



علوم و تحقیقات بذر ایران  
سال نهم / شماره چهارم / ۱۴۰۱ (۹۱ - ۷۵)

مقاله پژوهشی

DOI: 10.22124/jms.2023.6172

## بهبود خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی آرابیدوپسیس تالیانا با انتقال تراژن آرتمین

طیبه فلاحی پاشاکی<sup>۱</sup>، محمد مهدی سوهانی<sup>۲\*</sup>، رضا شیرزادیان<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۲۹

### چکیده

دمای بالا سبب آسیب‌های جدی در گیاهان از جمله اختلال در تعادل درون‌سلولی، کندی یا رکود رشد و نمو و حتی مرگ می‌شود. هنگامی که گیاهان در معرض دمای بالا قرار می‌گیرند، پروتئین‌های پاسخ گرمایی (HSP) در سلول فعال می‌شوند. از همین گروه، HSPهای کوچک (sHSP) قرار دارند که با افزایش دما فعال شده، و در نقش چاپرون مولکولی به پروتئین‌هایی که در معرض تنش گرمایی بوده‌اند، متصل می‌شوند و مانع از تاشدن نادرست یا به عبارتی به تاخوردگی صحیح آن‌ها کمک می‌کنند. پروتئینی به نام آرتمین در سخت پوست *Artemia urmiana* شناسایی شد که از مهم‌ترین خصوصیات آن قدرت چپرونی بالا و وجود دمین  $\alpha$ -crystallin است که وجه مشخصه sHSPها است. به منظور مطالعات ژنومیکس کارکردی شامل فنوتیپ و شاخص‌های تحمل گیاهان، تراژن آرتمین به گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا منتقل و واکنش گیاهان موتانت در قالب یک طرح آزمایشی به صورت فاکتوریل و طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مطالعه شد. تنش گرمایی در دمای ۴۵ درجه سلسیوس اعمال و مطالعه مولفه‌های بیوشیمیایی، مولفه‌های جوانه‌زنی و فیزیولوژیک نشان داد که برهمکنش فاکتورهای تنش گرمایی و ژنوتیپ بر تمام صفات مربوط به جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک گیاهچه، طول گیاهچه و محتوای پروتئین کل، آنزیم کاتالاز و محتوای مالون‌دی‌آلدئید در سطح یک درصد معنی‌دار بودند. با اعمال تنش گرمایی گیاهان حاوی تراژن آرتمین به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان غیرتراریخته جوانه‌زنی و رشد گیاهچه بهتری را نشان دادند. تنش همچنین موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز و محتوای پروتئین کل و کاهش محتوای مالون‌دی‌آلدئید در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاه غیرتراریخته شد. بر این اساس، حضور تراژن آرتمین در گیاهان احتمالاً سبب افزایش مقاومت گیاهچه به تنش گرمایی و افزایش عملکرد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آرتمین، تنش غیرزیستی، جوانه‌زنی، محتوای پروتئین کل، sHSP

t.fallahei@yahoo.com

mhdsohani@gmail.com

r.shirzadian@gmail.com

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

\*نویسنده مسئول: mhdsohani@gmail.com

## مقدمه

از دهه ۱۹۵۰، دمای کره زمین هر ۱۰ سال یکبار حدود ۰/۱۳ درجه سلسیوس افزایش یافته است (IPCC, 2018) که اثر این روند را دانشمندان مرتبط با کاهش عملکرد ذرت و گندم به ترتیب به میزان ۳/۸ و ۵/۵ درصد در طی این سالها می‌دانند (Lobell and Asner, 2003). همه موجودات زنده با شرایط محیطی ناگهانی و نامطلوب مواجه می‌شوند، اما برخلاف حیوانات گیاهان بی‌تحرک هستند و نمی‌توانند برای جلوگیری از آسیب از شرایط تنش دور شوند. بنابراین، گیاهان برای بقای خود باید با تنش مقابله کنند (Ferrer et al., 2018; Formentin et al., 2018).

در طول تکامل، گیاهان استراتژی‌های گوناگونی را برای تحمل به تنش‌های مختلف توسعه داده‌اند (Zhou et al., 2012). گیاهان در مواجهه با تنش باید پاسخ‌های متابولیک را تحریک و مولکول‌هایی را سنتز کنند تا سبب فعال شدن مکانیسم‌های محافظتی شوند و تاثیرات مضر تنش‌ها بر رشد و تولید مثل گیاه محدود شود. بنابراین، برای جلوگیری از تاثیرات پس از تنش و کاهش در تولید محصول، گیاهان وضعیت فیزیولوژیک و بیوشیمیایی خود را از طریق تغییرات مولکولی و اپی‌ژنتیکی تغییر می‌دهند (Ferrer et al., 2018; Formentin et al., 2018).

سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی به تحریکات بالقوه مضر زیستی و غیرزیستی در محیط زیست مانند دمای بالا و پایین، عفونت‌های باکتریایی و ویروسی، انگلی، خشکی، استرس اکسیداتیو، پیری، جهش‌های مضر و کاهش انرژی سلولی در کنار سایر متابولیت‌ها با القای سنتز پروتئین‌های مرتبط با تنش به نام پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) پاسخ می‌دهند و در طول سازگاری به تنش، رونویسی و ترجمه گسترده HSPها را القا می‌کنند (Lindquist and Craig, 1988; Sørensen et al., 2003). از طرفی، تغییرات مضر محیطی با فرآیند تاخوردگی زنجیره‌های تازه سنتز شده تداخل داشته و از دست‌دادن ساختار طبیعی پلی‌پپتیدهای بالغ را سرعت می‌بخشد که کاهش عملکرد سلول و انعقاد پلی‌پپتیدها در سلول را به دنبال دارد. گروه خاصی از پروتئین‌ها به نام چپرون برای مقابله با این فرآیندهای مضر تکامل یافته‌اند. شبکه پروتئینی چپرونی تاخوردگی درست و متعاقباً حفظ پروتئین‌ها را در سلول کنترل می‌کنند. بیان ذاتی و القایی چپرون‌ها تحت شرایط

استرس اتفاق می‌افتد و این دسته پروتئین‌ها تقریباً در تمامی موجودات زنده وجود دارند (Liberek et al., 2008).

پروتئین‌های HSP در گیاهان با توجه به وزن مولکولی شان به پنج گروه دسته‌بندی می‌شوند: HSP90, HSP100, HSP70, HSP60 و پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک (sHSPs) (Waters et al., 1996). بسیاری از چپرون‌ها جزء Hsps هستند. ساختار اولیه HSPها و پاسخ‌دهنده‌های تنش حرارتی در اغلب ارگانیسم‌های مطالعه شده به شدت حفاظت شده هستند. به اعتقاد دانشمندان این پروتئین‌ها از طریق حفظ ساختار سه‌بعدی سلول، تاخوردگی پروتئین‌ها، دسته‌بندی پروتئین‌ها و انتقال به مکان‌های مناسب و حفظ هموستاز سلول در محافظت از ارگانیسم‌ها در برابر تنش گرمایی نقش دارند (Sable and Agarwal, 2018; Wang et al., 2004). بسیاری از HSPها چپرون‌های مولکولی هستند که نقش بیولوژیک آن‌ها محافظت از پروتئین‌های جدید تازه سنتز شده است و از تاخوردگی اشتباه یا انعقاد آن‌ها جلوگیری می‌کنند. میزان پاسخ تنش گرمایی زمانی که بافت‌ها و سلول‌های یک موجود زنده در معرض تنش گرمایی ناگهانی قرار می‌گیرند، ارتباط مستقیم با بیان موقت HSPها دارد (Efeoğlu, 2009).

مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیک *A. thaliana* به محرک‌های خارجی کاهش‌دهنده فعالیت HSP90، اهمیت چپرون‌ها را برای واکنش‌هایی مانند رشد هیپوکوتیل و ریشه در تاریکی، پاسخ گرانشی ریشه، و سبزشدن لپه‌ها در گلدان پس از انتقال آن‌ها به شرایط نوری پس از اتیوله و یا سفیدشدن را نشان داد (Queitsch et al., 2002). مطالعات تراریختی و *in vivo* همچنین نشان داد که در شرایط تنش گرمایی ۴۰ درجه سلسیوس و تنش نوری بالا، آرابیدوپسیس تراریخته که به‌طور مداوم یک HSP21 کلروپلاستی را بیان می‌کرد، مقاوم‌تر از گیاهان نوع وحشی به تنش‌های مذکور بود و وزن خشک بیش‌تری نسبت به گیاه شاهد داشت (Härndahl et al., 1999). انتقال پروتئین شوک گرمایی کلاس I سیتوزولی *Chinensis I* (RcHSP17.8) sHSP از گیاه رز چینی (*Rosa chinensis*) به *Arabidopsis* منجر به افزایش مقاومت این گیاه در برابر تنش‌های گرما، شوری، اسمزی و خشکی شد. علاوه بر آن نتایج انتقال آن به *E. coli* و مخمر نشان

در پژوهش حاضر به منظور مطالعه نقش کارکردی تراژن آرتمین در گیاهان، برای اولین بار گیاه مدل آرابدیوپسیس با ژن کدکننده آرتمین تراریزش شد. دو ژنوتیپ تراریخته مستقل *art-1* و *art-2* حامل تراژن آرتمین تحت تنش گرمایی دمایی بالا قرار گرفتند. در ادامه، واکنش‌های فیزیولوژیک گیاهان تراریخت در مراحل جوانه‌زنی بذر و همچنین ویژگی‌های مرفولوژیک و بیوشیمیایی گیاهچه در پاسخ به تنش گرمایی بررسی شدند.

### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان به صورت آزمایش فاکتوریل دارای دو عامل در قالب طرح کاملاً تصادفی، در سه تکرار اجرا شد. عامل اول شامل ژنوتیپ در سه سطح گیاه غیرتراریخته آرابدیوپسیس تالیانا (WT) و دو لاین تراریخته آرابدیوپسیس تالیانا *art-1* و *art-2* شامل تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس در زمان‌های صفر، سه و شش ساعت که به منظور بررسی مولفه‌های بیوشیمیایی انجام شد. آزمایش دیگری با هدف بررسی مولفه‌های جوانه‌زنی با اعمال تنش گرمایی در ۴۵ درجه سلسیوس و در سه سطح ژنوتیپ‌های ذکر شده در بالا و در زمان‌های صفر، ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از تنش انجام گرفت.

گیاهان تراریخت آرابدیوپسیس تالیانا حاوی تراژن آرتمین از طریق روش غوطه‌وری گل‌آذین (Floral-dip) و با استفاده از اگروباکتریوم تولید شد (Zhang et al., 2006). پس از گذشت سه نسل خودگشنی، حضور تک‌نسخه از تراژن با استفاده از آزمون کای اسکوئر و تفرق صفت مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در گیاهان تایید شد. میزان بیان تراژن در گیاهان نیز با استفاده از تکنیک RT-qPCR کمیت سنجی شد. بذور گیاه نسل سوم برای آزمون جوانه‌زنی انتخاب شدند (Pourmohammad, 2021).

### ارزیابی ژنتیکی

جهت ارزیابی ژنتیکی آرابدیوپسیس حاوی تراژن آرتمین و استخراج DNA از آن‌ها، بذور کلیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی در گلدان کشت، و در اتافک رشد آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان با دمایی  $1 \pm 23$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد، ۱۶ ساعت

داد که کلاس سیتوزولی sHSP *Chinensis I* (RcHSP17.8) توانایی تحمل مقاومت به تنش را نه تنها در *Arabidopsis* بلکه به *E. Coli* و مخمر تحت تنوع گسترده‌ای از شرایط نامساعد محیطی، القا می‌کند (Jiang et al., 2009). علاوه بر این، sHSP در بسیاری از فرآیندهای رشدی، مانند رشد جنین، جوانه‌زنی بذر، جنین‌زایی سوماتیکی، رشد گرده و رسیدگی میوه نقش دارد (Waters et al., 1996).

سخت‌پوست آرتمیآ توانایی خارق‌العاده‌ای در تحمل شرایط نامساعد محیطی مانند دمای بالا، خشکی شدید، شوری زیاد و کمبود اکسیژن از خود نشان می‌دهد. بر این اساس، آرتمیآ یک مدل منحصر به فرد برای مطالعات بیوشیمیایی مقاومت جانوران در برابر تنش‌های محیطی شدید است که مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. گمان می‌رود بخشی از این مقاومت شگفت‌انگیز آرتمیآ به دلیل وجود پروتئینی به نام آرتمین باشد (Clegg, 2007; Clegg et al., 1999). آرتمین یک پروتئین پایدار در برابر حرارت است که به فراوانی در جنین آرتمیآ یافت می‌شود (Shahangian et al., 2011; Takaloo et al., 2020). توانایی آرتمین در ممانعت از انعقاد القاء شده با حرارت در آنزیم سیترات سنتاز و نقش آن در اعطای مقاومت حرارتی به سلول‌های پستانداران، موجب گردیده که دانشمندان نقش چپرونی را برای آن قائل گردند (Takaloo et al., 2016). فعالیت این چپرون در جلوگیری از انعقاد آنزیم‌هایی از جمله انیدراز کربنیک، و پراکسیداز در *in vitro* و لوسیفرز در *in vivo* تایید شده است (Zeinoddini et al., 2013). از آن جاکه آرتمین پس از شرایط کمبود اکسیژن (Clegg et al., 1999) و شوک گرما (Willsie and Clegg, 2001) به شدت بیان و تنظیم می‌شود، می‌توان آن را در زمره پروتئین‌های القاء شونده در شرایط تنش دسته‌بندی کرد. به منظور بررسی نقش حفاظتی آرتمین در سلول زنده، دو وکتور حاوی ژن آرتمین و لوسیفرز به باکتری *E. coli* منتقل و باکتری‌های ترانسفورم شده در معرض تنش اکسیداتیو و شوری قرار گرفتند. فعالیت آنزیم لوسیفرز در شرایط تنش نشان داد آرتمین در باکتری‌های حاوی پروتئین نقش حفاظتی دارد. باکتری‌های دارای آرتمین مقاومت بیشتری به تنش شوری و اکسیداتیو نشان دادند (Takaloo et al., 2017).

آب گرم با دمای ۴۵ درجه سلسیوس و در دو زمان ۶۰ دقیقه (۶۰') و ۹۰ دقیقه (۹۰') قرار گرفتند. پس از اعمال تیمار گرمایی ۱۰ عدد بذر بر روی ظروف پتری دیش شماره ۱۰ کشت شدند که حاوی محیط کشت MS ۱/۲ بوده‌اند (Changjun *et al.*, 2013) آزمایش در سه تکرار انجام شد. به منظور جلوگیری از تبخیر آب، درب ظروف پتری-دیش با پارافیلیم بسته شد. ظروف به اتاقک رشد با دمای  $23 \pm 1$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد، دوره نوری ۱۶ روشنایی و هشت ساعت تاریکی و شدت نور ۶۰۰۰ لوکس انتقال داده شدند.

شمارش بذور جوانه‌زده از روز دوم آزمایش شروع شده و بذوری جوانه‌زده در نظر گرفته شدند که ریشه‌چه پوسته بذر را شکافته و بیرون آمده باشد (Yan *et al.*, 2014). هفت روز پس از کشت، صفات درصد جوانه‌زنی (رابطه ۱) (Bajji *et al.*, 2002)، سرعت جوانه‌زنی (رابطه ۲) (Maguire, 1962) و شاخص طولی بینه بذر (رابطه ۳) محاسبه گردید (Ramana *et al.*, 2002).

(رابطه ۱)  $PG = Ni / N \times 100$

PG = درصد جوانه‌زنی، Ni = تعداد بذورهای جوانه‌زده در روز

تام (آخرین روز شمارش جوانه‌زنی)، N = تعداد کل بذرها

(رابطه ۲)  $GR = H Ni / Ti$

GR = سرعت جوانه‌زنی برحسب تعداد بذر در روز شمارش،

Ni = تعداد بذر جوانه‌زده در هر روز، T = شمارش روز پس از شروع

آزمایش

(رابطه ۳)  $SVI = PG \times L / 100$

SVI = شاخص بینه بذر، PG = درصد جوانه‌زنی نهایی و L =

میانگین طول گیاهچه (میلی‌متر)

### اندازه‌گیری طول، وزن خشک و وزن تر گیاهچه‌ها

پس از گذشت هفت روز از جوانه‌زنی، طول گیاهچه‌ها با نرم‌افزار Image J1, 3,4,67 اندازه‌گیری شد (Reinking, 2007). وزن تر گیاهچه‌ها با ترازو دقیق توزین و سپس جهت بررسی وزن خشک، گیاهچه‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون فویل آلومینیومی و در دمای ۷۵ درجه سلسیوس درون آون قرار گرفتند.

جهت تعیین شاخص‌های آنزیمی و مولفه‌های بیوشیمیایی، ۲۱ روز پس از کشت، جهت اعمال تنش گرمایی، ظروف پتری دیش در انکوباتور در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به مدت سه و شش ساعت قرار گرفتند و در پایان، برای هر یک از تکرارها نمونه‌برداری جداگانه صورت گرفت (Jiang *et al.*, 2009).

روشنایی و هشت ساعت تاریکی و شدت نور ۶۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. پس از رشد در مرحله چندبرگی، نمونه‌های برگ‌ها هر ژنوتیپ جدا و DNA ژنومی آن‌ها به روش CTAB (Nadia and Hanaa, 2019) استخراج و برای تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج‌شده از دستگاه نانودرآپ (Thermofisher, USA) و الکتروفورز ژل آگارز (BioRad, USA) استفاده شد. آماده‌سازی واکنش PCR به صورت  $6/25 \mu l$  Real-Time Master mix (2x) از شرکت سیناکلون (ایران)،  $0/25 \mu l$  از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی ژن آرتمین،  $1 \mu l$  (10pg-1 ng) gDNA و افزودن  $4/75 \mu l$  آب دوبار تقطیر تا رسیدن به حجم  $12/5 \mu l$  انجام گرفت و در معرض دوره‌های حرارتی شامل یک سیکل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه (۵') و ۳۵ سیکل به صورت ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه (۴۵") و واسرشته‌سازی، ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه (۳۰") مرحله اتصال و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه (۴۵") بسط و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه (۷') مرحله بسط نهایی قرار گرفت. در این آزمایش از آغازگرهای اختصاصی ژن آرتمین طراحی شده توسط سایت NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) شامل آغازگر همسوز: 5'-ATG GCA ACA GAA GGT GCA AG-3' و آغازگر پیش‌سوز: 5'-TTA GAG CTT CTT AAT GGC ACG C-3' با دمای اتصال ۵۸ درجه سلسیوس و محصول PCR به طول ۷۰۶bp جهت انجام واکنش استفاده شد. پس از انجام واکنش PCR کیفیت و کمیت سنجی محصول با الکتروفورز آگارز یک درصد انجام گرفت.

