

## اثر تنش شوری بر برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان تراریخته گوجه‌فرنگی نسل T<sub>3</sub> حاوی ژن *cryIAb*

خدیدجه عباس‌زاده<sup>۱</sup>، رضا شیرزادیان خرم‌آباد<sup>۲\*</sup>، محمدمهدی سوهانی<sup>۲</sup> و زهرا حاجی‌احمدی<sup>۳</sup>

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

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

۳- دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳)

### چکیده

تنش شوری بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان تأثیرگذار است. گیاهان تراریخته Bt نقش بسزایی در کنترل آفات برخی از محصولات استراتژیک دارند، اما توان و مقاومت این گیاهان از منظر تنش‌های محیطی مورد توجه قرار نگرفته است؛ بنابراین اثر تنش شوری در سطوح ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار بر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان تراریخته نسل T<sub>3</sub> گوجه‌فرنگی حاوی ژن *cryIAb* (CH-Falat-Bt) همراه با رقم غیرتراریخته (CH-Falat) مورد بررسی قرار گرفت. بررسی صفات مورفولوژیک (سطح برگ، عمق ریشه، وزن تر و خشک ریشه) در سطوح مختلف شوری حاکی از برتری گیاه تراریخته CH-Falat-Bt بر غیرتراریخته CH-Falat بود. میزان محتوای آب نسبی گیاه و کاروتنوئید در گیاهان تراریخته به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان غیرتراریخته بود. محتوای کلروفیل در سطوح تنش شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار به ترتیب ۱۲ و ۹ درصد بیشتر از غیرتراریخته بود. نشت الکترولیت در گیاهان تراریخته نسبت به غیرتراریخته به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش داشت. تجمع پرولین و قندهای محلول در گیاهان تراریخته به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد. بیان نسبی ژن‌های *SOS1* و *SOS2* با افزایش میزان تنش شوری در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسبت به گیاهان غیرتراریخته CH-Falat افزایش قابل‌توجهی نشان داد. نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی نشان داد که اثرات نامطلوب تنش شوری گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسبت به غیرتراریخته کمتر بود و در مجموع، در مقایسه با ژنوتیپ غیر تراریخته، گیاهان تراریخته به سطوح مختلف شوری اعمال شده متحمل هستند.

واژگان کلیدی: تنش شوری، گوجه‌فرنگی، Bt، *cryIAb*، *SOS1*، *SOS2*

\* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: r.shirzadian@guilan.ac.ir

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.)، یکی از مهم‌ترین محصولات گیاهی است که در سراسر جهان کشت می‌شود (Abdeldym *et al.*, 2020). این محصول حاوی آنتی‌اکسیدان لیکوپن، ویتامین A (بتا کاروتن)، ویتامین C (اسید آسکوربیک)، ویتامین B و حاوی مقادیر نسبتاً پایین قند، چربی و پروتئین می‌باشد (Bergougnoux, 2014). گوجه‌فرنگی همچنین منبع مهم ترکیبات فنولی، مانند فلاونوئیدها می‌باشد (Raiola *et al.*, 2014).

شوری آب و خاک یک مشکل جدی جهانی است که به‌طور قابل‌توجهی رشد، کیفیت محصولات، توسعه پایدار و امنیت جهانی غذا را تهدید می‌کند (Abdeldym *et al.*, 2020). گیاهان به تنش شوری، با استفاده از مکانیسم‌های مختلف از جمله، تنظیم جذب و جابجایی  $Na^+$ ، فعال کردن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، تجمع املاح سازگار، تنظیم اسمزی، تنظیم سنتز هورمون‌های گیاهی و القای آبشارهای مختلف پیام‌دهی تنش پاسخ می‌دهند (Nazari Khakshoor *et al.*, 2022; Khan *et al.*, 2019; Salami *et al.*, 2016). برخی از ژن‌ها و پروتئین‌های کلیدی در یک سری از مسیرهای تنظیمی دخیل هستند (Zhu, 2016). این عوامل تنظیمی، نقش کلیدی در کنترل جذب یون‌های نمک، انتقال یون، رشد و تکامل سلول‌ها و بافت‌ها دارند (Xie *et al.*, 2022). یکی از این عوامل تنظیمی، مسیر انتقال سیگنال (Salt Overly) (Sensitive SOS) است. مسیر SOS از سه پروتئین SOS1، SOS2 و SOS3 تشکیل شده است (Shi *et al.*, 2003). تعامل بین این پروتئین‌ها در نهایت منجر به افزایش خروجی  $Na^+$  از غشای پلاسمایی و کاهش سمیت یون  $Na^+$  می‌شود (Khan *et al.*, 2019).

از بزرگ‌ترین دستاوردهای کشاورزی، توسعه محصولات حاوی ژن‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* مقاوم به حشرات (محصولات Bt) با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک در گیاهان می‌باشد (Peng *et al.*, 2019; Samal and

(Rout, 2018). Bt یک پروتئین کریستالی است که توسط ژن *cry* باکتری *B. thuringiensis* تولید می‌شود و به‌عنوان یک حشره‌کش در کنترل جمعیت برخی آفات مانند پروانه‌ها، سوسک‌ها، دوبالان و کنه‌ها استفاده می‌شود. محصولات Bt بیش از دو دهه است که به‌صورت تجاری کشت می‌شوند و تأثیر عوامل محیطی، بیشتر در محتوای پروتئین Bt در گیاه، میزان اثربخشی محصولات Bt در کنترل آفات و میزان مرگ‌ومیر آن بررسی شده است؛ درحالی‌که تأثیر مستقیم تنش‌های محیطی بر تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در این گیاهان بررسی نشده است. مطالعات محدود موجود، عمدتاً بر روی پنبه Bt متمرکز و به سایر محصولات تراریخته توجه اندکی شده است (Girón-Calva *et al.*, 2020).

بر اساس مطالعات قبلی، گیاهان تراریخته استفاده شده در این پژوهش به برخی آفات راسته Lepidoptera متحمل می‌باشند (Hajiahmadi *et al.*, 2020). در این مطالعه گوجه‌فرنگی تراریخته CH-Falat-Bt حاوی ژن *cryIAb* و گیاهان غیرتراریخته CH-Falat در مراحل اولیه رشد، تحت تنش شوری با غلظت‌های مختلف NaCl، ۰، ۵۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار، قرار داده شدند و وضعیت تحمل گیاهان تراریخته گوجه‌فرنگی CH-Falat-Bt با بررسی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در مقایسه با گیاهان شاهد مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج گزارش‌شده در این مطالعه، گیاهان تراریخته گوجه‌فرنگی نسبت به گیاهان غیر تراریخت (واريته مشتق شده از آن) در مواجهه با تنش شوری متحمل‌تر هستند.

### مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** در این مطالعه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) واریته CH-Falat (پاکان بذر، اصفهان) و گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسل T<sub>3</sub> حاوی ژن *cryIAb* (Hajiahmadi *et al.*, 2020) مورد استفاده قرار گرفتند.

**شناسایی گیاهان تراریخته نسل T<sub>3</sub> مقاوم به جنتامایسین و بررسی حضور و بیان ژن *cryIAb*:** ابتدا بذرهای گوجه‌فرنگی تراریخته نسل T<sub>3</sub> (CH-Falat-Bt) با هیپوکلیت سدیم ۳

**اعمال سطوح مختلف شوری بر گیاهان:** گیاهچه‌های CH-Falat و CH-Falat-Bt نسل T<sub>3</sub> به گلدان‌های حاوی کوکوپیت - پرلایت به نسبت ۱:۱ منتقل و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره روشنایی ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت و رطوبت ۶۵-۵۵ درصد تا مرحله ۴ تا ۶ برگی نگهداری و با محلول غذایی (هوگلند) تغذیه شدند. بعد از استقرار گیاه، تیمار شوری در غلظت‌های مختلف NaCl شامل ۰، ۵۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار همراه با محلول غذایی هوگلند به مدت ۲۱ روز اعمال شد. این مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار (هر تکرار شامل ۴ گلدان و هر گلدان شامل یک گیاه)، در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گیلان در سال ۱۴۰۱ انجام شد.

درصد ضد عفونی و سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس گیاهان تراریخته، در محیط کشت 1/2 MS حاوی ۱۰۰ μl/ml جتتامایسین غربال شدند. استخراج DNA ژنومی به روش دلپرتا (Dellaporta *et al.*, 1983) انجام و سپس حضور ژن *cryIAb* و پیشبر *MPI* (القاء شونده توسط زخم) توسط PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن‌ها (جدول ۱) طبق برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جدول شماره ۲ با دستگاه ترموسیکلر (BioRad Co., USA) انجام شد. استخراج RNA کل از برگ گیاهان مذکور با کیت استخراج RNA دناریست (مشهد، ایران) و فرآیند ساخت cDNA توسط کیت Reverse Aid First Strand cDNA Synthesis شرکت فرمتاز (آمریکا) صورت گرفت. واکنش RT-PCR توسط آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) ژن *cryIAb* بر مبنای برنامه PCR (جدول ۲) انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی در واکنش PCR

Table 1. The sequence of specific forward and reverse primers

نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer sequence	طول قطعه تکثیر Amplicon length (bp)	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing Tm (°C)
<i>cryIAb</i>	F: 5'-GGCGGCGAGAGGATCGAGAC-3' R: 5'-TCGGCGGGACGTTGTGTTTC-3'	1194	62
<i>MPI</i>	F: 5'-TTTAGGTTCTACACAAAACCCTC-3' R: 5'-TCTAGACCGGACCAGTTGACGA-3'	886	64
<i>Slactin2</i>	F: 5'-GTCGGCCACAAGTCATCATC-3' R: 5'-TCACCCACATACGCATCCTT-3'	245	63
<i>SISOS1</i>	F: 5'-AGGTGTCCATGCTGCTAGTT-3' R: 5'-ACCAGTTCGTTCCACATCCT-3'	250	57
<i>SISOS2</i>	F: 5'-TCCGCTTTGTTTGACAGACG-3' R: 5'-CAGCCCTATTTGCCGTTACC-3'	175	63

جدول ۲- برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) و Real-Time qPCR

Table 2. PCR and Real-Time qPCR cycles

نام ژن Gene name	واکنش Reaction	برنامه PCR PCR program
<i>MPI</i>	PCR	95°C:5min+35 (94°C:45s, 64°C:1min, 72°C:1min)+ 72°C:5min
<i>cryIAb</i>	PCR, RT-PCR	95°C:5min+35 (94°C:45s, 62°C:1min, 72°C:1min)+ 72°C:5min
<i>Slactin2</i>	Real- Time qPCR	95°C:12min+40 (95°C:15s, 63°C:30s, 72°C:30s)
<i>SISOS1</i>	Real- Time qPCR	95°C:12min+40 (95°C:15s, 63°C:30s, 72°C:30s)
<i>SISOS2</i>	Real- Time qPCR	95°C:12min+40 (95°C:15s, 63°C:30s, 72°C:30s)

اندازه‌گیری ویژگی‌های رشد: بعد از اعمال تنش شوری، برخی ویژگی‌های رشدی مانند سطح برگ، عمق ریشه، وزن تر و خشک ریشه مورد بررسی قرار گرفت. سطح برگ با نرم‌افزار WinDIAS (delta CO., UK) (نسخه ۳/۳) برحسب سانتی‌متر مربع اندازه‌گیری شد. عمق ریشه، برحسب سانتی‌متر یادداشت شد. برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک ریشه‌ها، در ابتدا وزن تر ریشه با کمک ترازوی دیجیتال (Sartorius, Germany) (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری و سپس نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در آون قرار گرفتند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

**اندازه‌گیری نشت الکترولیت (Electrolyte leakage):** ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های تازه گیاه انتخاب و در لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب استریل قرار داده شدند. سپس لوله‌ها به مدت ۲ ساعت در بن‌ماری با دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و هدایت الکتریکی نمونه‌ها توسط دستگاه EC متر (Dintok, PT-202, Germany) خوانده شد (EC1). سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند و بعد از سرد شدن، مجدد هدایت الکتریکی آن با EC متر خوانده شد (EC2). میزان نشت الکترولیت توسط رابطه ۱ برحسب درصد بیان شد (Ben Hamed *et al.*, 2007).

$$\text{معادله (۱)} \quad \text{EL} = (\text{EC1} / \text{EC2}) \times 100$$

**اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC):** برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ، از روش ترکان و همکاران (Türkan *et al.*, 2005) استفاده شد. وزن تر آخرین برگ توسعه‌یافته هر گیاه تعیین، سپس نمونه‌ها در فالکن‌های حاوی آب مقطر غوطه‌ور و در دمای اتاق به مدت ۵ ساعت، در شدت نور کم نگهداری شدند. وزن حالت آماس نمونه‌های برگ‌گی اندازه‌گیری و در نهایت نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به آون منتقل و وزن خشک آن‌ها تعیین شد. سپس با استفاده از معادله زیر محتوای آب نسبی برگ برحسب درصد محاسبه شد.

$$\text{معادله (۲)} \quad \text{RWC (\%)} = (\text{وزن آماس} - \text{وزن تر}) / (\text{وزن تر} - \text{وزن خشک}) \times 100$$

