴، غلامرضا بخشی خانیکی^۵

۱. دانشجوی دکتری زیست‌شناسی فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۳. استادیار، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

۴. استادیار، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

۵. استاد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۸)

Biochemical and molecular responses of two native landraces of bread wheat to salt stress at different time periods

Narjes Fatahi¹, Hamid Sobhanian^{2*}, Khadijeh Razavi^{3*}, Tahmineh Lohrasebi⁴, Gholamreza Bakhshi-Khaniki⁵

1. Ph.D. Candidate of Plant Physiology, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Agriculture Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Agriculture Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

5. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

(Received: Dec. 23, 2020 - Accepted: Mar. 16, 2020)

Abstract

Environmental stresses have an irreversible effect on the production of bread wheat (*Triticum aestivum* L.), one of the most important crop plants. On the other hand, AP2/ERF members are the most important transcriptional regulators that influence plant growth and response to biotic and abiotic stresses. To evaluate the mechanism of salt stress tolerance in wheat the activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and catalase in two tolerant wheat landraces (3623 and 3625) under salinity were investigated by completely randomized factorial experiment at control and 250 mM salinity in three replications. Seedlings were sampled at 0, 1, 3, 6, 12 and 24 h and 10 days after stress. The activity of enzymes was measured in the root and shoot of plants. The AP2-21 nucleotide sequence was extracted from the NCBI database and primers were designed and the gene fragment was isolated from wheat and then cloned and sequenced and confirmed by the presence of AP2 conserved domain. *TaAP2-21* expression was evaluated by qPCR using specific primers and β -actin housekeeping genes. The results showed a significant difference in enzyme activity at different times compared to control in both tissues of both landraces and the highest was observed in short and medium-term stresses, however, apparently in long term stress the antioxidant mechanism of the enzymes is more active in 3623 than in 3625. Gene expression decreased significantly under salinity in both tissues. The *TaAP2-21* gene is probably one of the inhibitors of the transcription of saline responsive genes and causes salt sensitivity in wheat.

Keywords: AP2 transcription factor, bread wheat, oxidative stress, salinity.

چکیده

تنش‌های محیطی اثرات جبران‌ناپذیری بر تولید گندم نان (*Triticum aestivum* L.) که از مهمترین محصولات زراعی است می‌گذراند. از طرفی اعضا خانواده AP2/ERF از مهمترین تنظیم‌کنندگان رونویسی هستند که بر رشد و پاسخ گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده موثرند. برای ارزیابی سازوکار تحمل تنش شوری در گندم فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسیددیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز و کاتالاز در دو لندریس متحمل گندم (۳۶۲۳ و ۳۶۲۵) تحت شوری با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دو سطح شاهد و ۲۵۰ میلی مولار شوری در سه تکرار انجام شد. از گیاهچه‌ها در زمان‌های صفر، ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت و ۱۰ روز پس از تنش نمونه‌برداری شد. فعالیت آنزیم‌ها در ریشه و اندام هوایی گیاهان اندازه‌گیری شد. توالی نوکلئوتیدی AP2-21 از پایگاه NCBI استخراج و آغازگرها طراحی و قطعه ژن از گندم جدا، همسانه‌سازی و توالی‌یابی و با حضور دومین حفاظت شده AP2 تأیید شد. تغییرات بیان *TaAP2-21* با روش PCR کمی و با استفاده از آغازگرهای ویژه و ژن بتا اکتین بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار فعالیت آنزیم‌ها در زمان‌های مختلف نسبت به شاهد در هر دو بافت هر دو رقم بود و بیشترین تفاوت در تنش‌های کوتاه و میان‌مدت مشاهده شد با این‌حال ظاهراً در تنش بلندمدت سازوکار آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌ها در ۳۶۲۳ فعالتر از ۳۶۲۵ عمل می‌کنند. بیان ژن تحت شوری در بافت‌های هر دو لندریس کاهش معنی‌داری داشت. احتمالاً ژن *TaAP2-21* یکی از عوامل بازدارنده رونویسی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به شوری بوده و باعث ایجاد حساسیت به شوری در گندم می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسیداتیو، شوری، عامل رونویسی AP2، گندم نان.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum*) از گیاهانی است که در بسیاری از نواحی جهان کشت می‌شود و بازده و کیفیت بذر آن با تنش‌های محیطی محدود می‌شود (Baloglu *et al.*, 2014a). امروزه امنیت غذایی به تولید بیشتر سه غله اصلی گندم، برنج و ذرت وابسته است. از آنجاکه گندم یکی از مهمترین غلات در دنیا است و گیاهی نیمه متحمل نسبت به تعدادی از تنش‌های محیطی محسوب شده و از منابع اصلی تامین کالری و پروتئین (تقریباً ۸۵٪ کالری و ۸۲٪ پروتئین) مورد نیاز جمعیت جهان می‌باشد (Baloglu *et al.*, 2014b)، در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان از طریق دیم یا آبی کشت می‌شود. یکی از مشکلات عمده تولید گندم در ایران پایین بودن عملکرد آن است. این مشکل از عوامل محیطی و عوامل مدیریتی تولید این محصول ناشی می‌شود. از عوامل محیطی می‌توان به تنش شوری به عنوان یکی از عوامل اصلی کاهش تولید اشاره کرد. تا کنون تلاش‌های قابل توجهی در زمینه درک سازوکارهای تحمل شوری در گیاهان زراعی با هدف نهایی بهبود و ثبات عملکرد در خاک‌های شور صورت گرفته است. افزایش تحمل شوری برای تولید پایدار غذا در بسیاری از نقاط دنیا ضروری می‌باشد. تنش شوری به دو دلیل برای تولید محصول مضر می‌باشد، اول آنکه تنش شوری جذب آب از طریق ریشه‌ها را مهار می‌کند و دیگر آنکه برخی از یون‌های سمی جذب گیاه می‌شوند. در گیاهان سازوکارهای مختلفی برای سازگاری با تنش شوری تکامل یافته است که از آن جمله می‌توان به تجمع محافظت کننده‌های اسمزی و تنظیم افزایشی مسیرهای پاسخ به تنش از طریق عوامل رونویسی اختصاصی اشاره کرد. برخی از این مسیرها به هورمون گیاهی آبسزیک اسید وابسته‌اند در حالیکه سایر مسیرها مستقل از آن هستند. اکثر گونه‌های زراعی به‌طور نسبی به شوری حساسند به‌طوری‌که

قادر به ادامه حیات در زمین‌های مزروعی که از طریق آبیاری و شست‌وشوی بیش از حد شور شده‌اند، نمی‌باشند. از این رو یکی از اولویت‌های مهم در اصلاح نژاد زراعی، افزایش تحمل به شوری در گیاهان زراعی است (Qin *et al.*, 2014).

تنش‌های محیطی تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل را در بخش‌های مختلف سلول مانند کلروپلاست، میتوکندری و فضای آپوپلاستی تحریک کرده و سبب تخریب اکسیداتیو در گیاه شده و در نتیجه از رشد و تولید بذر باکیفیت ممانعت به‌عمل می‌آورد. گیاهان از سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی برای از بین بردن ROS در سلول‌ها استفاده می‌کنند. اجزای آنزیمی شامل چندین آنزیم آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) و اجزای غیرآنزیمی شامل بافرهای ردوکس مانند آسکوربات و گلوتاتیون، توکوفرول، کاروتنوئیدها و ترکیبات فنولی است. در گیاه آراییدوپسیس حداقل ۱۵۲ ژن در تنظیم سطح ROS تحت تنش‌های محیطی نقش دارند. بنابراین یک سیستم آنزیمی پیچیده در گیاهان برای از بین بردن ROS اضافی وجود دارد و از گیاهان در مقابل تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند (Acosta-Motos *et al.*, 2017).