### شرایط اعمال تنش گرمایی

با توجه به تاثیر سوء تنش‌ها بر جوانه‌زنی بذر و اهمیت جوانه‌زنی در تولید گیاهچه‌های سالم و یکنواخت، آزمایشی با هدف شناسایی ارتباط بین فرایبان ژن آرتمین در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا و صفات مربوط به جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه تحت اثر تنش گرمایی انجام شد. بذر پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد (یک دقیقه) و سپس هیپوکلرید سدیم پنج درصد (۱۰ دقیقه)، با آب مقطر (سه بار) آبکشی شدند. پس از آن جهت شکستن خواب بذر به مدت ۴۸ ساعت در دمای چهار درجه سلسیوس و در تاریکی قرار گرفتند. سپس بذر در داخل تیوپ  $1/5 ml$  و درون حمام

## استخراج عصاره آنزیمی

برای استخراج عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی مانند سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز و سنجش محتوای پروتئین محلول کل، ۰/۵ گرم از برگ گیاهچه‌های هر تیمار را در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCL یک مولار (pH=۶/۸) ساییده شد. همگن‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و از عصاره رویی، برای سنجش استفاده شد (Rezayian *et al.*, 2018).

## سنجش پروتئین محلول کل

در این آزمایش پروتئین محلول کل به روش برادفورد (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری میزان محتوای پروتئین نمونه‌های گیاهی، با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) منحنی استاندارد رسم شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های عصاره آنزیمی برگ با یک میلی‌لیتر معرف برادفورد ۲۰ درصد (۷/۷) مخلوط و بعد از پنج دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. محتوای پروتئین محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد برحسب (mg/ml) محاسبه شد.

## سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدئید

برای سنجش محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، ۰/۲ گرم از برگ گیاهان تیمارشده و شاهد در هاون چینی حاوی پنج میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (یک درصد) سائیده شد. عصاره حاصل به مدت پنج دقیقه در ۱۰ هزار دور، سانتریفیوژ شد. به ازاء یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، پنج میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید (۲۰ درصد) اضافه شد که خود حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیوتیک اسید بود. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه (۳۰') در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس بلافاصله در حمام یخ، سرد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه (۱۰') در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه محتوای مالون‌دی‌آلدئید از ضریب خاموشی  $1/55 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  استفاده و نتایج

حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Heath and Packer, 1968).

## اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

به منظور بررسی فعالیت کاتالاز از روش (Aebi *et al.*, 1986) استفاده شد. بدین منظور ۶۲۵ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار را همراه با ۷۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن سه درصد و ۱۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl به یک کووت کوارتز اضافه شد و به وسیله آن جهت هضم تدریجی، دستگاه اسپکتروفوتومتر در مد Kinetic در طول موج ۲۴۰ نانومتر بلانک شد و سپس برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز، ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده را به جای ۱۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl به کووت اضافه شد و در مدت ۱۸۰ ثانیه (۱۸۰") فعالیت کاتالاز بر حسب  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  ترسیم شد. در نهایت فعالیت آنزیمی بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین گزارش شد.

## آنالیز آماری

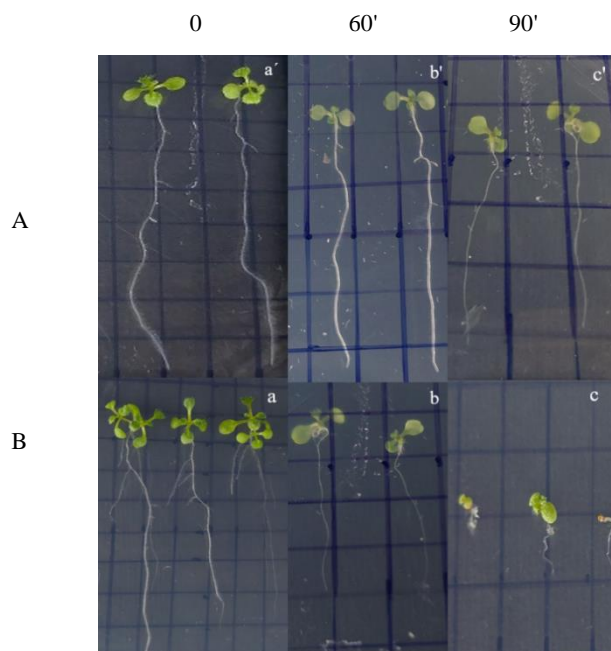
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴، مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون LSD انجام و نمودارها نیز با نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ رسم شدند.

## نتایج و بحث

### درصد جوانه‌زنی

اثر برهمکنش ژنوتیپ و تنش گرمایی بر درصد جوانه‌زنی بذور آرابیدوپسیس تالیانا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

در پژوهش حاضر، بذره‌های دو گیاه تراریخته مستقل (*art-1*، *art-2*) و بذر گیاهان شاهد (WT) در شرایط عدم تنش گرمایی، به ترتیب میزان جوانه‌زنی ۱۰۰، ۹۶/۶ و ۱۰۰ درصدی را نشان دادند. افزایش دما و اعمال تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه (۶۰')، سبب کاهش درصد جوانه‌زنی در گیاه WT شد (۷۳/۳۳ درصد) و مقدار آن اختلاف معنی‌داری را با گیاهان تراریخته ( $art-1=100\%$ ،  $art-2=96\%$ ) نشان داد. با افزایش مدت زمان تنش از ۶۰ دقیقه (۶۰') به ۹۰ دقیقه (۹۰')، لاین‌های *art-1* و *art-2*، به ترتیب با ۸۰، ۷۳/۳۳ درصد جوانه‌زنی در یک گروه آماری قرار گرفتند و گیاه WT با مقدار ۳۶/۶۶ درصد، در گروه آماری جداگانه قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۱- تاثیر تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس بر رشد و نمو گیاهچه‌های *Arabidopsis thaliana*. عملکرد گیاهان ۶۰' (b) و (b) و ۹۰' (c و c') پس از تنش در ژنوتیپ ترا ریخت (A) *art-1* و گیاه شاهد (B). هر مربع به ابعاد یک سانتی متر مربع است.

**Figure 1. The performance of *art-1* (A) and wild type (B) genotypes under 60' (b & b') and 90' (c & c') 45°C heat stress in *Arabidopsis thaliana* seedlings**

#### سرعت جوانه‌زنی

اثر متقابل تنش گرمایی و ژنوتیپ در سطح احتمال یک درصد بر سرعت جوانه‌زنی معنی‌دار شد (جدول ۱). در بررسی اثر متقابل تنش گرمایی و ژنوتیپ مشاهده شد که در شرایط عدم تنش گرمایی اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها وجود نداشت، اما در شرایط تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه (۶۰') و ۹۰ دقیقه (۹۰') در هر دو زمان، گیاهان ترا ریخته حاوی ژن آرتمین، به‌طور معنی‌داری سرعت جوانه‌زنی بالاتری را نسبت به گیاهان غیر ترا ریخته از خود نشان دادند. در ۹۰ دقیقه (۹۰') تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس گیاهان *art-1*، *art-2* دارای بیش‌ترین سرعت جوانه‌زنی به ترتیب، ۳/۳۳ و ۳/۳۴ بذر در روز، سرعت حدود دو برابری را در مقابل گیاه غیر ترا ریخته با سرعت جوانه‌زنی ۱/۳۸ بذر در روز داشتند (جدول ۲). اعمال تنش گرمایی ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (۳۰') در گیاه برنج که CI-sHsp در آن خاموش شده بود نشان داد که فرآیند جوانه‌زنی بذر در لاین‌های RNAi- CI sHsp که سیتوزولی در آن خاموش شده‌اند، در مقایسه با گیاهان غیر ترا ریخته کندتر بوده و کلئوپتیل در آن‌ها با تاخیر ظاهر می‌شود (Sarkar et al., 2020).