**کلروفیل و کاروتنوئید:** اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کاروتنوئید با استفاده از روش لیچنتالر و بوشمن (Lichtenthaler and Buschmann, 2001) انجام پذیرفت. جذب مایع رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Biochrom, LibraS22, France) در طول موج‌های ۶۶۳/۲۰، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر به ترتیب برای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید خوانده و غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از رابطه‌های ۳، ۴، ۵ و ۶ برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد:

$$\text{معادله (۳)} \quad \text{Chla (mg/g FW)} = (12.25 \text{ A663.2} - 2.79 \text{ A646.8}) \times (\text{V/W})$$

$$\text{معادله (۴)} \quad \text{Chlb (mg/g FW)} = (21.50 \text{ A646.8} - 5.10 \text{ A663.2}) \times (\text{V/W})$$

$$\text{معادله (۵)} \quad \text{ChlT (mg/g FW)} = \text{Chla} + \text{Chlb}$$

$$\text{معادله (۶)} \quad \text{Car (mg/g FW)} = (((1000\text{A470} - (1.8 \text{ Chla}) - (85.02\text{Chlb}))/198) \times (\text{V} / \text{W}))$$

در این روابط Chla شامل کلروفیل a، Chlb کلروفیل b، ChlT کلروفیل کل، Car کاروتنوئید، V حجم نهایی عصاره در استون ۸۰ درصد و W وزن بافت گیاهی برای عصاره‌گیری برحسب گرم است.

**اندازه‌گیری قندهای محلول برگ:** ۰/۵ گرم از بافت برگ همراه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده و عصاره هموژن به فالکن منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf 5417R, Germany) شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۳ میلی‌لیتر آنترون (۰/۱۵) میلی‌گرم آنترون در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۷۲ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب در حال جوش قرار داده شد، سپس جذب در ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و محتوای قندهای محلول برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تازه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید (Irigoyen *et al.*, 1992).

تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴)، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۶) استفاده شد.

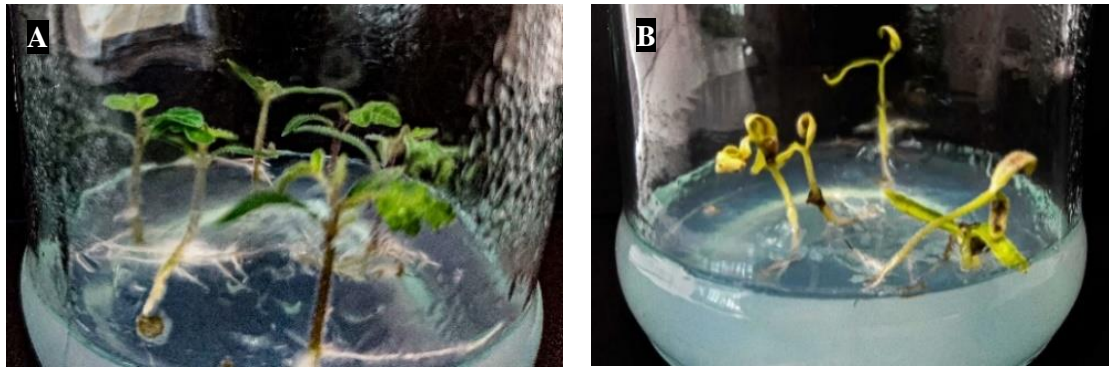
### نتایج و بحث

گزینش گیاهچه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین: پس از کاشت بذره‌های گوجه‌فرنگی تراریخته نسل  $T_3$  (CH-Falat-Bt) در محیط کشت 1/2 MS، گیاهچه‌های حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در محیط حاوی جنتامایسین ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) رشد کردند (Hayford et al., 1988) و سبز ماندند (شکل ۱A)؛ درحالی‌که گیاهان فاقد ژن مذکور، آلبینو شده و از نظر ظاهری از گیاهان تراریخته قابل تشخیص بودند (شکل ۱B). حضور ژن *cryIAb* و پیش‌بر *MPI* در گیاهچه‌های مقاوم به جنتامایسین، حاوی سازه *pPZP122:MPI:cryIAb*، با PCR بیان ژن فوق نیز با RT-PCR مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲).

اندازه‌گیری ویژگی‌های رشد: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد (جدول ۳) که صفات مورد بررسی شامل سطح برگ، عمق ریشه و وزن تر و خشک ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار است. اثر متقابل ژنوتیپ  $\times$  تنش شوری در صفات سطح برگ و عمق ریشه معنی‌دار نشد. مطابق با نتایج مقایسه میانگین، با افزایش سطح تنش شوری، میزان سطح برگ کاهش معنی‌داری نشان داد. روند کاهش در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسبت به گیاهان غیرتراریخته به‌طور معنی‌داری کمتر بود. میزان سطح برگ در گیاهان تراریخته نسبت به غیرتراریخته در سطوح تنش ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار شوری به‌ترتیب به میزان ۸، ۱۵، ۲۰ و ۲۶ درصد افزایش داشت.

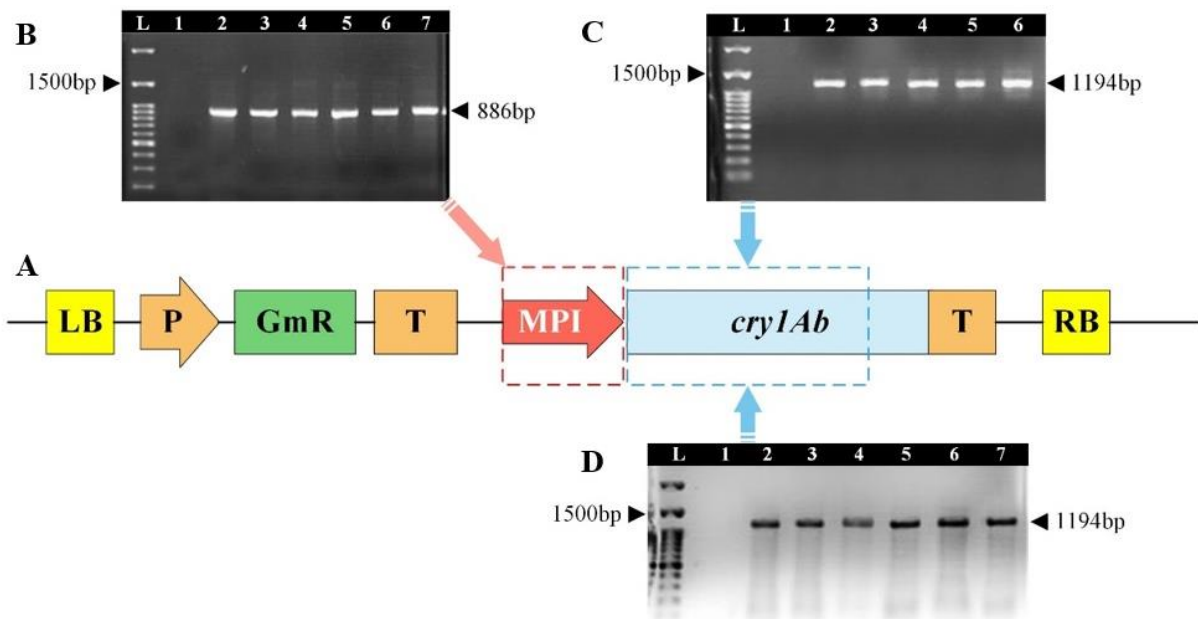
اندازه‌گیری میزان پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین برگ از روش بیتس و همکاران استفاده شد (Bates et al., 1973). پس از تشکیل مایع رویی رنگی، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۲۰ نانومتر خوانده و میزان پرولین بر اساس منحنی استاندارد پرولین برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تازه گیاه تعیین شد.