ROS گونه‌های اکسیدکننده اکسیژن به‌ویژه رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) و رادیکال اکسیژن siglet (1O_2) هستند. این ترکیبات اکسید کننده‌های بسیار قوی هستند که می‌توانند تقریباً با همه اجزا و ماکرومولکول‌های سلول‌های زنده واکنش دهند و سبب تخریب شدید لیپید، پروتئین و نوکلئیک اسید شوند. در رشد طبیعی گیاه تعادلی میان تشکیل ROS و سم‌زدایی وجود دارد اما این تعادل در تنش شوری به هم می‌ریزد به‌طوری‌که تشکیل ROS بیشتر از سم‌زدایی آن صورت گرفته و منجر به تخریب اکسیداتیو، تخریب غشاهای سلولی و مرگ

می‌باشند (Zhuang *et al.*, 2011). نقش اساسی عوامل رونویسی در بیان ژن از طریق تنظیم بیان ژن‌های پایین دست با عنوان عناصر *trans-acting* با اتصال اختصاصی به عناصر *cis-acting* در پیش‌برهای ژن‌های هدف اعمال می‌شود (Mizoi *et al.*, 2012). ژن‌های رمزکننده عوامل رونویسی WRKY، NAC، MYB، AP2/ERF و bZIP بزرگترین خانواده‌های تنظیم کننده رونویسی هستند که در فرایندهای فیزیولوژیکی رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان دخالت دارند (Baloglu *et al.*, 2014a). شناسایی نیمرخ بیانی این عوامل در فهم پاسخ گونه‌های مختلف گندم به تغییرات شدید محیطی بسیار مهم است (Baloglu *et al.*, 2014a). AP2/ERF یکی از بزرگترین خانواده‌های عوامل رونویسی در گیاهان هستند که دارای حداقل یک ناحیه AP2 هستند. بر اساس تعداد نواحی AP2 و حضور نواحی دیگر، این خانواده بزرگ را می‌توان به خانواده‌های کوچکتر ERF، AP2، RAV، و SOLOIST طبقه‌بندی کرد. خانواده ERF شامل پروتئین‌هایی است که یک ناحیه AP2 دارند در حالیکه خانواده ژنی AP2 رونویسی از ژن-هایی با دو ناحیه AP2 را رمز گذاری می‌کند. اما خانواده ژنی RAV یک ناحیه AP2 و یک ناحیه B3 دارند و ناحیه B3 یک ناحیه متصل‌شونده به DNA است که در گیاهان حفاظت شده است (Thamilarasan *et al.*, 2014). پروتئین‌های خانواده AP2/ERF از ۶۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند که از سه β -sheet و یک α -helix تشکیل شده‌اند (Yamasaki *et al.*, 2013; Licausi *et al.*, 2013). محل اتصال به DNA در پروتئین‌های این خانواده بزرگ در موقعیت اسید آمینه‌های ۱۴ و ۱۹ می‌باشد که در خانواده DREB به ترتیب والین و گلوتامیک اسید بوده و در خانواده ERF به ترتیب آلانین و آسپارتیک اسید می‌باشد (Pandey *et al.*,

2017). با این حال مفهوم تنش اکسیداتیو مورد ارزیابی دوباره قرار گرفته و اصطلاح پیام‌رسانی اکسیداتیو یا ردوکس پدید آمده است. به این معنی که تولید ROS یکی از اجزای مهم شبکه ارسال پیام است که گیاه برای نمو و پاسخ به چالش‌های محیطی به کار می‌گیرد (Sairam *et al.*, 2002, Jan *et al.*, 2017). فعالیت زیاد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش شوری می‌تواند مانع تخریب ناشی از تنش شده و منجر به مقاومت به شوری شود (Jan *et al.*, 2017). تحت تنش شوری، اکسیژن به‌عنوان پذیرنده نهایی الکترون به جای CO₂ در فرایند فتوسنتز به کار می‌رود که منجر به افزایش تولید ROS، آن هم بیشتر از ظرفیت سم‌زدایی گیاهان می‌شود (Jan *et al.*,

2017). در گیاهان مختلف، تنش، بیان ژن‌های متفاوتی را القا می‌کند که به دو دسته تقسیم می‌شوند؛ دسته اول ژن‌های عملکردی هستند که به‌طور مستقیم با تنش مقابله می‌کنند، مانند پروتئین‌های محافظ اسمزی؛ دسته دوم ژن‌های تنظیمی هستند که شامل عوامل رونویسی می‌شوند و در تنظیم بیان ژن‌ها دخالت دارند (Zhuang *et al.*, 2011).

عامل رونویسی پروتئینی است که به توالی اختصاصی از DNA متصل می‌شود و متعاقباً بیان ژن را کنترل می‌کند. این پروتئین‌ها دارای ویژگی‌هایی مانند: اتصال به ناحیه‌ای نزدیک ژن و به سایر پروتئین‌ها بصورت کوفاکتور هستند که موجب تغییرات بعد از ترجمه شده و تنظیمات را انجام می‌دهند (Zhuang *et al.*, 2011; Sohn *et al.*, 2006). اعضا خانواده ژنی AP2/ERF به عنوان گره در شبکه تنظیمی در گیاهان عمل می‌کنند.

عوامل رونویسی خانواده AP2/ERF به همراه بسیاری از اعضای خانواده‌های ژنی دیگر در تنظیم الگوهای بیان ژن‌ها نقش اساسی بر عهده داشته و مسئول پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی

(2014).

در پژوهش حاضر برای انتخاب رقم بومی متحمل‌تر به شوری از میان دو لندریس^۱ ۳۶۲۵ و ۳۶۲۳ که در پژوهش‌های پیشین از بین ۱۰۰ ژنوتیپ، رقم و لندریس برای طرح‌های اصلاحی آتی انتخاب شده بودند (منتشر نشده است)، بیان ژن *TaAP2-21* از خانواده ژنی AP2/ERF به همراه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز طی تنش شوری بررسی شد. با توجه به نقش مهم گیاهان زراعی متحمل به تنش‌های غیرزیستی در توسعه کشاورزی پایدار انتظار می‌رود از لندریس منتخب بتوان در طرح‌های اصلاح نژاد آتی استفاده کرد. همچنین این احتمال است که با توجه به تغییرات بیان ژن *TaAP2-21* در بافت‌های گیاهان تحت تنش شوری بتوان به‌عنوان ژن کاندیدا در مطالعات توسعه نشانگرهای مولکولی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار

دو رقم بومی کشت شده گندم نان با نام‌های کلکسیون ۳۶۲۳ و ۳۶۲۵ از مجموعه ۱۸۰ رقم، ژنوتیپ و لندریس که موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه بذر و نهال، بخش غلات در اختیار گروه گذاشته شده بود با روش‌های غربالگری زراعی، مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی ارزیابی و انتخاب شدند. بذرهای به‌مدت دو ساعت در آب مقطر استریل روی شیکر قرار داده شدند. سپس ظرف حاوی بذرهای به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد و در حمام آب‌گرم قرار گرفت. بذرهای در محلول ساکارز ۲٪ به‌مدت یک ساعت قرار گرفته و هم زده شدند. سپس بذرهای دو بار با آب مقطر استریل مخلوط و هر بار به‌مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده

شدند. پس از آن بذرهای در زیر هود لامینار به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ قرار داده شدند و مجدداً دو بار شست‌وشو با آب مقطر انجام شد. سپس بذرهای به‌مدت ۱۲ دقیقه در محلول هیپوکلیت سدیم ۲٪ و Tween ۲۰/۰٪ قرار گرفته و بیش از شش بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. برای رفع آلودگی احتمالی قارچی بذرهای از قارچ‌کش بنومیل و به‌مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. سپس بذرهای روی کاغذ صافی استریل در پتری دیش قرار گرفته و تا ظهور ریشه‌چه در اتاق سرد (دمای چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. پس از جوانه‌زنی، پنج بذر در هر گلدان پلاستیکی (به قطر هفت سانتی‌متر) حاوی مخلوطی از ماسه و پرلیت به نسبت ۱:۴ کاشته و گلدان‌ها به فیتوترون منتقل شدند. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار در هر بار کشت برای هر یک از دو لندریس انجام شد. سه گلدان برای هر لندریس که تنش شوری ندیده و با محلول غذایی جانشون آبیاری شده بودند به‌عنوان گیاهان شاهد (بدون تیمار) در نظر گرفته شدند. گلدان‌ها تا رسیدن به مرحله دو برگگی به فاصله هر دو روز یک‌بار با آب مقطر استریل آبیاری شدند. با ظهور مرحله دو برگگی هر دو روز یک‌بار با محلول غذایی جانشون تغذیه گیاهان ادامه یافت. زمانی که دانه رست‌ها به مرحله ۳برگی رسیدند تیمار شوری ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl همراه با محلول جانشون اعمال شد. تیمار شوری با ۵۰ mM NaCl آغاز شد و سپس هر ۲ روز یک‌بار به ترتیب به ۱۰۰ mM، ۱۵۰ mM، ۲۰۰ mM و در نهایت به ۲۵۰ mM از محلول NaCl افزایش یافت.