ژو و همکاران (Zhou et al., 2012) در پژوهشی مشابه گزارش کردند که sHSPها نقش محافظتی در جوانه‌زنی بذر دارند و بذرهای ترا ریخته حاوی تراژن *sHSP* (*NnHSP17.5*) به‌طور معنی‌داری جوانه‌زنی بالاتری نسبت به بذر غیر ترا ریخته نشان می‌دهند. در آزمایشی دیگر، تقریباً ۱۰۰ درصد بذر گیاهان شاهد و ترا ریخته حاوی *sHSP* (*CsHSP17.2*) در ۲۲ درجه سلسیوس و در طی سه روز جوانه زدند اما، میزان جوانه‌زنی بذر ترا ریخته پس از گذشت دو روز از تنش گرمایی، به‌طور تقریبی از ۴۷ تا ۵۵ درصد و پس از گذشت چهار روز از تنش گرمایی از ۸۰ تا ۹۰ درصد متغیر بود، در مقابل، بذر شاهد پس از دو روز تنها ۵۷ درصد جوانه زده بود. با این حال، میزان جوانه‌زنی بذرهای ترا ریخته و WT به تدریج با افزایش مدت زمان تنش گرمایی کاهش یافت. در آزمایش ونگ و همکاران (Wang et al., 2017) نیز پس از تنش گرمایی، بذرهای ترا ریخته با ۹۶ درصد در مقایسه با بذرهای شاهد (۷۵ درصد) به‌طور معنی‌داری قدرت جوانه‌زنی بالاتری را نشان دادند.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مختلف گیاهچه‌های *Arabidopsis thaliana* تحت شرایط تنش گرمایی  
**Table 1. Variance analysis of different traits in *Arabidopsis thaliana* seedlings under heat stress**

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares								
		درصد جوانه‌زنی Germination Percentage	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight	شاخص بنیه گیاهچه Seeding vigor index	طول گیاهچه seedling length	وزن تر گیاهچه Seedling FW	محتوای پروتئین کل Total protein content	محتوای مالون دی- آلدئید Malondial dehyde Content	فعالیت کاتالاز Catalase Activity
ژنوتیپ (G)	2	2492.59**	94.61**	0.000003**	11802151.6**	887.07**	0.00023**	0.0044**	33.15**	8.94**
گرما (H)	2	1559.29**	4.29**	0.000004**	1598537.98**	76.21**	0.00043**	0.00008**	1.53**	0.28**
G×H	4	559.25**	1.01**	0.000001**	527963.82**	22.8*	0.00012**	0.00003**	1.41**	0.18**
اشتباه آزمایشی Error	18	29.62	0.0680	0.00000001	36187.99	4.35	0.000003	0.000001	0.024	0.001314
ضریب تغییرات (CV%)		6.38	5	4.3	8.5	8.52	5.01	0.82	9.7	3.92

\*: معنی  
دار در  
سطح  
۵  
درصد،

\*\* : معنی‌دار در سطح ۱ درصد، ns: غیر معنی‌دار  
 \*: Significant at the 5% level, \*\*: significant at the 1% level, ns: not significant

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار (مدت زمان اعمال تنش گرمایی) و ژنوتیپ بر جوانه‌زنی و ویژگی‌های رشد

گیاهچه *Arabidopsis thaliana*

Table 2. Means comparison of heat stress duration and genotype on germination and seedling properties of *Arabidopsis thaliana*

ژنوتیپ Genotype	تنش گرما Heat stress duration	درصد جوانه‌زنی Germination percentage (%)	سرعت جوانه‌زنی Germination rate (Seed/day)	شاخص طولی بنیه گیاهچه Seedling vigor index	طول گیاهچه Seedling length (mm)	وزن تر گیاهچه Seedling wet weight (gr)	وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight (gr)
WT	0 min	100c	8.83d	3300.73e	33e	0.0403d	0.00323d
<i>art-1</i>		100c	8.83d	3122.90e	32.4de	0.0406d	0.00320d
<i>art-2</i>		100c	9d	3290.91e	32.9de	0.0413d	0.00325d
WT	60 min	73b	3.05b	1670c	22.77c	0.0263b	0.00205b
<i>art-1</i>		96.66c	4.5c	2938.24ed	29.37d	0.0380c	0.00306c
<i>art-2</i>		96.66c	4.49c	2849.05d	29.5de	0.0386cd	0.00300c
WT	90 min	36.66a	1.38a	285.14a	7.64a	0.0150a	0.00020a
<i>art-1</i>		80b	3.33b	1291.18b	16.12b	0.0340c	0.00242c
<i>art-2</i>		73.33b	3.49b	1389.66bc	16.69b	0.0359c	0.0026c

میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند فاقد اختلاف معنی‌دار با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند.  
Means in each factor followed by similar letter(s) are not significantly different at  $\alpha=5\%$  using LSD test.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار (مدت زمان اعمال تنش گرمایی) و ژنوتیپ بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاهچه

های *Arabidopsis thaliana*

Table 3. Means comparison of heat stress durations and Genotypes on biochemical features of *Arabidopsis thaliana*

ژنوتیپ Genotype	مدت زمان تنش Heat stress duration (h)	محتوای پروتئین کل Total protein (mg/Gfw) content	آنزیم کاتالاز Catalase (U/mg protein)	آنزیم مالون‌دی‌آلدئید Malondialdehyde (nM/gfw)
WT	Control	0.1581c	0.252a	0.389a
<i>art-1</i>		0.1584c	0.255a	0.430a
<i>art-2</i>		0.1576c	0.258a	0.322a
WT	3 h	0.1713d	0.361b	0.903c
<i>art-1</i>		0.1739d	0.493c	0.645ab
<i>art-2</i>		0.1734d	0.487c	0.473ab
WT	6 h	0.1230a	1.542d	4.731f
<i>art-1</i>		0.1364b	2.282e	2.494d
<i>art-2</i>		0.1257a	2.384f	4.30e

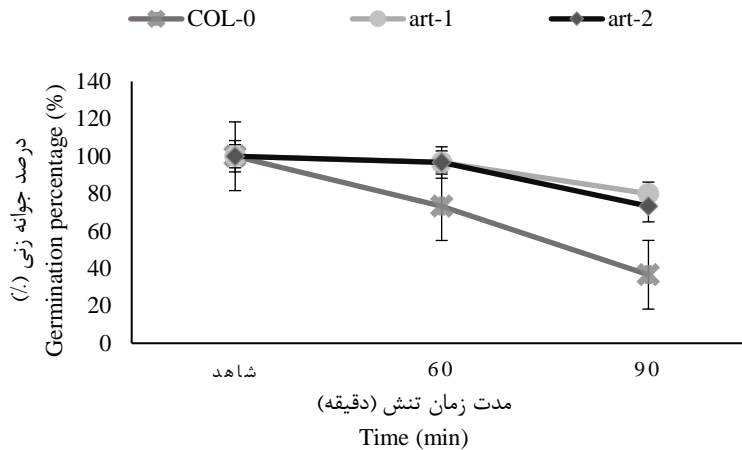
میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند فاقد اختلاف معنی‌دار با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند.  
Means in each factor followed by similar letter(s) are not significantly different at  $\alpha=5\%$  using LSD test

شاخص بنیه گیاهچه

نتایج تجزیه واریانس حاکی از تاثیر معنی‌دار تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس و ژنوتیپ در سطح احتمال یک درصد بر شاخص بنیه بذر بود (جدول ۱).

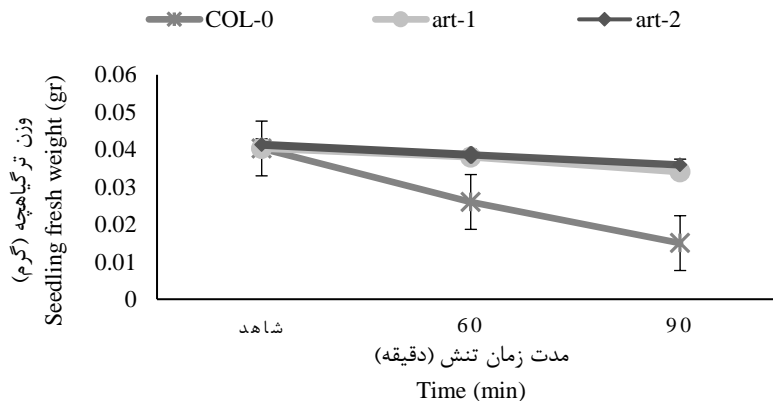
حضور گسترده sHSP در طول مرحله نمو بذر ارتباط مستقیمی با بلوغ بذر دارد. sHSP‌های موجود در بذر ممکن است در حفاظت از پروتئین‌های بذر و ساختار سلولی آن نقش داشته و اجازه رشد تحت شرایط مطلوب را برای گیاه فراهم می‌کنند (Koo et al., 2015).





شکل ۲- تاثیر مدت زمان تنش گرمایی در ۴۵ درجه سلسیوس بر درصد جوانه‌زنی بذور *Arabidopsis thaliana* در دو ژنوتیپ مستقل تراریخت *art-2* و *art-1* در مقایسه با گیاه شاهد

Figure 2. The effect of heat stress (45°C) on the germination percentage of two independent transgenic lines (*art-1* & *art-2*) and wild type

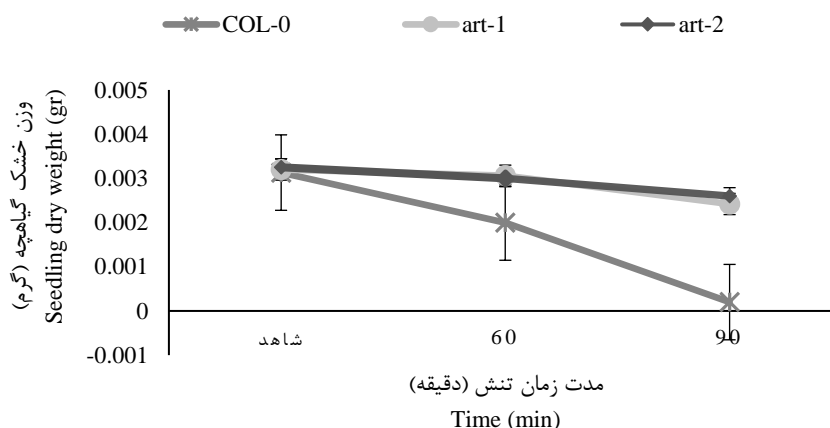


شکل ۳- تاثیر مدت زمان تنش گرمایی در ۴۵ درجه سلسیوس بر وزن تر گیاهچه‌های *Arabidopsis thaliana* در دو ژنوتیپ مستقل تراریخت *art-2* و *art-1* در مقایسه با گیاه شاهد (Col-0)

Figure 3. The effect of heat stress (45°C) on the seedling fresh weight of two independent transgenic lines (*art-1* & *art-2*) and wild type

پتانسیل جوانه‌زنی بذر دارد و منجر به کاهش زنده‌مانی بذر و جوانه‌زنی ضعیف می‌شود (Fahad *et al.*, 2017). کاهش جوانه‌زنی و بنیه بذر به دلیل تنش گرمایی با کاهش پایداری حرارتی غشای پلاسمایی و همچنین سیالیت غشاء و تاخیر در فعال شدن پروتئین‌های شوک حرارتی مرتبط است (Hofmann, 2009; Saidi *et al.*, 2011). عملکرد sHsps با افزایش قدرت و بنیه بذر و طول عمر بذر مرتبط است (Zhou *et al.*, 2012). بنیه بذر یک ویژگی فیزیولوژیک بوده و شامل جوانه‌زنی قابل قبول و یکنواخت بذر، رشد گیاهچه، توانایی ظهور در شرایط نامساعد محیطی و حفظ این خصوصیات پس از انبارداری می‌باشد که تعریفی گسترده و پذیرفته شده می‌باشد (Finch-Savage and Bassel, 2016).