مقایسه بیان ژن‌های *SOS1* و *SOS2* با Real-Time qPCR: استخراج RNA از نمونه‌های برگ با کیت استخراج دنازیست انجام شد. بررسی کمی و کیفی RNA به‌ترتیب توسط دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, USA) و ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA، جهت حذف DNA ژنومی از آنزیم DnaseI (Fermentas, USA) به مدت یک ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  استفاده شد و در نهایت سنتز cDNA صورت گرفت. الگوی بیان نسبی ژن‌های *SOS1* و *SOS2* با فرایند Real-Time qPCR در سه تکرار فنی با دستگاه ترموسایکلر (Qiagen, Germany) با آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) برای گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسل  $T_3$  و غیرتراریخته CH-Falat در ۵ سطح شوری بررسی و واکنش با شرایط دمایی جدول ۲ انجام شد. بدین منظور میزان بیان نسبی با روش  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  محاسبه گردید (Livak and Schmittgen, 2001). برای بررسی میزان کارایی آغازگرها، در ابتدا از cDNA گیاه شاهد سری رقت تهیه شد و برای هر ژن در سه تکرار واکنش Real-Time انجام شد و از  $C_T$ ‌های حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم منحنی استفاده شد و کارایی واکنش (E) به‌دست آمد. در این آزمایش از ژن *Slactin2* (ژن *actin2* در *Solanum lycopersicum*) به‌عنوان ژن مینا جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده و میزان تغییرات بیان ژن‌های *SOS1* و *SOS2* در سطوح مختلف شوری در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان غیرتراریخته بررسی شد.



شکل ۱- بررسی گیاهان تراریخته و غیرتراریخته در محیط کشت 1/2 MS حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین. (A) گیاهان حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک سبز مانده و رشد کردند (B) گیاهان فاقد ژن مقاومت از بین رفتند.

Figure 1. Analysis of transgenic and non-transgenic plants in 1/2 MS medium containing gentamicin antibiotic. (A): The plants containing the antibiotic resistance gene grew adequately in a medium containing antibiotic. (B): The plants without the antibiotic-resistant gene died.



شکل ۲- تأیید مولکولی گیاهان تراریخته مقاوم به جنتامایسین. (A) نقشه فیزیکی کاست *pPZP122:MPI:cryIAb*: LB: مرز چپ، RB: مرز راست، P: پیشبر، T: ترمیناتور، GmR: ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، MPI: پیشبر القاء شونده با زخم. (B): تأیید حضور پیشبر MPI در گیاهان تراریخته، L: نشانگر، وزن مولکولی 100bp، نمونه‌های ۲-۷ حاوی ژن، ۱ گیاه شاهد. (C): تأیید حضور ژن *cryIAb* گیاهان تراریخته، L: نشانگر وزن مولکولی 100bp، نمونه‌های ۲-۶ حاوی ژن، ۱: گیاه شاهد (غیرتراریخته). (D): بیان ژن *cryIAb* با RT-PCR.

Figure 2. Molecular confirmation of gentamicin-resistant transgenic plants. (A): Physical map of the construct: LB, left border, pPZP122: MPI: cryIAb, RB: right border, P: promoter, T: terminator, GmR: gentamicin antibiotic resistance gene, MPI, Maize Proteinase Inhibitor: wound-inducible promoter. (B): Confirming the presence of MPI promoter in transgenic plants, L, ladder: 100 bp, 2-7 samples containing the gene, 1: control plant. (C): Confirming the *cryIAb* gene: transformed plants, L: 100bp, 2-6 samples containing the gene, 1: control plants (non-transgenic). (D): *cryIAb* gene expression using RT-PCR.

فقط در تنش‌های شدید شوری کاهش می‌یابند، اما در گونه‌های حساس و نیمه‌حساس ویژگی‌های رشد در تنش‌های کم شوری نیز کاهش یافتند. کاهش میزان رشد می‌تواند به دلیل دخالت در فرایندهای تولید انرژی مثل فتوسنتز و تنفس باشد (Ahmadi and Souri, 2018).

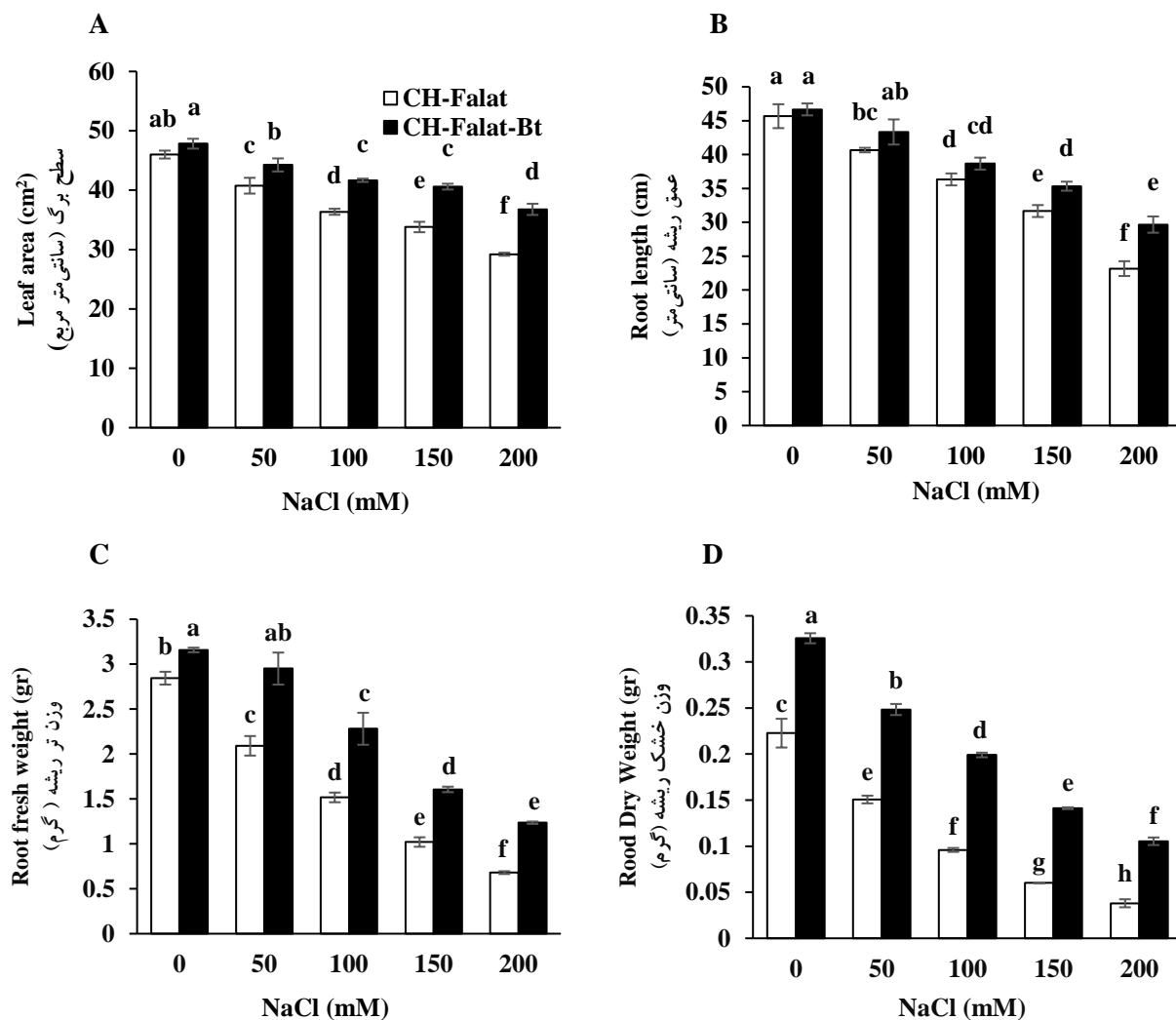
#### اندازه‌گیری نشت الکترولیت (Electrolyte leakage): نتایج