نمونه‌گیری

بخش‌هایی و ریشه گیاهچه‌ها در زمان‌های ۰، ۱، ۳، ۶، ۱۲ ساعت (تنش کوتاه‌مدت)، ۲۴ ساعت (تنش میان‌مدت) و ۱۰ روز (تنش بلندمدت) پس از اعمال شوری ۲۵۰ mM NaCl برداشت‌شده و بلافاصله برای آزمایش‌های بعدی در ازت مایع منجمد شده و به دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و نگهداری شدند.

آنزیمی است که برای تجزیه یک میکرومول H_2O_2 در هر دقیقه و به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین در ۲۵ درجه سانتی‌گراد موردنیاز است (Aebi, 1984).

آسکوربات‌پراکسیداز (APX)

فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز بر اساس کاهش در میزان جذب آسکوربات اکسیدشده در دقیقه و به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در طول موج ۲۴۰nm تعیین شد (Nakano and Asada, 1981).

مقدار جذب در هر سه آنزیم نامبرده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر analytikjena مدل SPECORD 210 اندازه‌گیری شد.

طراحی آغازگرها

اولین قدم در طراحی آغازگر یافتن توالی ژن مورد نظر بود. چون ژن *AP2-21* به یک خانواده ژنی کمتر شناخته تعلق دارد، ابتدا برای همسانه‌سازی ژن از لندریس‌های گندم نان آغازگرهای مناسب بر اساس انتهای ۳ به کمک داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی (NCBI) National Center for Biotechnology Information و با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo7 و premier5 طراحی شد. در این پژوهش از آغازگرهای اختصاصی ژن خانه دار بتا-کتینین (β -Actin) برای نرمال‌سازی داده‌های PCR کمی استفاده شد (جدول‌های ۱ و ۲).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

استخراج پروتئین کل از بخش‌های هوایی و ریشه گیاهان تحت تیمار شوری به روش Laemmeli (۱۹۷۰) انجام گرفت: ۵۰ میلی‌گرم از بافت تر از دو بخش ریشه و اندام‌هوایی دانه رسته‌های گندم در بافر استخراج شامل $NaCl$ 0.5M، Tris-HCl 0.1M pH 8، EDTA 5mM، و PMSF 1M هموزنیزه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به‌مدت پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. روشناور حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار پروتئین کل براساس روش برادفورد (Bradford, 1976) محاسبه شد.

آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) طبق روش Giannopolitis and Ries (۱۹۷۷) سنجیده شد. یک واحد آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که از احیای نوری NBT به مقدار ۵۰٪ ممانعت می‌کند. بنابراین فعالیت این آنزیم برحسب واحد آنزیم به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم کاتالاز از طریق اندازه‌گیری میزان تجزیه H_2O_2 در طول موج ۲۴۰nm بر طبق روش (Aebi, 1984) سنجیده شد. یک واحد از فعالیت آنزیم مقدار

جدول ۱. توالی آغازگرها برای همسانه‌سازی ژن *TaAP2-21* از گندم نان

Name	Sequence (5'-3')	PCR Product length (bp)	Tm (°C)	GC (%)
F: TaAP2-21	GTCAGAGGCCAACGATGCAA		59.2	55
R: TaAP2-21	TTCTGCCTCCTTGTAACCTCT	720	59.3	47.6

جدول ۲. توالی آغازگرهای مورد استفاده در PCR کمی

Name	Sequence (5'-3')	Fragment length (bp)	Tm (°C)	GC (%)
F: TaAP2-21	GTCAGAGGCCAACGATGCAA		64.2	50
R: TaAP2-21	TTCTGCCTCCTTGTAACCTCT	90	63.4	59.1
F: B-Actin	GACCGTATGAGCAAGGAG AT		60	57
R: B-Actin	CAATCGCTGGACCTGACTC	190	60	57

تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک و تأیید وجود دومین AP2 با نرم‌افزارهایی همچون BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI، SMART، Pfam و انجام شد.

واکنش PCR کمی

PCR کمی با استفاده از دستگاه MIC (استرالیا) و در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر master mix، ۲ پیکومول از هر یک از آغازگرهای پیشرو و برگشتی، cDNA با رقت ۰/۱ و آب مقطر تیمار شده با DEPC و طبق برنامه: مرحله واسرشته‌سازی اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، در ۴۰ چرخه، مرحله واسرشته‌سازی دوم ۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه در ۶۴ درجه سانتی‌گراد و تکثیر ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. از ژن β -Actin برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 22) و از طریق Two-way ANOVA برای دو متغیر پیش‌بینی‌شده زمان و وارپته انجام شد. اختلاف میان مقادیر میانگین با استفاده از آزمون Duncan در سطح احتمال معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد. نمودارها با استفاده از Excel (Office 2016) ترسیم شد و مقادیر میانگین برای سه تکرار در هر وارپته با انحراف معیار (SD) مشخص شد. تمام واکنش‌های PCR در شش تکرار انجام شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌های PCR کمی از نرم‌افزار Rest براساس مقدار ΔC_t استفاده شد.

نتایج و بحث

از آنجاکه تغییر سطح ROS در گیاهان تحت تنش از

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA کل از بافت گیاهی به روش کیت Zymoreaserch,) Quick-RNA MiniPrep (USA) انجام و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین و غلظت آن با دستگاه نانودرآپ سنجیده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA Synhtesis System (Thermo, USA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

جداسازی قطعه ژن TaAP2-21 از گیاه گندم و تعیین توالی آن

برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR به صورت: دمای اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه با دماهای ۹۴، ۵۳ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد هریک به مدت یک دقیقه و دمای نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. پس از انجام PCR نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. برای خالص‌سازی محصول PCR و آماده کردن آن برای همسانه‌سازی از کیت بازیابی (Genet Bio, Korea) استفاده شد.

محصول خالص‌سازی‌شده PCR درون ناقل PTG19 (Vivantis, Malaysia) مطابق دستورالعمل کیت همسانه‌سازی و همسانه‌های سفید نوترکیب با روش غربالگری سفید/آبی در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و نیز با کلنی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن تأیید شدند. از همسانه‌های نوترکیب تأیید شده استخراج پلازمید با استفاده از کیت استخراج پلازمید GenetBio(Genet Bio, Korea) انجام شده و توالی‌یابی قطعه موردنظر توسط شرکت ژن فناوری (ایران) با آغازگرهای M13 صورت گرفت.

بررسی‌های بیوانفورماتیک

سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز در دو لندریس در مواجهه با شوری سنجیده شد.