بنیه بذر با افزایش گرما به طور معنی‌داری در گیاه غیر تراریخته کاهش یافت (جدول ۲). فرابیان ژن آرتمین در هر دو ژنوتیپ مستقل (*art-1*, *art-2*) تاثیر مثبتی بر شاخص بنیه بذر داشت و باعث افزایش معنی‌دار شاخص مذکور در بذره‌های تراریخته *art-1* (۲۹۳۸/۲۴) و *art-2* (۲۸۴۹/۰۵) نسبت به شاهد (۱۶۷۰) در ۶۰ دقیقه (۶۰') تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس شد. در بررسی سطح بعدی تنش گرمایی (۹۰ دقیقه (۹۰') تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس) روند این شاخص در هر سه ژنوتیپ (*art-1*, *art-2*, WT) به صورت نزولی بود، اما ژنوتیپ‌های تراریخته شاخص بنیه گیاهچه حدود شش برابری (*art-1* با ۱۲۹۱/۱۸ و *art-2* با ۱۳۸۹/۶۶) را نسبت به گیاه WT (۲۸۵/۱۴) نشان دادند (جدول ۲). افزایش دما تاثیر منفی شدیدی بر



شکل ۴- تاثیر مدت زمان تنش گرمایی در ۴۵ درجه سلسیوس بر وزن خشک گیاهچه‌های *Arabidopsis thaliana* در دو ژنوتیپ مستقل ترا ریخت *art-1* و *art-2* در مقایسه با گیاه شاهد (Col-0)

Figure 4. The effect of heat stress (45°C) on the seedling dry weight of two independent transgenic lines (*art-1* & *art-2*) and wild type

(2019، آرابیدوپسیس (Granier *et al.*, 2002)، گندم و پنبه (Hatfield *et al.*, 2020) در اثر تنش گرمایی گزارش شده است. تنش گرمایی می‌تواند سبب دنا توره شدن و انعقاد پروتئین‌ها، کاهش عملکرد سلولی و از دست دادن عملکرد چندین آنزیم مسئول در تقسیم سلولی شود. این وقایع حتی می‌تواند مرگ سلولی را موجب شده و بر رشد و نمو گیاهان اثر سوء بگذارد (Qi and Zhang, 2020; Wang *et al.*, 2017). تنش دمای بالا به‌طور قابل پیش بینی مانع رشد و نمو گیاه می‌شود که ارتباط نزدیکی با اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک در گیاهان دارد. بر اساس اطلاعات به دست آمده می‌توان انتظار داشت که همبستگی معنی‌دار مثبتی بین فعالیت چارپرونی آرتمین و حفظ رشد طولی گیاهچه-های ترا ریخت *art* وجود دارد.

#### وزن خشک و وزن تر گیاهچه

اثر ساده و برهمکنش تنش گرمایی در ژنوتیپ بر صفات وزن خشک و تر گیاهچه در سطح یک درصد معنی‌دار بود و سبب کاهش میزان وزن تر و خشک گیاهچه شد (شکل ۳ و ۴). در شرایط رشد طبیعی و بهینه، گیاهچه WT با وزن خشک ۰/۰۰۳۲۳ گرم و وزن تر ۰/۰۴۰۳ گرم، ژنوتیپ *art-1* با وزن خشک ۰/۰۰۳۲۵ گرم و وزن تر ۰/۰۴۰۵ گرم و ژنوتیپ *art-2* با وزن خشک ۰/۰۰۳۲۵ گرم و وزن تر ۰/۰۴۰۱ گرم، تفاوت معنی‌دار آماری نشان نداده و در یک گروه آماری قرار گرفتند. در تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه (۶۰') وزن خشک و تر گیاهچه‌ها کاهش معنی‌دار نشان داد، اما این کاهش در

از آنجایی که شاخص بنیه بذر تابعی از طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و اندازه نهایی گیاهچه است، لذا با افزایش گرما و کاهش این صفات، شاخص بنیه بذر نیز کاهش می‌یابد (Basra *et al.*, 2005).

#### طول گیاهچه

اثرات ساده و متقابل تنش گرمایی در ژنوتیپ بر طول گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس در هر دو سطح زمانی ۶۰ دقیقه (۶۰') و ۹۰ دقیقه (۹۰') باعث کاهش معنی‌دار طول گیاهچه‌های آرابیدوپسیس ترا ریخته و غیر ترا ریخته نسبت به شرایط بدون تنش شد، اما گیاهان ترا ریخته حاوی تراژن آرتمین به‌طور معنی‌داری طول گیاهچه بلندتری نسبت به گیاهان غیر ترا ریخته داشته‌اند. در ۹۰ دقیقه (۹۰') تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس، طول گیاهچه  $art1=16,12$  و  $art2=16,69$  نسبت به گیاهان غیر ترا ریخته (۷/۶۴ میلی‌متر) اختلاف معنی‌داری نشان دادند (شکل ۱).

میزان کاهش طول گیاهچه ناشی از تنش گرمایی به-شدت تحت تأثیر دما، مدت زمان قرار گرفتن در معرض تنش، گونه و ژنوتیپ مورد آزمایش است. ۱۲ ساعت قرار گرفتن در معرض تنش گرمایی منجر به کاهش معنی‌دار میانگین طول بذر در فلفل شد (Utami and Aryanti, 2021). همچنین کاهش طول ساقه و ارتفاع گیاهچه نیز در برنج (Begcy *et al.*, 2018)، ذرت (Hussain *et al.*, 2014) و فلفل قرمز (Kumar *et al.*, 2019; Iloh *et al.*, 2014)

محتوای مالون‌دی آلدئید گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تحت شرایط تنش گرمایی محتوای مالون‌دی آلدئید در هر سه ژنوتیپ افزایش می‌یابد (جدول ۳).

در پژوهش حاضر، پایین‌ترین محتوای مالون‌دی آلدئید در شرایط بدون تنش گرمایی به دست آمد که در این شرایط رشدی گیاه هر سه ژنوتیپ WT، *art-1* و *art-2* بدون اختلاف معنی‌دار، به ترتیب به مقدار ۰/۳۸۹، ۰/۴۳۰ و ۰/۳۲۲ نانومول بر گرم وزن تر گیاه را نشان دادند. در مقابل بالاترین محتوای مالون‌دی آلدئید در شش ساعت پس از اعمال تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس مشاهده شد که در آن سه ژنوتیپ WT، *art-1* و *art-2* به ترتیب به مقدار ۴/۷۳۱، ۲/۴۹۴۰ و ۴/۳۰ نانومول بر گرم وزن تر گیاه را نشان دادند. نتایج حاصل از این بررسی‌ها نشان داد که در ژنوتیپ‌های تراریخته حاوی فرابیان تراژن آرتمین محتوای مالون‌دی آلدئید، به طور معنی‌داری در مقایسه با گیاه WT، در شرایط تنش کاهش یافته است.

تنش گرما باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و بروز تنش اکسیداتیو می‌شود که افزایش این رادیکال‌ها با آغاز واکنش‌های زنجیره‌ای، می‌تواند منجر به آسیب ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک شود (McCord, 2008). مالون‌دی-آلدئید فراوان‌ترین محصول حاصل از تجزیه لیپید آلدئیدی است. در واقع کاهش در پایداری غشا نشان‌دهنده پراکسیداسیون لیپیدی است. بنابراین، حفاظت از یکپارچگی غشاء مکانیسم اصلی برای مقاومت به تنش است (Crowe et al., 1992).