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنش شوری، ژنوتیپ و اثر متقابل آن‌ها در نشت الکترولیت در سطح یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۴). مقایسه میانگین‌ها نشان داد (شکل A۴) که گیاهان تراریخته در سطوح تنش شوری ۰ و ۵۰ میلی‌مولار با گیاهان غیرتراریخته اختلاف نداشتند؛ اما با افزایش سطح شوری، اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار شد. همان‌طور که نتایج نشان داد نشت الکترولیت در گیاهان تراریخته به مراتب کمتر از گیاهان غیرتراریخته بود به طوری که هدایت الکترولیتی در سطوح تنش شوری ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار در گیاهان تراریخته ۲۲ درصد کمتر از غیرتراریخته بود. با افزایش شوری نفوذپذیری غشاء سلولی افزایش می‌یابد؛ در نتیجه پایداری غشاء کاهش یافته و نشت الکترولیت اتفاق می‌افتد (Kaya et al., 2006). تحت تنش شوری، نشت الکترولیت به دلیل افزایش نشت متابولیت‌ها و الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد که در نتیجه ورود تجمعی یون‌های  $Cl^-$ ،  $Na^+$  و حذف  $K^+$  می‌باشد (Iqbal et al., 2008). از نشت الکترولیت، به‌عنوان یک معیار جهت بررسی میزان آسیب‌های ناشی از تنش‌ها به گیاهان و میزان تحمل گیاهان به تنش استفاده می‌شود و معمولاً ژنوتیپ‌های متحمل، نشت الکترولیتی کمتری دارند (Lee and Zhu, 2010; Sairam et al., 2002). کاهش نشت الکترولیت و پایداری غشاء در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt می‌تواند به دلیل نقش پروتئین‌های غشاء پلاسمایی در تنظیم جریان  $Na^+$  و جذب  $K^+$  باشد؛ زیرا افزایش نسبت پتاسیم به سدیم و کلر از راه‌های اصلی تحمل به تنش شوری در گیاهان است.

تغییر سطح برگ در گیاهان تراریخته در سطوح تنش ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار شوری فاقد اختلاف معنی‌دار بود (شکل A۳). برای عمق ریشه، نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فقط در سطوح تنش شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار بین گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt و غیرتراریخته CH-Falat اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (شکل B۳). به طوری که عمق ریشه در گیاهان تراریخته نسبت به غیرتراریخته در غلظت‌های فوق به ترتیب ۱۱/۶۳ و ۲۸ درصد افزایش داشت.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، وزن تر ریشه با افزایش سطح تنش شوری به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش نشان داد و در این خصوص اختلاف معنی‌داری بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته مشاهده شد (شکل C۳). گیاهان تراریخته در شرایط فاقد تنش شوری از میزان وزن تر ریشه بیشتری برخوردار بودند. این اختلاف بین دو گیاه، با افزایش سطح تنش شوری روند افزایشی داشت؛ به طوری که وزن تر ریشه در گیاهان تراریخته در سطوح تنش شوری ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار به ترتیب ۱/۵، ۱/۶ و ۱/۸ برابر بیشتر از وزن آن در گیاهان غیرتراریخته بود.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که وزن خشک ریشه در سطوح مختلف شوری به‌طور قابل‌توجهی معنی‌دار شد و با افزایش سطح شوری، میزان آن کاهش شد (شکل D۳). میزان وزن خشک ریشه در گیاهان تراریخته در شرایط فاقد تنش شوری نیز نسبت به گیاهان غیرتراریخته بیشتر بود. این افزایش در سطوح تنش شوری ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار به ترتیب ۲، ۲/۳ و ۲/۷ برابر بیشتر بود. نتایج حاضر نشان داد که در سطوح مختلف شوری، میزان حجم و گسترش ریشه در گیاهان تراریخته به مراتب بیشتر از غیرتراریخته بود و یک سیستم ریشه‌ای گسترده و عمیق جذب بهتر آب و مواد مغذی و حفظ وضعیت آب گیاه به‌همراه دارد (Naz et al., 2014). مشخص شده است که در گونه‌های مقاوم به شوری ویژگی‌های رشد در تنش شوری متوسط کاهش نیافته‌اند و



شکل ۳- اثر سطوح مختلف شوری در گیاهان CH-Falat و CH-Falat-Bt بر صفات سطح برگ (A)، عمق ریشه (B)، وزن تر ریشه (C) و وزن خشک ریشه (D). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) و ستون‌های دارای حروف غیرمشابه، نشان‌دهنده معنی‌داری آن است.