طرفی نشان‌دهنده شدت تنش اعمال شده و از سویی دیگر بیانگر پتانسیل تحمل تنش توسط گیاه می‌باشد، ابتدا تغییر فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدان

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس صفات مختلف دو لندریس گندم نان تحت تنش شوری ۲۵۰ میلی مولار NaCl

Source of variation	df	Mean of Squares					
		Root CAT activity	Shoot CAT activity	Root SOD activity	Shoot SOD activity	Root APX activity	Shoot APX activity
Landrace	1	11.537 ^{n.s}	0.073 ^{n.s}	0.122 ^{n.s}	6.576**	1.006**	0.029**
Time	6	117.418**	0.123**	136.032**	10.284**	0.885**	0.055**
Landrace×Time	6	8.312 ^{n.s}	0.048 ^{n.s}	3.823 ^{n.s}	8.874**	0.219**	0.019**
Error	28	11.156	0.022	2.235	0.250	0.024	.002

***, **, ns: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱٪ و ۰/۰۵٪ و غیر معنی‌دار.

ساعت افزایش شدید فعالیت مشاهده شد که با تداوم دوره تنش به‌طور معنی‌داری کاهش یافت اما مقدار آن تا انتهای دوره تنش ثابت بود (شکل ۱- الف). در ریشه تحت تنش شوری الگوی فعالیت آنزیم SOD در هر دو لندریس ۳۶۲۳ و ۳۶۲۵ با گذشت زمان نسبت به کنترل مشابه بود و تغییرات مشاهده شده در زمان‌های کوتاه‌تر و بلند مدت معنی‌دار نبود، درحالی‌که در میان مدت فعالیت SOD در ۳۶۲۵ به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۱- ب).

کاتالاز (CAT)

با اعمال تنش شوری ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی هر دو لندریس در کوتاه، میان‌مدت و بلندمدت تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای نشان نداد به‌جز در سه ساعت اول از شروع تنش، که در ۳۶۲۵ افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم مشاهده شد (شکل ۲- الف). در همین زمان فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه هر دو رقم با گذشت زمان تغییری نشان نداد به‌جز این‌که در کوتاه‌مدت (یک ساعت پس از اعمال تنش) افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در فعالیت آنزیم در هر دو لندریس مشاهده شد که البته در ۳۶۲۳ بیشتر از ۳۶۲۵ بود (شکل ۲- ب).

آسکوربات پراکسیداز (APX)

همچنین با توجه به نقش مهم عوامل رونویسی در تنظیم پاسخ‌های گیاهان در برابر تنش‌های غیرزنده، بیان ژن *TaAP2-21* نیز در دو رقم بومی کشت‌شده گندم نان بررسی شد تا با استفاده از روش‌های مولکولی و فیزیولوژیکی بتوان پاسخ‌های دو لندریس را تحت تنش شوری ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl مقایسه کرد. در تمام صفات مورد مطالعه زمان منبع تغییرات بود هرچند در تعدادی از صفات همچون فعالیت SOD در بخش هوایی، APX در ریشه و بخش هوایی منبع تغییرات به لندریس و برهم‌کنش لندریس × زمان نیز مرتبط بود (جدول ۳).

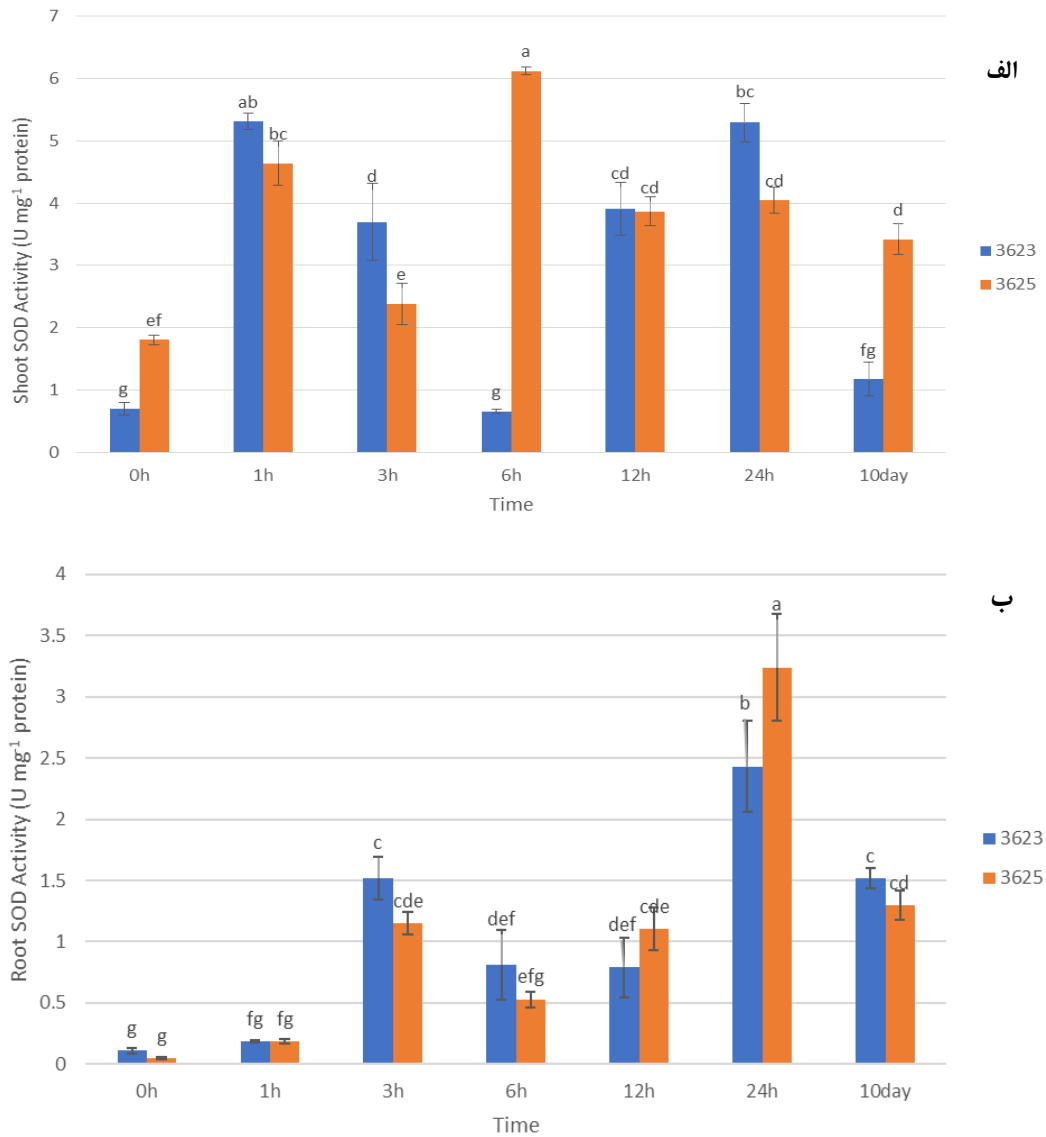
فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

تحت تیمار شوری ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl فعالیت آنزیم SOD در اندام‌هوایی در رقم ۳۶۲۳ در طی دو مرحله افزایش و سپس کاهش معنی‌دار را نشان داد. بدین معنی که ابتدا در کوتاه‌مدت و یک ساعت پس از اعمال تنش افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در فعالیت SOD مشاهده شد که ۲۴ ساعت پس از شروع تنش مجدداً افزایش یافت. در عوض در تنش طولانی‌مدت بیان کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱- الف). در همین حال الگوی فعالیت آنزیم SOD در اندام‌های هوایی در ۳۶۲۵ مشابه ۳۶۲۳ بود با این تفاوت که در ۶

فعالیت را نشان داد، درحالی‌که در ۳۶۲۵ پس از سه ساعت حداکثر فعالیت APX مشاهده شد (شکل ۳).