نتایج مشابهی را سایر پژوهشگران گزارش کرده‌اند که اثر تنش گرما در ژنوتیپ‌های حاوی چارون‌های مولکولی کوچک، و اثر متقابل آن‌ها اختلاف معنی‌داری را بر مقدار مالون‌دی آلدئید داشتند. به طور مثال، در پژوهشی مشابه، انتقال یک *sHSP (LIM HSP16.45-GFP)* به آرابیدوپسیس حاوی موتانت در *HSP17.6II* توانست سطح محتوای مالون‌دی آلدئید و هدایت الکتریکی در آرابیدوپسیس را کاهش دهد. سطح مالون‌دی آلدئید در لاین تراریخته *Limhsp16.45* حتی کم‌تر از شاهد بود (Yang et al., 2020). بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که

گیاهچه‌های تراریخته *art-2* با وزن تر ۰/۳۸۶ گرم و وزن خشک ۰/۰۳۰ گرم، و *art-1* با وزن خشک ۰/۰۳۰۶ گرم و وزن تر ۰/۳۸۰ گرم به طور معنی‌داری بالاتر از گیاهچه‌های غیرتراریخته با وزن تر ۰/۲۶۳ گرم و وزن خشک ۰/۰۲۰۵ گرم بود. با افزایش مدت زمان تنش ۴۵ درجه سلسیوس از ۶۰ دقیقه (۶۰') به ۹۰ دقیقه (۹۰')، وزن خشک و تر گیاهچه کاهش معنی‌داری یافت (شکل ۳ و ۴). به طوری که در ۹۰ دقیقه تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس وزن تر گیاهچه‌های تراریخته به ترتیب *art-1* با ۰/۳۴۱ و *art-2* با ۰/۳۵۹ گرم و گیاهچه‌های غیرتراریخته دارای وزن تر ۰/۱۵ گرم بودند. در اندازه‌گیری وزن خشک نیز گیاهچه‌های تراریخته تفاوت وزنی تقریباً ۱۰ برابری را نسبت به گیاهچه‌های غیرتراریخته در ۹۰ دقیقه (۹۰') اعمال تنش گرمایی داشتند، به طور کلی کم‌ترین میزان اثر منفی حاصل از تنش گرمایی بر وزن خشک ریشه‌چه، مربوط به گیاهان *art-1* با ۰/۰۲۴۲ و *art-2* با ۰/۰۲۶ گرم و در مقابل بیش‌ترین اثر منفی مربوط به گیاهان شاهد غیرتراریخته با ۰/۰۰۲ گرم بود (شکل ۳ و ۴). به طور کلی تراریخته‌های مستقل *art-1* و *art-2* در مقابل تنش گرمایی کم‌تر دچار کاهش رشد شده و توانستند در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته در مدت زمان وقوع تنش وزن تر و خشک گیاهچه بیش‌تری را تولید کنند. تنش گرمایی باعث ایجاد آبشار کلسیمی، آبشار کینازی و تجمع ABA می‌شود (Qi and Zhang, 2020) که این شرایط می‌تواند باعث تاخیر در تقسیم میتوزی (Kadota et al., 2012) و حتی منجر به مرگ سلولی شود (Vacca et al., 2004). علاوه بر این، در شرایط تنش گرمایی، شرایط کاهش متابولیسم و عدم تعادل در تحرک مواد مغذی، متلاشی شدن ساختارهای غشایی، کلروفیل و مولکول‌های پروتئین و همچنین جذب کم مواد مغذی رخ می‌دهد (Qaseem et al., 2019). تراریزش *sHSP 21* به آرابیدوپسیس باعث شد وزن خشک گیاه تراریخته پس از اعمال تنش ۴۰ درجه سلسیوس کاهش ۵۰ درصدی را نسبت به شرایط غیرتنش داشته باشد اما، این کاهش در گیاهان غیرتراریخته ۷۰ درصد مشاهده شد (Härndahl et al., 1999).

#### محتوای مالون‌دی آلدئید

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر تیمار تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس، ژنوتیپ و برهمکنش آن‌ها بر

می‌شود. در یک تحقیق با انتقال *PTHSP17.8* به گیاه آرابیدوپسیس و اعمال تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت و بازگشت به حالت عادی پس از چهار روز و بررسی مولفه‌های مرفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه، اگرچه هیچ تفاوت معنی‌داری در سطح آنزیم CAT بین لاین‌های تراریخته و گیاهان شاهد تحت شرایط طبیعی مشاهده نشد (Li et al., 2016)، اما تحت تنش گرمایی افزایش معنی‌دار فعالیت CAT در *pthsp17.8* تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده شد. این موارد نشان می‌دهد که فرا بیان *PTHSP17.8* باعث افزایش مقاومت به گرما در آرابیدوپسیس تراریخته شده است. انتقال ژن کدکننده پروتئین شوک حرارتی *limsHSP16.45* از گیاه لیلیوم *Lilium davidii* به گیاه آرابیدوپسیس منجر به افزایش مقاومت گیاه تراریخته در برابر استرس‌های محیطی از جمله شوری، اکسیداتیو، خشکی و دمای بالا گردید. آزمایشات مربوط به آنزیم‌ها نشان داد فرابیان ژن *limsHSP16.45* باعث افزایش فعالیت کاتالاز در گیاه تراریخته در شرایط تنش شد (Changjun et al., 2013). مطالعات نشان داده است که آسیب گیاهی تحت تنش گرما با افزایش تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد و بیان *limhsp16.45-GFP* باعث افزایش قابلیت زنده ماندن سلول‌های آرابیدوپسیس و فعالیت آنزیمی CAT تحت استرس اکسیداتیو می‌شود (Yang et al., 2020).

#### بررسی محتوای پروتئین محلول کل

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمار تنش گرمایی، ژنوتیپ و برهمکنش آن‌ها بر محتوای پروتئین محلول کل در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین این صفت نشان داد که تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس به مدت سه ساعت، محتوای پروتئین کل را در هر دو ژنوتیپ تراریخته و هم گیاه غیرتراریخته افزایش داد (جدول ۳)، اما، پس از اعمال تنش حرارتی ۴۵ درجه سلسیوس به مدت شش ساعت محتوای پروتئین کل در هر سه ژنوتیپ مورد مطالعه (*WT*, *art-1*, *art-2*) کاهش داشت. کاهش محتوای پروتئین محلول در این دما، در گیاهان غیرتراریخته، به‌طور معنی‌داری شدیدتر بود و دو لاین تراریخته حاوی تراژن آرتیمین (*art-1* با ۱۳۶۴ و *art-2* با ۱۲۳۰ میلی-گرم بر وزن تر گیاه *WT* محتوای پروتئین محلول کل بالاتری داشتند.

پروتئین‌های sHSP نقش مهمی در کنترل کیفیت غشای دارند و از این طریق به‌طور بالقوه در حفظ یکپارچگی غشایی، به‌ویژه در شرایط تنش کمک می‌کنند (Nakamoto and Vigh, 2007). از این رو، کاهش محتوای مالون‌دی‌آلدئید در ژنوتیپ‌های دارای فرابیان آرتیمین می‌تواند بیانگر نقش حفاظتی این پروتئین بر غشاهای سلولی باشد.

#### فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر تیمار تنش گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس، ژنوتیپ و برهمکنش آن‌ها بر فعالیت آنزیم CAT در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۳) تأثیر تیمار گرمایی ۴۵ درجه سلسیوس بر میزان فعالیت آنزیم CAT نشان داد که تنش گرمایی باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم CAT در گیاهان تراریخته نسبت به شاهد شده است. بررسی فعالیت آنزیم CAT نشان داد که در شرایط عدم تنش گرمایی فعالیت این آنزیم در سه ژنوتیپ یکسان بود (جدول ۳). در ژنوتیپ‌های موتانت در هر دو سطح زمانی (سه و شش ساعت) میزان فعالیت آنزیم CAT به‌طور معنی‌دار بالا بود و نسبت به *WT* افزایش معنی‌داری نشان داد. بررسی سرعت فعالیت آنزیم CAT نشان داد که بیش‌ترین سرعت فعالیت این آنزیم در تیمار دمایی شش ساعت پس از اعمال تنش ۴۵ درجه سلسیوس مربوط به ژنوتیپ‌های *art-1* و *art-2* به ترتیب با ۲/۲۸۲ و ۲/۲۸۳ واحد بر میلی-گرم پروتئین بود (جدول ۴). کم‌ترین سرعت فعالیت آنزیم CAT نیز در شرایط نرمال رشدی (به ترتیب *art-1* با ۰/۲۵۵، *art-2* با ۰/۲۵۸ و *WT* با ۰/۲۵۲) مشاهده شد. به‌طور کلی، سرعت فعالیت آنزیم در تمامی ژنوتیپ‌ها به صورت افزایشی بود. اما این افزایش در ژنوتیپ‌های تراریخته به صورت معنی‌داری بالاتر بود. نقش آنزیم آنتی‌اکسیدانی CAT عمدتاً مشارکت در حذف هیدروژن پراکسید تولیدشده در پراکسیزوم توسط اکسیدازهای درگیر در اکسیداسیون اسید چرب، و چرخه گلی‌اکسالات است. لذا، فعالیت این آنزیم شاخصه مهم فیزیولوژیک و معیاری برای ارزیابی تحمل تنش در گیاهان در نظر گرفته می‌شود (Kar and Mishra, 1976). CAT آنزیم تترامری است که شامل هم می‌باشد و باعث تبدیل  $H_2O_2$  به  $O_2$  و  $H_2O$

معنی داری در خصوص جوانه‌زنی بهینه در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته نشان دادند. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم CAT و محتوای مالون دی‌آلدئید و پروتئین محلول کل در این دو موتانت (جدول ۳)، مؤید نقش حفاظتی تراژن آرتمین بر این سه شاخص بود. این نتایج احتمالاً نشان‌دهنده یک مکانیسم و نقش ویژه پروتئین ART (همانند سایر Hspها) جهت محافظت پروتئین‌های سلولی و وجود همبستگی مابین فعالیت چپرونی آرتمین و جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین (از جمله پروتئین‌های دخیل در فرایند جوانه‌زنی و همچنین آنزیم‌ها) در پاسخ به تغییرات زیست-محیطی باشد. به‌علاوه نقش چپرول‌ها در مورد استرس گرمایی نیز با توجه به منافع اقتصادی آن به‌خصوص در مورد گیاهان زراعی مورد توجه واقع شده است و زمینه تحقیقات بیش‌تر را در حوزه‌ی مهندسی ژنتیک فراهم نموده است. کشف HSPs در گونه‌های مختلف جانوری و گیاهی، اصل عمومیت HSPs را نشان می‌دهد و اثرات آن‌ها پس از انتقال بین گونه‌های مختلف نشان‌دهنده مشابهت در عملکردهای آن‌ها است. SHSPها را می‌توان برای مهندسی گیاهان تراریخته با تحمل بالاتر نسبت به تنش‌های محیطی استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) به جهت پشتیبانی مالی از نویسنده مسئول و حمایت معنوی هسته پژوهشی تولید بذر گیاهان زراعی، باغی و داروئی دانشگاه گیلان به جهت همکاری علمی و ارائه امکانات تشکر و قدردانی می‌شود.