Figure 3. The effect of different salinity levels in CH-Falat-Bt and CH-Falat on Leaf area (A), Root length (B), Root fresh weight (C) and root dry weight (D). The comparison of means with Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

میانگین‌ها نشان داد (شکل ۴B). به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با افزایش سطح شوری میزان RWC معنی‌دار شد. در تمام سطوح تنش شوری به‌جز در سطح تنش صفر، میزان RWC در گیاهان ترا ریخته به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از گیاهان غیر ترا ریخته شد. به‌طوری‌که میزان RWC در گیاهان ترا ریخته در سطوح تنش شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار به ترتیب ۱۲ و

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC): نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که ژنوتیپ و تنش شوری بر میزان نسبی آب برگ در سطح یک درصد و اثر متقابل ژنوتیپ و تنش شوری در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴)؛ همان‌طور که انتظار می‌رفت با افزایش سطح تنش شوری، از میزان محتوای نسبی آب برگ کاسته شد. نتایج مقایسه



بیشتر در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسبت به CH-Falat نشان داد که این گیاهان در اثر افزایش تنش شوری، کمتر تحت تأثیر اثرات مخرب تنش قرار گرفته‌اند؛ به طوری که با استفاده از مکانیسم تنظیم جذب و جابجایی یون سدیم تعدیل یافته است. عواملی مانند کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و کاهش فتوسنتز، به دلیل اختلال در جذب یون‌ها به‌ویژه تجمع یون‌های سدیم و کلر برگ است (Askari et al., 2006).

**کاروتنوئید:** مطابق با نتایج تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل تنش شوری  $\times$  ژنوتیپ در سطح یک درصد از نظر محتوای کاروتنوئید وجود دارد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین نشان داد (شکل ۴D)، میزان کاروتنوئید قبل از اعمال تنش در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسبت به گیاهان غیرتراریخته CH-Falat افزایش نشان داد به طوری که این میزان در سطح تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار به میزان ۵/۹ درصد افزایش داشت. در سطوح تنش شوری ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار به‌طور قابل ملاحظه‌ای میزان آن در همه گیاهان کاهش نشان داد. در برخی گیاهان تنش شوری کم، باعث افزایش میزان کاروتنوئید می‌شود؛ درحالی‌که با اعمال سطوح شوری بالا از محتوای کاروتنوئید کاسته می‌شود کاروتنوئیدها نقش بسزایی در ممانعت از آسیب‌های ناشی از اکسیداتیو بازی می‌کنند. افزایش آن‌ها باعث افزایش توان گیاه در مقابل تنش‌های مختلف می‌شود (Doganlar et al., 2010; Gholami, 2018).

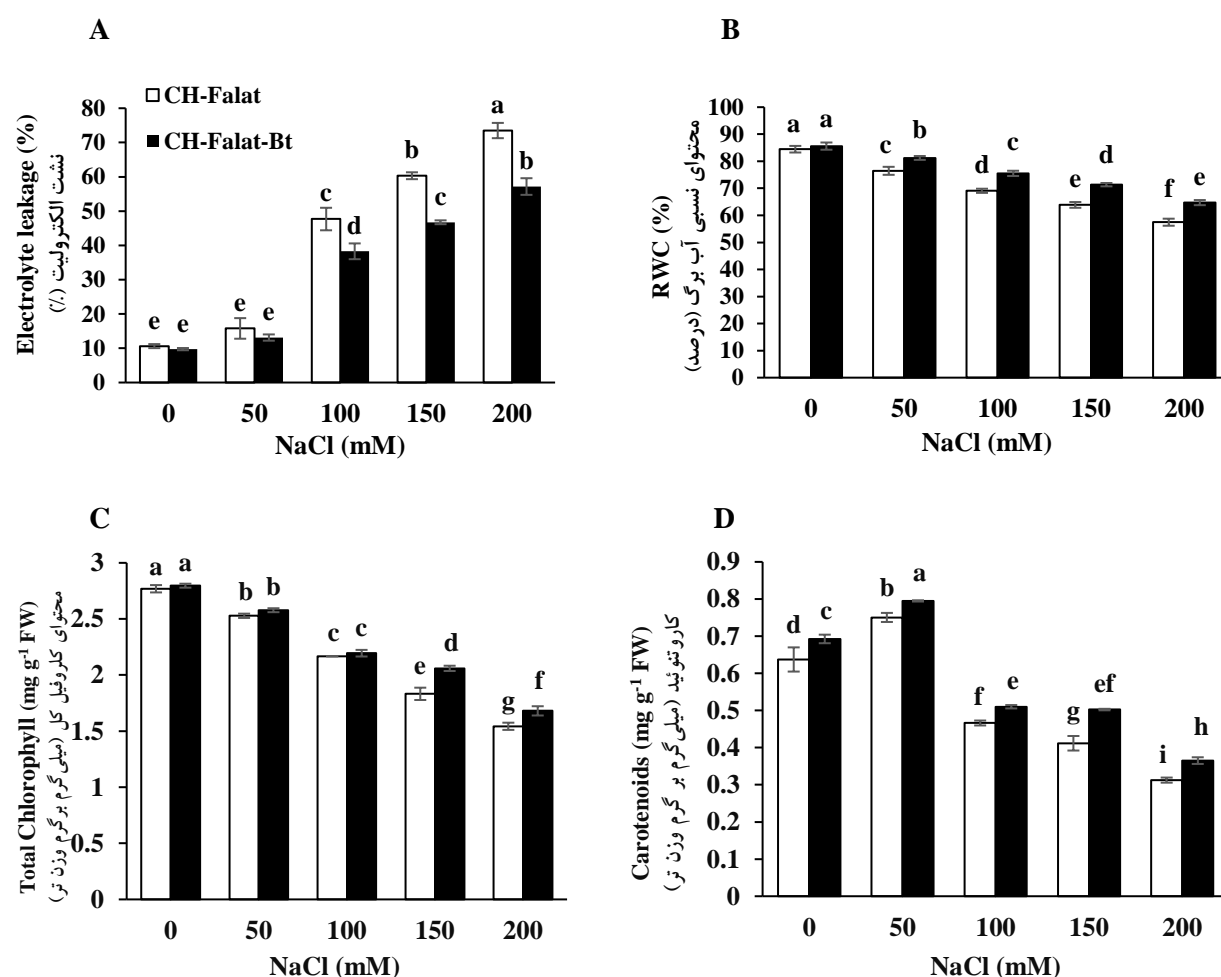
**اندازه‌گیری میزان قند محلول:** نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده ژنوتیپ و سطوح مختلف تنش شوری بر میزان قند محلول در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt و غیرتراریخته CH-Falat در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین‌ها نشان داد (شکل ۴A) که با افزایش سطح تنش شوری، میزان قندهای محلول افزایش یافت و مقدار آن به‌طور قابل توجهی در گیاهان تراریخته نسبت به غیرتراریخته در سطوح ۵۰ و ۱۰۰

درصد افزایش نشان داد. افزایش مقادیر RWC در ارقام متحمل به شوری نسبت به ارقام حساس به شوری، به دلیل تجمع اسمولیت‌هاست که جذب آب اضافی را ممکن می‌سازد (Hand et al., 2017). کاهش میزان RWC باعث کاهش فتوسنتز و درنهایت منجر به کاهش رشد می‌شود؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود RWC به‌عنوان یک عامل انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شوری در نظر گرفته شود (Girón-Calva et al., 2020; Ziaf et al., 2009). از دلایل افزایش RWC در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسبت به گیاهان غیرتراریخته CH-Falat در تنش شوری، می‌توان به تجمع اسمولیت‌های سازگار و خروج یون‌های سدیم و کلر اشاره کرد که باعث حفظ تورژسانس برگ با جذب آب اضافی می‌شوند.