تحت تنش شوری ۲۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم فعالیت آنزیم APX در طول زمان در لندریس ۳۶۲۳ نسبت به کنترل در اندام هوایی روند افزایشی داشت و در کوتاه‌مدت پس از شش ساعت از اعمال تنش بیشترین



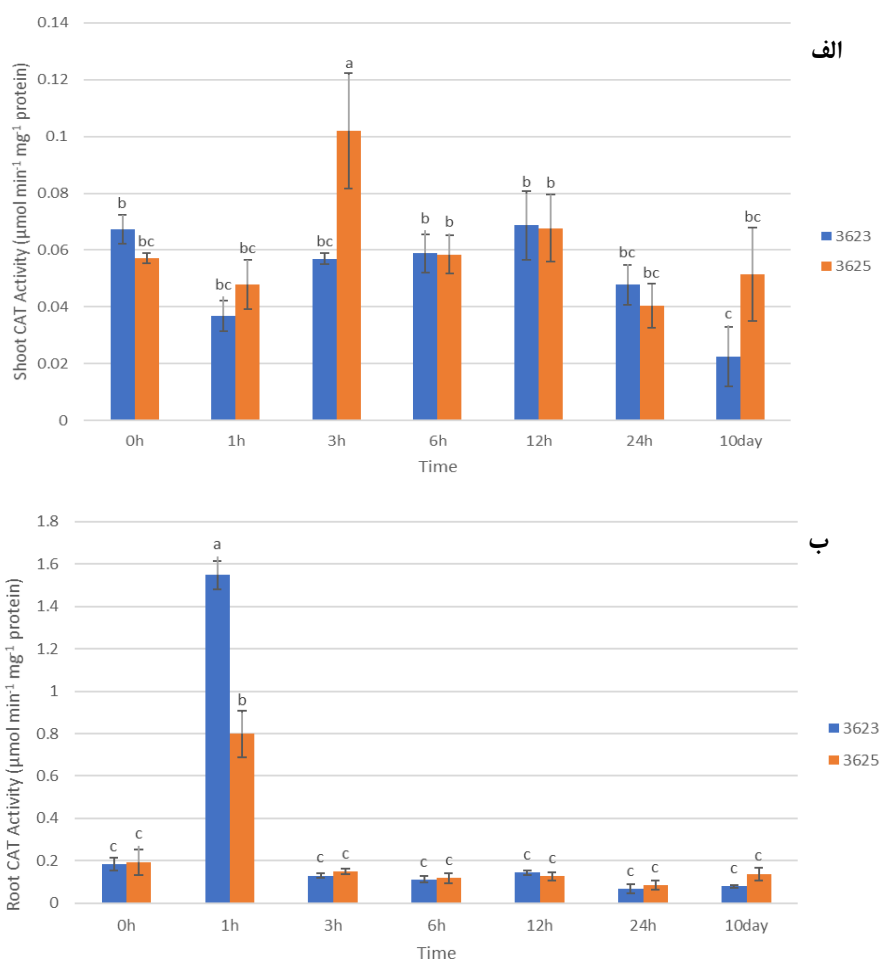
شکل ۱. مقایسه اثر ۲۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (الف) در اندام هوایی؛ (ب) در ریشه در دو رقم بومی گندم نان در دوره‌های زمانی مختلف. برای رسم هیستوگرام، آنالیز واریانس و مقایسه میانگین سه تکرار به کاررفته است و میله‌های عمودی نشانگر انحراف معیار (SD) می‌باشند. حروف غیریکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد. گروه‌بندی میانگین‌های فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش آزمون دانکن انجام شده است.

بخش هوایی ۳۶۲۵ بیشتر از ۳۶۲۳ بود ولی در بلندمدت فعالیت آنزیم در هر دو لندریس مشابه بود (شکل ۳- الف). در اثر تیمار با ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl فعالیت آنزیم APX در ریشه در ۳۶۲۳ با

با این‌وجود الگوی فعالیت آنزیم در تنش میان‌مدت و طولانی‌مدت در هر دو لندریس تقریباً مشابه بود (شکل ۳- الف). نتایج نشان داد که در تنش کوتاه و میان‌مدت فعالیت آنزیم APX در

و میان‌مدت بیشتر از ۳۶۲۳ بود اما در نهایت سطح فعالیت آنزیم APX در بلندمدت در ۳۶۲۳ تا حدی بیشتر از ۳۶۲۵ بود که البته معنی‌دار نبود (شکل ۳-ب).

گذشت زمان نسبت به کنترل کاهش یافت اما در ۳۶۲۵، یک ساعت پس از اعمال تنش افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم مشاهده شد که با ادامه تنش از شدت آن کاسته شد (شکل ۳-ب). سطح فعالیت آنزیم APX در ریشه ۳۶۲۵ در تنش‌های کوتاه

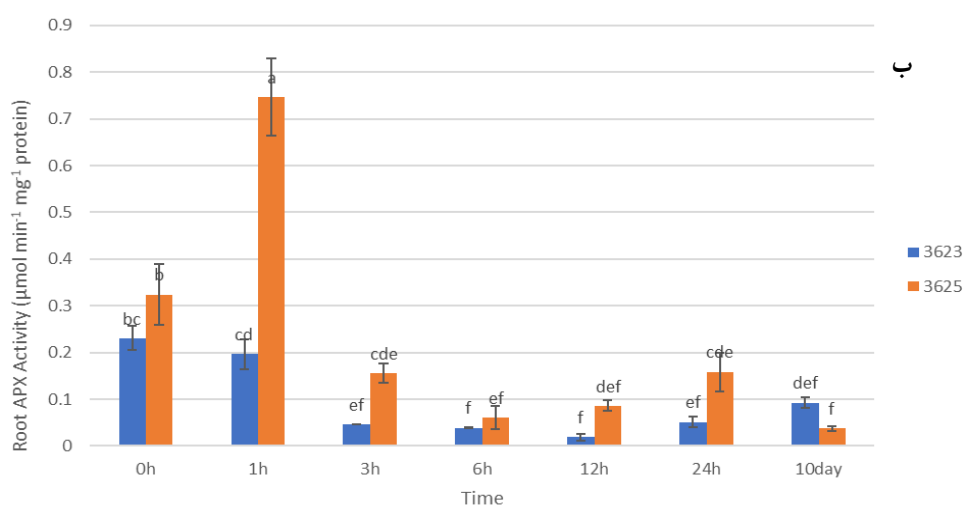
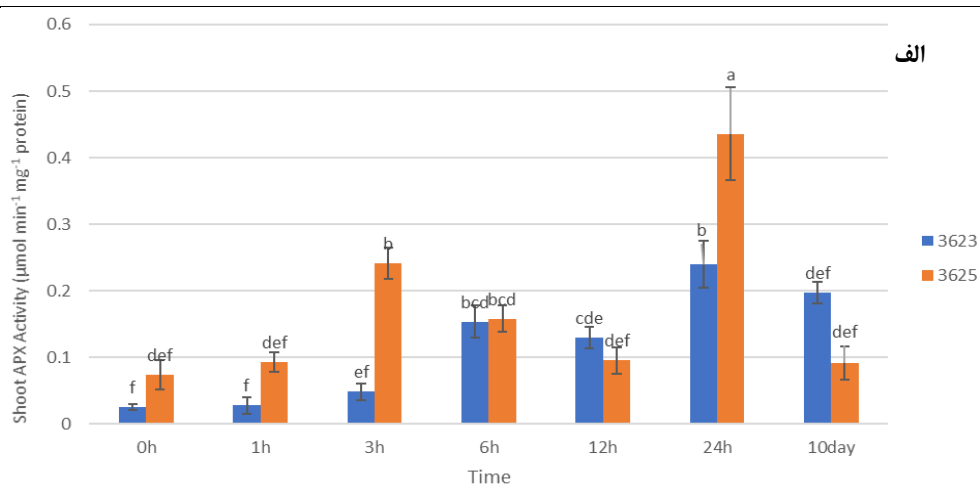


شکل ۲. مقایسه اثر ۲۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بر فعالیت آنزیم کاتالاز. الف) در اندام هوایی؛ ب) در ریشه در دو رقم بومی گندم نان در دوره‌های زمانی مختلف. برای رسم هیستوگرام، آنالیز واریانس و مقایسه میانگین سه تکرار به کاررفته است و میله‌های عمودی نشانگر انحراف معیار (SD) می‌باشند. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد. گروه‌بندی میانگین‌های فعالیت آنزیم کاتالاز با روش آزمون دانکن انجام شده است.