مطالعات نشان داده‌اند که سنتز پروتئین با تحمل به تنش ارتباط مثبت دارد و گیاهان متحمل به گرما میزان سنتز پروتئین بالاتر و میزان تخریب پروتئین پایین‌تری نسبت به گیاهان غیر متحمل دارند (Pastenes and Horton, 1996). بدیهی است که از یکی از نشانه‌های پاسخ به تنش گرمایی کاهش سنتز پروتئین‌های معمولی و افزایش سنتز پروتئین‌های شوک گرمایی است (Bray, 2000). همچنین گزارش شده است که پروتئین‌های شوک حرارتی با محافظت از آنزیم‌ها و اسیدهای نوکلئیک در برابر دناتوره شدن و تحمل گیاه به تنش گرما نقش دارند (Salisbury and Ross, 1992).

مهندسی ژنتیک از کارآمدترین روش‌ها در ارتقاء بهره‌وری محصولات زراعی است که این امر با افزایش توانایی آن‌ها در مقاومت یا تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی همراه است (Kumar et al., 2019). درک مکانیسم‌های مولکولی پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی مانند گرما، خشکی و شوری پیش‌نیاز برای دستکاری گیاهان برای بهبود تحمل استرس و بهره‌وری است (Lata et al., 2011). ژنومیکس کارکردی ابزاری کارآمدی در این خصوص است که به محققان امکان دستکاری جداگانه و تکی هر کدام از عوامل مولکولی دخیل را فراهم می‌کند. از جمله تکنیک‌های عملی مهم در این خصوص فرابیان و یا خاموشی یک ژن و بررسی پاسخ نتاج است. برای مثال، مهندسی تحمل به تنش گرمایی با فرا بیان HSPها و HSF انجام شده است (Malik et al., 1999). در مطالعه حاضر تراژن آرتمین که از خانواده SHSPها می‌باشد به گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا ترانسفورم شد. دو رویداد مستقل انتقال ژن (*art-1*, *art-2*) تحت شرایط تنش گرمایی مقاومت

### منابع

- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L. 1986. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature*, 323: 560-564. (Journal)
- Bajji, M., Kinet, J.M. and Lutts, S. 2002. Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedling growth, and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Canadian journal of botany*, 80: 297-304. (Journal)
- Basra, S., Afzal, I., Rashid, R. and Hameed, A. 2005. Inducing salt tolerance in wheat by seed vigor enhancement techniques. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2: 173-179. (Journal)
- Begcy, K., Sandhu, J. and Walia, H. 2018. Transient heat stress during early seed development primes germination and seedling establishment in rice. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1768. (Journal)
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254. (Journal)

- Bray, E.A. 2000. Response to abiotic stress. *Biochemistry and molecular biology of plants*, 1158-1203. **(Journal)**
- Changjun, L., Liang, B., Shengwei, T. and Enze, M. 2013. Effects of orifice orientation and gas-liquid flow pattern on initial bubble size. *Chinese Journal of Chemical Engineering* , 21: 1206-1215. **(Journal)**
- Clegg, J.S. 2007. Protein stability in *Artemia* embryos during prolonged anoxia. *The Biological Bulletin*, 212: 74-81. **(Journal)**
- Clegg, J.S., Willisie, J.K. and Jackson, S. A. 1999. Adaptive significance of a small heat shock/ $\alpha$ -crystallin protein (p26) in encysted embryos of the brine shrimp, *Artemia franciscana*. *American Zoologist*, 39: 836-847. **(Journal)**
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. 1992. Anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 54: 579-599. **(Journal)**
- Efeoğlu, B. 2009. Heat shock proteins and heat shock response in plants. *Gazi University Journal of Science*, 22: 67-75. **(Journal)**
- Fahad, S., Bajwa, A.A., Nazir, U., Anjum, S.A., Farooq, A., Zohaib, A. and Saud, S. 2017. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in plant science*, 1147. **(Journal)**
- Ferrer, M., Traverso, C., Cilloniz, C., Gabarrus, A., Ranzani, O.T., Polverino, E., Liapikou, A., Blasi, F. and Torres, A. 2018. Severe community-acquired pneumonia: Characteristics and prognostic factors in ventilated and non-ventilated patients. *PloS one*, 13: e0191721. **(Journal)**
- Finch-Savage, W.E. and Bassel, G.W. 2016. Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *Journal of experimental botany*, 67: 567-591. **(Journal)**
- Formentin, E., Sudiro, C., Ronci, M.B., Locato, V., Barizza, E., Stevanato, P., Ijaz, B., Zottini, M., De Gara, L. and Lo Schiavo, F. 2018. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signature and innate antioxidative profile make the difference between sensitivity and tolerance to salt in rice cells. *Frontiers in plant science*, 9: 1549. **(Journal)**
- Granier, C., Massonnet, C., Turc, O., Muller, B., Chenu, K. and Tardieu, F. 2002. Individual leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a stable thermal-time-based programme. *Annals of botany*, 89: 595-604. **(Journal)**
- Härndahl, U., Hall, R.B., Osteryoung, K.W., Vierling, E., Bornman, J. F. and Sundby, C. 1999. The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell stress and chaperones*, 4: 129. **(Journal)**
- Hatfield, J.L., Antle, J., Garrett, K.A., Izaurralde, R.C., Mader, T., Marshall, E., Nearing, M., Philip Robertson, G. and Ziska, L. 2020. Indicators of climate change in agricultural systems. *Climatic Change*, 163: 1719-1732. **(Journal)**
- Heath, R.L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125: 189-198. **(Journal)**
- Hofmann, N.R. 2009. The plasma membrane as first responder to heat stress. *The Plant Cell*, 21: 2544-2544. **(Journal)**
- Hussain, H.A., Men, S., Hussain, S., Chen, Y., Ali, S., Zhang, S., Zhang, K., Li, Y., Xu, Q. and Liao, C. 2019. Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. *Scientific reports*, 9: 1-12. **(Journal)**
- Iloh, A., Omatta, G., Ogbadu, G. and Onyenekwe, P. 2014. Effects of elevated temperature on seed germination and seedling growth on three cereal crops in Nigeria. *Scientific research and essays*, 9: 806-813. **(Journal)**
- IPCC, 2018. Summary for Policymakers. In: *Global Warming of 1.5°C*. (An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty). **(Report)**
- Jiang, C., Xu, J., Zhang, H., Zhang, X., Shi, J., Li, M. and Ming, F. 2009. A cytosolic class I small heat shock protein, RcHSP17. 8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 32: 1046-1059. **(Journal)**