**کلروفیل کل:** مطابق با نتایج جدول تجزیه واریانس، سطوح مختلف تنش شوری و اثر متقابل تنش شوری و ژنوتیپ بر میزان کلروفیل کل در گیاهان CH-Falat-Bt و CH-Falat در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش سطح تنش شوری، میزان کلروفیل کل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴C). بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته در سطوح تنش شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، با این حال میزان کلروفیل در گیاهان تراریخته بیشتر بود. میزان تأثیر تنش شوری در سطوح ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار، بر محتوای کلروفیل کل گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسبت به گیاهان غیرتراریخته CH-Falat کمتر بود. به طوری که مقدار کلروفیل کل در گیاهان تراریخته در سطوح تنش مذکور به ترتیب ۱۲ و ۹ درصد نسبت به گیاهان غیرتراریخته افزایش نشان داد که با یافته‌های سعیدی و همکاران (Saeidi-Sar et al., 2013) مطابقت دارد. در تنش شوری بالا، میزان غلظت یون‌های  $Na^+$  و  $Cl^-$  افزایش و در کلروپلاست تجمع می‌یابند که باعث تخریب می‌شود (Ashraf, 2004). در حقیقت غلظت کلروفیل برگ یک شاخص مهم در پاسخ به افزایش شوری و ایجاد تحمل است (Chanratana et al., 2019). میزان کلروفیل

نشان‌دهنده افزایش تولید اسمولیت‌ها در این گیاهان در نتیجه به‌کارگیری سیستم مقاومت گیاه است. این ترکیبات از اجزای مهم واکنش‌های دفاعی گیاهان به شوری هستند؛ در نتیجه در غلظت‌های بالا منجر به کاهش آسیب‌های ناشی از تنش می‌شود. همچنین قندها در حفاظت از ساختار پروتئین و حذف رادیکال‌های آزاد در سلول نقش دارند (Souri and Tohidloo, 2019).

میلی‌مولار شوری افزایش معنی‌دار داشت. با این حال در سطح تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار میزان قند محلول در گیاهان تراریخته، ۳۳/۸ میلی‌گرم بود که ۳ درصد بیشتر از گیاهان غیرتراریخته بود. مطالعات سوری و توحیدلو (Souri and Tohidloo, 2019) و بوتلا و همکاران (Botella *et al.*, 2021) به‌طور قابل‌توجهی افزایش میزان مقدار قند را با اعمال شوری تأیید می‌کنند. افزایش میزان قندهای محلول در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان غیرتراریخته در تنش شوری،



شکل ۴- اثر سطوح مختلف شوری در گیاهان CH-Falat و CH-Falat-Bt بر روی نشت الکترولیت (A)، محتوای نسبی آب برگ (B)، میزان کلروفیل کل (C) و کاروتنوئید (D). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) انجام شد.

Figure 4. The effect of different salinity levels in CH-Falat-Bt and CH-Falat: Electrolyte leakage (A), RWC (%) (B), Total Chlorophyll (C), and Carotenoids (D). The comparison of means with Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مختلف گیاهان CH-Falat-Bt و CH-Falat در سطوح مختلف شوری  
Table 3- ANOVA analysis on various traits of CH-Falat-Bt and CH-Falat plants at different salinity levels

منابع تغییرات Source of variables	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean square			
		سطح برگ Leaf area	عمق ریشه Root length	وزن تر ریشه Root fresh weight	وزن خشک ریشه Root dry weight
ژنوتیپ Genotype	1	2015.59**	78.41 **	7.93**	0.06**
تنش شوری Salinity stress	4	481.09**	350.20**	4.81**	0.04**
ژنوتیپ × تنش شوری Genotype × Salinity stress	4	6.15 <sup>ns</sup>	6.37 <sup>ns</sup>	0.45**	0.00037146*
خطا Error	20	12.29	3.86	0.04	0.00011229
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		8.80	5.29	10.14	6.68

\*\*، \* و <sup>ns</sup>: به ترتیب معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد و عدم معنی داری است

\*\* , \* and <sup>ns</sup> are significant at 1%, 5% probability levels and non-significant, respectively

جدول ۴- تجزیه واریانس دو گیاه CH-Falat-Bt و CH-Falat در سطوح مختلف شوری  
Table 4. ANOVA of CH-Falat-Bt and CH-Falat at different salinity levels

منابع تغییرات Source of variables	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean square					
		نشت الکترولیت Electrolyte leakage	محتوای نسبی آب برگ RWC	کلروفیل کل Total chlorophyll	کاروتنوئید Carotenoids	قند Sugar	پرولین Proline
ژنوتیپ Genotype	1	550.92**	220.02**	5.55**	0.11**	30.25**	84.76**
تنش شوری Salinity stress	4	3507.80**	525.33**	1.33**	0.17**	425.77**	7537.14**
ژنوتیپ × تنش شوری Genotype × Salinity stress	4	67.46**	10.27*	0.11**	0.00287607**	1.34 <sup>ns</sup>	8.31 *
خطا Error	4	11.56	3.48	0.02	0.00012852	2.08	2.74
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		9.12	2.56	8.58	2.21	6.67	4.68

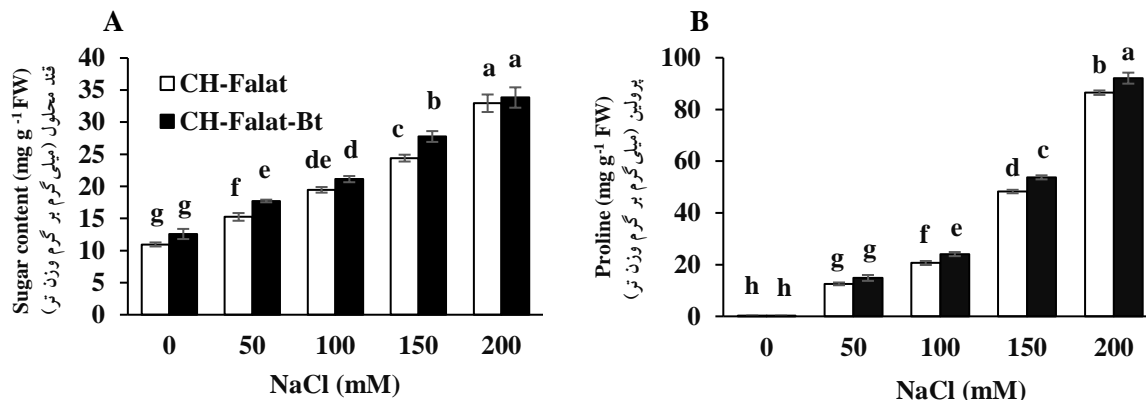
\*\*، \* و <sup>ns</sup>: به ترتیب معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد و عدم معنی داری است