جدول ۴. نتایج Blast قطعه توالی‌یابی شده ژن AP2-21 در پایگاه‌های NCBI و Plant Ensemble.

Sequence	Gene Hit	Genomic Location	Expected ID%	Expected Value	Submitted Name	Molecular Function	Biological Process	Database
----------	----------	------------------	--------------	----------------	----------------	--------------------	--------------------	----------

AP2-21 (720nt)	(Genomic) TRIAE CS42 6AL TGACv1 472394 AA1521650	TGACv1 scaffold 472394 6AL:51313 51718	99.8	0.0	Uncharacterized protein(N/A)	Transcription factor activity, sequence- specific DNA binding	Multicellular organism development, transcription, DNA-templated	Plant Ensemble
	(cDNA) TRIAE CS42 6AL TGACv1 472394 AA1521650	TGACv1 scaffold 472394 6AL:51313- 55145	96.18	0.0	Uncharacterized protein(N/A)	Transcription factor activity, sequence- specific DNA binding	Multicellular organism development, transcription, DNA-templated	Plant Ensemble
	XM 020297622							
AP2-21 (720nt)	XM 020297622.1			0.0	AP2 like ethylene responsive transcription factor BBM1	DNA-binding domain in plant proteins such as APETALA2 and EREBPs	Transcription factor	NCBI



شکل ۳. مقایسه اثر ۲۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز. الف) در اندام هوایی؛ ب) در ریشه در دو رقم بومی گندم نان در دوره‌های زمانی مختلف. برای رسم هیستوگرام، آنالیز واریانس و مقایسه میانگین سه تکرار به کار رفته است و میله‌های عمودی نشانگر انحراف معیار (SD) می‌باشند. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد. گروه‌بندی میانگین‌های فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با روش آزمون دانکن انجام شده است.

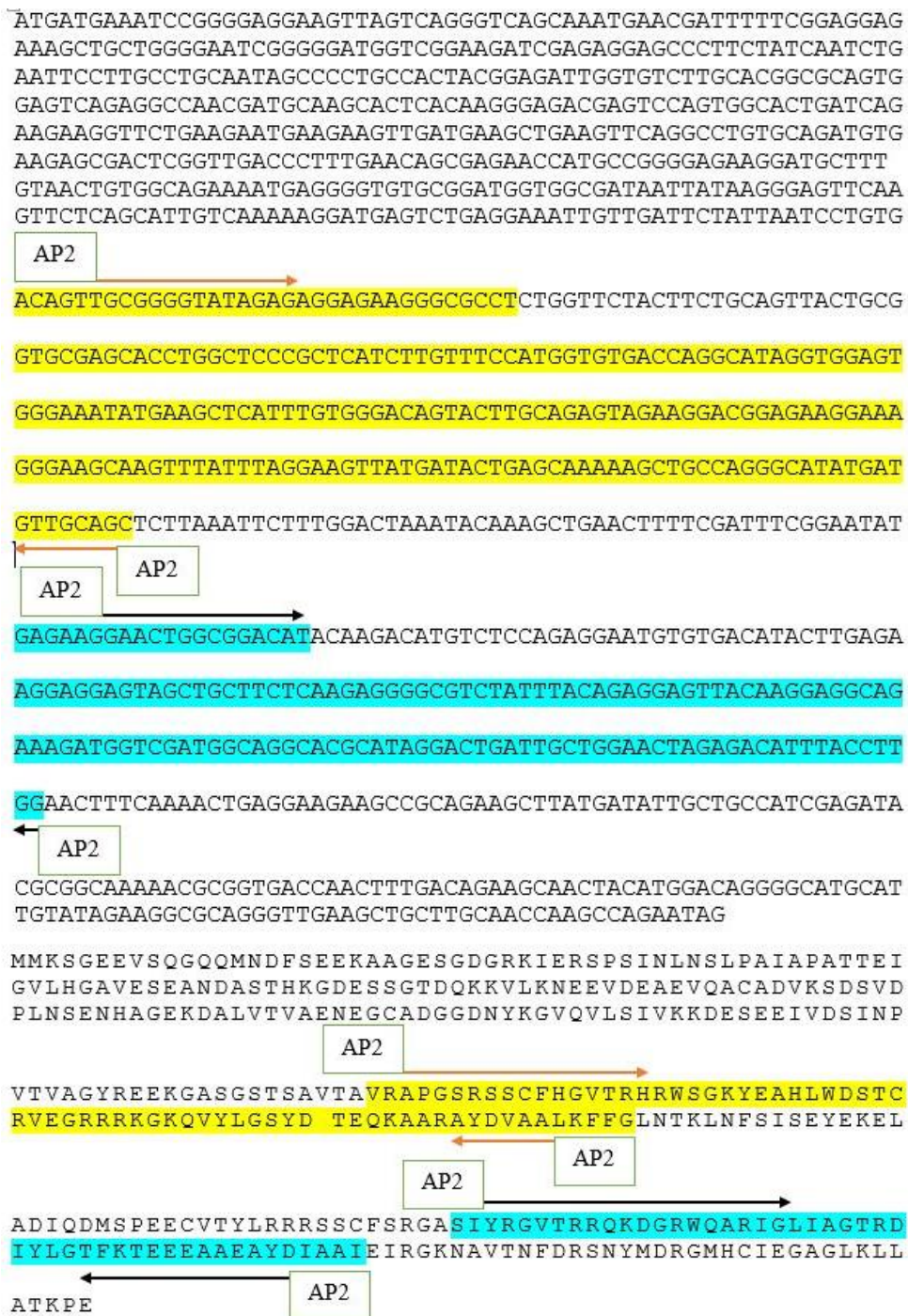
روی ژن *Tae022295* که از پایگاه اطلاعاتی Plantfdb به‌دست آمده بود، انجام شد و دومین‌ها با استفاده از سایت NCBI مشخص شدند (شکل ۴- الف و ب).

تغییرات بیان ژن *TaAP2-21*

به محض شروع تنش شوری بیان ژن *TaAP2-21* در بخش هوایی و ریشه هر دو لندریس بشدت کاهش یافت به‌حدی که یک ساعت پس از اعمال تنش بیان ژن در هر دو لندریس ناچیز بود (شکل ۵- الف و ب). با این‌حال با گذشت زمان، به‌ویژه شش ساعت پس از اعمال تنش، تغییراتی در بیان ژن در اندام‌های ریشه و بخش هوایی هر دو لندریس قابل مشاهده بود.