- Kadota, Y. and Shirasu, K. 2012. The HSP90 complex of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(3): 689-697. **(Journal)**
- Kar, M. and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant physiology*, 57: 315-319. **(Journal)**
- Koo, H.J., Park, S.M., Kim, K.P., Suh, M.C., Lee, M.O., Lee, S.K., Xinli, X. and Hong, C. B. 2015. Small heat shock proteins can release light dependence of tobacco seed during germination. *Plant Physiology*, 167: 1030-1038. **(Journal)**
- Kumar, M., Padula, M. P., Davey, P., Pernice, M., Jiang, Z., Sablok, G. and Ralph, P. J. 2017. Proteome analysis reveals extensive light stress-response reprogramming in the seagrass *Zostera muelleri* (Alismatales, *Zosteraceae*) metabolism. *Frontiers in plant science*, 7: 2023.
- Kumar, M., Liu, Y., Katul, G.G. and Porporato, A.M. 2019. Detecting Climate-Stress Induced Forest Mortality Before the Canonical Symptoms Appear. In "AGU Fall Meeting Abstracts", Vol. 2019, pp. B13K-2608. **(Journal)**
- Lata, C., Yadav, A. and Prasad, M. 2011. Role of plant transcription factors in abiotic stress tolerance. *Abiotic Stress Response in Plants*, INTECH Open Access Publishers, 8(10): 269-296. **(Journal)**
- Li, J., Zhang, J., Jia, H., Li, Y., Xu, X., Wang, L. and Lu, M. 2016. The *Populus trichocarpa* PtHSP17. 8 involved in heat and salt stress tolerances. *Plant cell reports*, 35: 1587-1599. **(Journal)**
- Liberek, K., Lewandowska, A. and Ziętkiewicz, S. 2008. Chaperones in control of protein disaggregation. *The EMBO journal*, 27: 328-335. **(Journal)**
- Lindquist, S. and Craig, E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22: 631-677. **(Journal)**
- Lobell, D.B. and Asner, G.P. 2003. Climate and management contributions to recent trends in US agricultural yields. *Science*, 299: 1032-1032. **(Journal)**
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2: 176-177. **(Journal)**
- Malik, M.K., Slovin, J.P., Hwang, C.H. and Zimmerman, J.L. 1999. Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, *Hsp17. 7*, results in increased or decreased thermotolerance. *The Plant Journal*, 20: 89-99. **(Journal)**
- McCord, J.M. 2008. Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves. *Dose-Response*, 6: 8-012. **(Journal)**
- Nadia, A. and Hanaa, A. 2019. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Aboul-Maaty and Oraby Bulletin of the National Research Centre*, 43: 43-25. **(Journal)**
- Nakamoto, H. and Vigh, L. 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 294-306. **(Journal)**
- Pastenes, C. and Horton, P. 1996. Effect of high temperature on photosynthesis in beans (II. CO<sub>2</sub> assimilation and metabolite contents). *Plant Physiology*, 112: 1253-1260. **(Journal)**
- Pourmohammad, Z.K. 2021. The role of artemin in (*Arabidopsis thaliana*) response to abiotic stresses. Master Dissertation, University of Guilan, Faculty of Agricultural Sciences, Department of Agricultural Biotechnology Iran. (In Persian) **(Thesis)**
- Qaseem, M.F., Qureshi, R. and Shaheen, H. 2019. Effects of pre-anthesis drought, heat and their combination on the growth, yield and physiology of diverse wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes varying in sensitivity to heat and drought stress. *Scientific reports*, 9: 1-12. **(Journal)**
- Qi, F. and Zhang, F. 2020. Cell cycle regulation in the plant response to stress. *Frontiers in plant science*, 10: 1765. **(Journal)**
- Queitsch, C., Sangster, T.A. and Lindquist, S. 2002. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 417: 618-624. **(Journal)**
- Ramana, S., Biswas, A., Kundu, S., Saha, J. and Yadava, R. 2002. Effect of distillery effluent on seed germination in some vegetable crops. *Bioresource technology*, 82(3): 273-275. **(Journal)**
- Reinking, L. 2007. Imagej basics. *Word Journal Of The International Linguistic Association*, 1-22. **(Journal)**
- Rezayian, M., Niknam, V. and Ebrahimzadeh, H. 2018. Effects of drought stress on the seedling growth, development, and metabolic activity in different cultivars of canola. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64: 360-369. **(Journal)**

- Sable, A. and Agarwal, S.K. 2018. Plant heat shock protein families: essential machinery for development and defense. *Journal of Biological Sciences and Medicine*, 4: 51-64. **(Journal)**
- Saidi, Y., Finka, A. and Goloubinoff, P. 2011. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *New phytologist*, 190: 556-565. **(Journal)**
- Sarkar, N. K., Kotak, S., Agarwal, M., Kim, Y.-K. and Grover, A. 2020. Silencing of class I small heat shock proteins affects seed-related attributes and thermotolerance in rice seedlings. *Planta*, 251: 1-16. **(Journal)**
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Co. Inc. California. **(Book)**
- Shahangian, S.S., Rasti, B., Sajedi, R.H., Khodarahmi, R., Taghdir, M. and Ranjbar, B. 2011. Artemin as an efficient molecular chaperone. *The protein journal*, 30: 549-557. **(Journal)**
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N. and Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology letters*, 6: 1025-1037. **(Journal)**
- Takaloo, Z., Masroor, M.J., Mani-Varnosfaderani, A., Maroufi, B. and Sajedi, R.H. 2020. Probing heat and oxidation induced conformational changes of molecular chaperone artemin by excitation-emission fluorescence spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 211: 112013. **(Journal)**
- Takaloo, Z., Sajedi, R.H., Hosseinkhani, S. and Asghari, S.M. 2016. Real-time monitoring of artemin in vivo chaperone activity using luciferase as an intracellular reporter. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 610: 33-40. **(Journal)**
- Takaloo, Z., Sajedi, R.H., Hosseinkhani, S. and Moazzenzade, T. 2017. Artemin protects cells and proteins against oxidative and salt stress. *International journal of biological macromolecules*, 95: 618-624. **(Journal)**
- Utami, D. and Aryanti, E. 2021. Impact of heat stress on germination and seedling growth of chili pepper (*Capsicum annum L.*). In "IOP Conference Series: Earth and Environmental Science", 637:12032. **(Journal)**
- Vacca, R.A., De Pinto, M.C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E. and De Gara, L. 2004. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant physiology*, 134: 1100-1112. **(Journal)**
- Wang, M., Zou, Z., Li, Q., Sun, K., Chen, X. and Li, X. 2017. The CsHSP17. 2 molecular chaperone is essential for thermotolerance in *Camellia sinensis*. *Scientific reports*, 7: 1-15. **(Journal)**
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9: 244-252. **(Journal)**
- Waters, E.R., Lee, G.J. and Vierling, E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47: 325-338. **(Journal)**
- Willsie, J.K. and Clegg, J.S. 2001. Nuclear p26, a small heat shock/ $\alpha$ -crystallin protein, and its relationship to stress resistance in *Artemia franciscana* embryos. *Journal of Experimental Biology*, 204: 2339-2350. **(Journal)**
- Yan, A., Wu, M., Yan, L., Hu, R., Ali, I. and Gan, Y. 2014. AtEXP2 is involved in seed germination and abiotic stress response in Arabidopsis. *PloS one*, 9: 85208. **(Journal)**
- Yang, R., Yu, G., Li, H., Li, X. and Mu, C. 2020. Overexpression of small heat shock protein LimHSP16. 45 in Arabidopsis hsp17. 6II mutant enhances tolerance to abiotic stresses. *Russian journal of plant physiology*, 67: 231-241. **(Journal)**
- Zeinoddini, M., Khajeh, K., Hosseinkhani, S., Saedinia, A.R. and Robotjazi, S.M. 2013. Stabilisation of recombinant aequorin by polyols: activity, thermostability and limited proteolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170: 273-280. **(Journal)**
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W. and Chua, N.H. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature protocols*, 1: 641-646. **(Journal)**
- Zhou, Y., Chen, H., Chu, P., Li, Y., Tan, B., Ding, Y., Tsang, E.W., Jiang, L., Wu, K. and Huang, S. 2012. NnHSP17. 5, a cytosolic class II small heat shock protein gene from *Nelumbo nucifera*, contributes to seed germination vigor and seedling thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant cell reports*, 31: 379-389. **(Journal)**





## Improvement of physiological and biochemical properties of *Arabidopsis thaliana* by transfer of Artemin transgene

Tayebe Fallahi-Pashaki<sup>1</sup>, Mohammad Mahdi Sohani<sup>2\*</sup>, Reza Shirzadian-Khoramabad<sup>3</sup>

Received: October 21, 2022

Accepted: December 31, 2022

### Abstract

High temperatures causes serious damage to plants, including disruption of cell hemostasis, slowness or stagnation of growth and development, and even death. When plants are exposed to high temperatures, heat shock proteins (HSP) are induced in the cell. Among HSPs are Small heat shock proteins (sHSP), which act as chaperones. They bind to proteins that have been exposed to heat stress and prevent them from incorrectly folding. The Artemin protein isolated from *Artemia urmiana* has a  $\alpha$ -crystallin domain, which is characteristic of sHSP. In order to characterize the functional genomic roles of the protein in plants, artemin gene was transferred to *Arabidopsis*. A statistical analysis using the factorial design method was performed including two independent transgenic genotypes (*art-1* and *art-2*) along with a wild genotype Col-0 under heat stress at 45°C. Results showed that the interaction between heat stress factors and genotypes was significant at the 1% level for most traits including germination, seedling wet and dry weight, seedling length, total protein content, catalase enzyme activity, and malondialdehyde content. All the components of germination were adversely affected by the application of heat stress. However, the transgenics still had a significantly higher seed germination and plant growth than the wild-type plants. As a result of heat stress, transgenic plants had significantly higher catalase enzyme activity and total protein content, and lower malondialdehyde levels compared with wild type plants. The results indicated that Artemin transgen in plants may cause significantly higher plant resistance to heat stress and increase plant yield.

**Keywords:** Abiotic stress; Artemin; Seed germination; sHSP; Total protein content

### How to cite this article

Fallahi-Pashaki, T., Sohani, M.M. and Shirzadian-Khoramabad, R. 2023. Improvement of physiological and biochemical properties of *Arabidopsis thaliana* by transfer of Artemin transgene. Iranian Journal of Seed Science and Research, 9(4): 75-91. (In Persian)(Journal)

DOI: [10.22124/jms.2023.6172](https://doi.org/10.22124/jms.2023.6172)

### COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit <http://jms.guilan.ac.ir/>

1. PhD student of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. [t.fallahei@yahoo.com](mailto:t.fallahei@yahoo.com)

2. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. [mhdsohani@gmail.com](mailto:mhdsohani@gmail.com)

2. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. [r.shirzadian@gmail.com](mailto:r.shirzadian@gmail.com)

\*Corresponding author: [mhdsohani@gmail.com](mailto:mhdsohani@gmail.com)