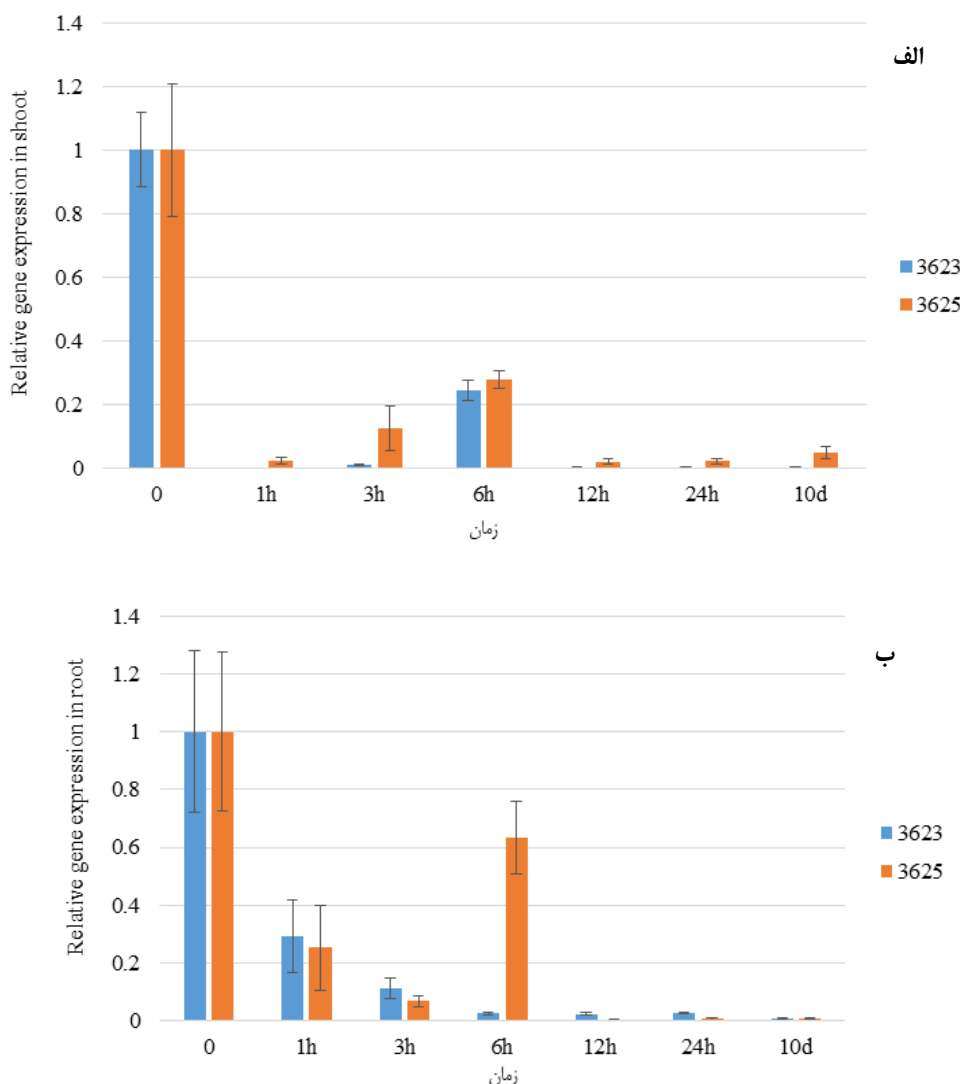
شناسایی، همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن *TaAP2-21*

با در نظر گرفتن توالی‌های به‌کار برده شده برای طراحی آغازگرهای ژن *TaAP2-21* در گیاه گندم انتظار وجود باندی با اندازه ۷۲۰ جفت نوکلئوتید وجود داشت. پس از تکثیر قطعه موردنظر با آغازگرهای به‌دست‌آمده از نتایج هم‌ردیفی ژن‌های مشابه (جدول ۱)، همسانه‌سازی قطعه ژن *AP2-21* در ناقل همسانه‌سازی PTG19 و توالی‌یابی قطعه همسانه‌سازی‌شده انجام گرفت. توالی قطعه ژن با توالی کامل ژن مجدداً در پایگاه‌های Plant Ensemble و NCBI بلاست شد که توالی قطعه مورد نظر را تأیید کرد (جدول ۴ و شکل ۴). سپس آغازگرهای ویژه PCR کمی از روی توالی به‌دست‌آمده برای گندم طراحی شدند (جدول ۲). طراحی آغازگر برای ژن *TaAP2-21* در ابتدا از



شکل ۴. دومین‌های AP2.

الف) در ژن *TaAP2-21*؛ ب) در پروتئین TaAP2-21 که با استفاده از سایت NCBI به دست آمده و مشخص شده‌اند.



شکل ۵. مقایسه اثر ۲۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بر بیان ژن *TaAP2-21* الف- در اندام هوایی و ب- در ریشه در دو لندریس گندم نان در دوره‌های زمانی مختلف. برای تجزیه و تحلیل داده‌های PCR از نرم‌افزار Rest براساس مقدار ΔC_t استفاده شده و نرمال‌سازی با مقایسه با بیان ژن خانه‌دار به‌عنوان کنترل انجام گرفته است.

نتیجه کاهش جذب آب، ممانعت از رشد ریشه و تحریک تنش اکسیداتیو روی می‌دهد (Hernandez *et al.*, 2010). از آنجاکه در این پژوهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، به‌ویژه SOD، در طی ساعات اولیه اعمال تنش در ریشه‌های هر دو لندریس افزایش یافت، احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز ریشه نسبت به تنش شوری در طی زمان از سازوکارهای تحمل شوری در این دو رقم بومی

در پژوهش حاضر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌طور قابل‌توجهی در طول دوره تیمار به‌ویژه در تنش کوتاه‌مدت در هر دو بافت هر دو لندریس افزایش یافت که منجر به محافظت غشاهای لیپیدی از اکسید شدن و رشد بیشتر می‌شود. از آنجاکه ریشه‌ها در طی رشد و نمو گیاه نقش مهمی به‌عهده دارند، و به‌طور مشخص اولین بخش از گیاه هستند که در معرض شوری قرار می‌گیرند، با دو نوع مختلف تنش، اسمزی و سمیت یونی، مواجه می‌شوند که در

Caverzan *et al.*, 2016; Acosta-Motos *et al.*, 2017). ژنوتیپ‌های متحمل معمولاً ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند در نتیجه تخریب اکسیداتیو در آنها کمتر است. این ویژگی احتمالاً به پتانسیل ژنتیکی این گیاهان بستگی دارد. همچنین پاسخ به تنش در گیاه گندم نسبت به نوع بافت، طول و شدت تنش و مرحله نمو آن وابسته است (Caverzan *et al.*, 2016; Acosta-Motos *et al.*, 2017). در مقایسه، پاسخ ژنوتیپ‌های حساس به تنش بدون تغییر و یا حتی کاهش یافته است. در این گیاهان سطوح پایین‌تری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت به گونه‌های متحمل به شوری مشاهده می‌شود (Caverzan *et al.*, 2016; Acosta-Motos *et al.*, 2017). با توجه به این که هر دو لندریس نسبت به شوری متحمل می‌باشند در مجموع فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و APX در هر دو بافت، به‌ویژه ریشه، هر دو گیاه به محض اعمال تنش شوری افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالای این دو لندریس است. با این حال به نظر می‌رسد در تنش بلندمدت سازوکار آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های SOD، CAT و APX در ۳۶۲۳ فعال‌تر از ۳۶۲۵ عمل می‌کنند.

از آنجا که تاکنون گزارشی از نحوه تنظیم بیان ژن *TaAP2-21* در گندم ارائه نشده است، در پژوهش حاضر تغییر بیان آن در هر دو بافت ریشه و هوایی هر دو لندریس مشاهده شد. به‌علاوه ممانعت از بیان ژن به محض اعمال تنش شوری در هر دو بافت هر دو لندریس قابل توجه بود که نشان‌دهنده تنظیم منفی این عامل رونویسی در پاسخ به تنش شوری در هر دو لندریس گندم می‌باشد. احتمالاً محصول این ژن که یک عامل رونویسی است به‌عنوان بازدارنده رونویسی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری عمل می‌کند، در نتیجه کاهش بیان ژن با اعمال تنش شوری ممانعت از بیان بخشی از سازوکار پاسخ به تنش در پایین دست دریافت پیام تنش برداشته شده

کشت‌شده محسوب می‌شود که از آن طریق موجب کاهش مقدار ROS، به‌ویژه H_2O_2 ، به محض مواجهه با شوری می‌شود. این سیستم با همکاری سیستم‌های ناقل یونی موجب کاهش تجمع کاتیون‌ها به‌ویژه Na^+ در بخش هوایی شده (اطلاعات منتشر نشده است) و در نتیجه فعالیت CAT در بخش هوایی با تداوم تنش کاهش می‌یابد (Caverzan *et al.*, 2016; Acosta-Motos *et al.*, 2017). SOD رادیکال سوپراکسید را به H_2O_2 و اکسیژن تبدیل می‌کند. از طرفی APX در احیا و تبدیل H_2O_2 به آب وارد عمل می‌شود. تجمع H_2O_2 می‌تواند به‌عنوان پیام عمل کرده و موجب فعال شدن سیستم دفاعی در بخش‌های هوایی و ریشه گیاه شود. طی پژوهشی گزارش شده است که فعالیت آنزیم‌های سم‌زداینده مثل APX، گلوتاتیون پراکسیدازها و SOD در ریشه آرابیدوپسیس تحت تنش شوری افزایش می‌یابد (Hernandez *et al.*, 2010). کاتالاز هم H_2O_2 را به آب تبدیل می‌کند منتها نسبت به APX تمایل کمتری به H_2O_2 دارد. به‌نظر می‌رسد مجموعه آنزیم‌های SOD و APX در حذف رادیکال‌های آزاد حاصل از تنش اعمال شده در ریشه هر دو لندریس عملکرد موثرتری دارند.

در بخش هوایی فعالیت SOD در هر دو لندریس برجسته‌تر از دو آنزیم دیگر بود که می‌تواند ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد، به‌ویژه سوپراکسید، در اثر تنش در سامانه فتوسنتزی و تنفسی گیاه باشد. در نتیجه فعالیت بیشتر آنزیم SOD در ساعات اولیه تنش و تبدیل سوپراکسید به اکسیژن و H_2O_2 علاوه بر محافظت از سامانه‌های تولید انرژی و ماده، رشد و نمو گیاه را در شرایط تنش تا حد زیادی میسر می‌نماید. نتایج بسیاری از پژوهش‌ها نشان‌دهنده پاسخ ژنوتیپ ویژه گندم به تنش‌های غیر زنده است. بدین معنی که برخی از ژنوتیپ‌های گندم در شرایط مشابه پاسخ‌های متفاوتی به تنش می‌دهند

این خانواده شد. نتایج حاصل از بیان ژن تحت تنش غیرزیستی نشان داد تعدادی از اعضای این خانواده تحت تنش شوری کاهش بیان نشان می‌دهند که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر توافق داشته و نیز تأییدکننده نقش تنظیم‌کننده این خانواده ژنی در پاسخ به تنش شوری است.

به‌طور خلاصه بر اساس نتایجی که در پژوهش حاضر برای اولین بار بدست آمده لندریس ۳۶۲۳ در تنش بلندمدت سازوکار آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به ۳۶۲۵ دارد. همچنین در این پژوهش برای اولین بار بیان ژن *TaAP2-21* از خانواده ژنی AP2/ERF در بافت‌های هوایی و ریشه دو لندریس گندم نان تحت تنش شوری بررسی و نقش تنظیم‌کنندگی منفی آن در پاسخ به شوری تأیید شد. با این حال ضرورت دارد برای درک سازوکار دقیق عملکرد ژن *TaAP2-21* در پاسخ به تنش شوری در گندم آزمایش بیشتری انجام گیرد تا بتوان از آن برای بهبود تحمل تنش در گندم نان استفاده کرد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تحت طرح ماموریت محور ۴۵۱م انجام گرفته است.

REFERENCES

- acosta-Motos J, Ortuño M, Bernal-Vicente A, Diaz-Vivancos P, Sanchez Blanco M, Hernandez J (2017) Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy* 7: 18.
- Aebi H (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Agarwal G, Garg V, Kudapa H, Doddamani D, Pazhamala LT, Khan AW, Thudi M, Lee SH, Varshney RK (2016) Genome-wide dissection of AP2/ERF and HSP90 gene families in five legumes and expression profiles in chickpea and pigeonpea. *Plant Biotechnology Journal* 14: 1563-1577.
- Baloglu MC, Inal B, Kavas M, Unver T (2014a) Diverse expression pattern of wheat transcription factors against abiotic stresses in wheat species. *Gene* 550: 117-122.
- Baloglu MC, Inal B, Kavas M, Unver T

و پاسخ مناسب به تنش داده می‌شود. نقش بازدارندگی از رونویسی توسط برخی از اعضا خانواده ژنی AP2/ERF در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است (Shu et al., 2016a). همچنین وجود دومین محافظت شده AP2 در انتهای کروکسیلی *TaAP2-21* می‌تواند شاهدهی برای بازدارندگی از رونویسی این پروتئین باشد (Dong et al., 2012). Shu و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان دادند که در یونجه یکساله (*Medicago truncatula*) تحت تنش شوری ۸۷ عضو از خانواده AP2/ERF در تنش شوری و در اندام‌های خاص افزایش بیان دارند که بیانگر نقش تنظیمی این ژن‌ها در پاسخ‌های یونجه به تنش‌های محیطی بود.

نقش این خانواده ژنی در دو گیاه نخود (*Cicer arietinum*) و لوبیای سودانی (*Cajanus cajan*) توسط Agarwal و همکاران (۲۰۱۶) بررسی شد. نتایج نشان داد که اعضای این خانواده در تحمل به تنش گرمایی نقش دارند. همچنین نتایج حاصل از RNA-seq نشان داد که دو عضو از گروه DREB را می‌توان به‌عنوان ژن‌های کاندیدا برای تحمل به تنش‌های زیستی در نظر گرفت. نقش خانواده AP2/ERF در گیاه کلزا (*Brassica napus*) تحت تنش غیرزیستی توسط Song و همکاران (۲۰۱۶) بررسی شد که نتایج حاصل از پژوهش آنها منجر به شناسایی ۵۱۵ عضو از

- (2014b) Diverse expression pattern of wheat transcription factors against abiotic stresses in wheat species. *Gene* 550: 117-22.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Caverzan A, Casassola A, Brammer SP (2016) Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and molecular biology* 39: 1-6.
- Dong W, Ai X, Xu F, Quan T, Liu S, Xia G (2012) Isolation and characterization of a bread wheat salinity responsive ERF transcription factor. *Gene* 511: 38-45.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide Dismutases. *I. Occurrence in Higher Plants* 59: 309-314.
- Hernandez M, Fernandez-Garcia N, Diaz-Vivancos P, Olmos E (2010) A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in Brassica oleracea roots. *Journal of experimental botany* 61: 521-535.
- Jan AU, Hadi F, Midrarullah Nawaz MA, Rahman K (2017). Potassium and zinc increase tolerance to salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 116: 139-149.
- Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P (2013) APETALA 2/Ethylene Responsive Factor (AP 2/ERF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist* 199: 639-649.
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1819: 86-96.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Pandey B, Sharma P, Saini M, Pandey DM, Sharma I (2014) Isolation and characterization of dehydration-responsive element-binding factor 2 (DREB2) from Indian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Australian Journal of Crop Science* 8: 44.
- Qin S, Zhang Y-J, Yuan B, Xu P-Y, Xing K, Wang J., Jiang J-H (2014) Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant and soil* 374: 753-766.
- Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
- Shu Y, Liu Y, Zhang J, Song L, Guo C (2016a) Genome-Wide Analysis of the AP2/ERF Superfamily Genes and their Responses to Abiotic Stress in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science* 6.
- Shu Y, Liu Y, Zhang J, Song L, Guo C (2016b). Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily genes and their responses to abiotic stress in *Medicago truncatula*. *Frontiers in plant science* 6: 1247.
- Sohn KH, Lee SC, Jung HW, Hong JK, Hwang BK (2006) Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant molecular biology* 61: 897.
- Song X, Wang J, Ma X, Li Y, Lei T, Wang L, Ge W, Guo D, Wang Z, Li C (2016). Origination, expansion, evolutionary trajectory, and expression bias of AP2/ERF superfamily in

- Brassica napus. *Frontiers in plant science* 7: 1186.
- Thamilarasan SK, Park J-I, Jung H-J, Nou I-S (2014) Genome-wide analysis of the distribution of AP2/ERF transcription factors reveals duplication and CBFs genes elucidate their potential function in Brassica oleracea. *BMC genomics* 15: 422.
- Yamasaki K, Kigawa T, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2013) DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends in plant science* 18: 267-276.
- Zhuang J, Sun C-C, Zhou X-R, Xiong A-S, Zhang J (2011) Isolation and characterization of an AP2/ERF-RAV transcription factor BnaRAV-1-HY15 in *Brassica napus* L. HuYou15. *Molecular biology reports* 38: 3921-3928.