\*\* , \* and <sup>ns</sup> are significant at 1%, 5% probability levels and non-significant respectively

میزان پرولین: مطابق با جدول تجزیه واریانس (جدول ۴)، اثرات ساده ژنوتیپ و سطوح مختلف تنش شوری بر میزان پرولین در سطح ۱ درصد و اثر متقابل آن‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. بر اساس داده‌های مقایسه میانگین‌ها (شکل B۵)، مقدار پرولین برگ گوجه‌فرنگی در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt و غیرتراریخته CH-Falat با افزایش سطح شوری، افزایش معنی‌داری نشان داد. میزان پرولین پیش از اعمال تنش شوری، بسیار ناچیز بود و با افزایش سطح تنش شوری به‌طور قابل‌توجهی میزان آن در گیاهان تراریخته نسبت به غیرتراریخته افزایش نشان داد؛ به‌طوری‌که میزان آن در سطوح ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار به‌ترتیب ۱۶، ۱۱ و ۶ درصد در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان غیرتراریخته بیشتر بود. پرولین یک اسمولیت آنتی‌اکسیدان ارزشمند است که باعث افزایش قابلیت مهار گونه‌های اکسیژن فعال و افزایش فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز می‌شود؛ همچنین سبب حفظ ساختار غشاء سلولی و پروتئین می‌گردد (Anjum et al., 2011; Yue et al., 2021). تجمع پرولین در اندام‌های هوایی می‌تواند باعث بالا رفتن نسبی تحمل به تنش شوری به‌علت فعال‌سازی آنزیم‌های بیوسنتزی پرولین در گیاهان گردد (Maggio et al., 2002). افزایش بیشتر پرولین در گیاهان تراریخته بیانگر فعال شدن سوخت‌وساز سلولی برای حفاظت در برابر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است.

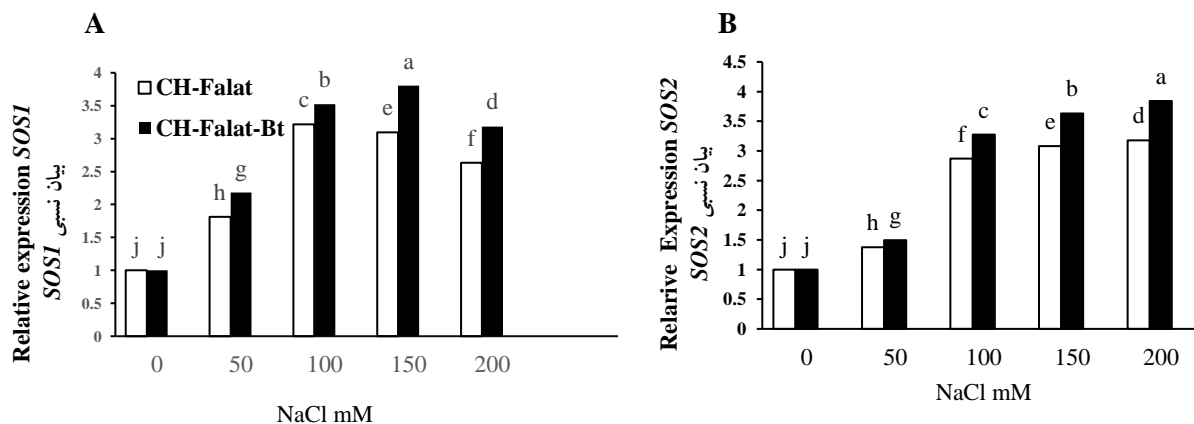
بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های *SOS1* و *SOS2*: مطابق با شکل A۶، میزان بیان نسبی ژن *SOS1* در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt با افزایش سطح شوری نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داد. این افزایش در سطوح تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار صعودی بود؛ به‌طوری‌که افزایش بیان برای گیاه تراریخته CH-Falat-Bt در سطح شوری ۱۵۰

میلی‌مولار ۴ برابر بیشتر نسبت به شاهد آن بود، در حالی‌که برای گیاه غیرتراریخته CH-Falat این میزان بیان ۳/۱ برابر شد؛ اما در سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار میزان بیان نسبی ژن *SOS1* کاهش داشت. بیان نسبی ژن *SOS1* در همه سطوح تنش شوری در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt همواره و به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از غیرتراریخته CH-Falat بود؛ بیان نسبی ژن *SOS2* نیز با افزایش تنش شوری در همه سطوح در گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt افزایش نشان داد (شکل B۶) و به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای معنی‌دار بود. به‌طوری‌که در سطح ۱۰۰ میلی‌مولار میزان بیان ژن در گیاه تراریخته نسبت به شاهد ۳/۲ برابر بود که نسبت به سطح تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار ۲ برابر افزایش نشان داد. در مجموع میزان بیان *SOS1* و *SOS2* در شرایط عدم اعمال تنش شوری بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته تفاوت قابل‌توجهی نداشت، اما با افزایش سطح تنش شوری، بیان دو ژن افزایش نشان داد؛ به‌طوری‌که در سطوح بالاتر شوری قابل‌توجه بود. نتایج نشان‌دهنده افزایش میزان بیان ژن در گیاهان تراریخته نسبت به غیرتراریخته در سطوح مختلف شوری بود. یافته‌های این آزمایش با نتایج شهزاد و همکاران (Shahzad et al., 2022) که بر روی برنج *SOS1* و *SOS2* را مورد بررسی قرار داده مشابه بود. گزارش شده است که *SOS1* و *SOS2* تحمل شوری را در گوجه‌فرنگی ایجاد می‌کنند. خاموش کردن *SOS1* در گوجه‌فرنگی (*SISOS1*) کاهش رشد را در شرایط شوری نشان می‌دهد. همچنین بیان بیش از حد *SOS2* در گوجه‌فرنگی باعث افزایش تحمل به شوری شد. در گوجه‌فرنگی، کاهش سطوح *SOS1* منجر به حساسیت به شوری می‌شود و از نظر فنوتیپی قابل مشاهده است. خانواده ژنی *SOS* نقش عمده‌ای در حفظ مقادیر pH سلولی، غلظت  $K^+$  و نسبت  $Na^+/K^+$  دارند تا از اختلالات هموستاز  $Na^+/K^+$  ناشی از شوری بالا جلوگیری کنند (Guo et al., 2022).



شکل ۵- اثر سطوح مختلف شوری در گیاهان CH-Falat و CH-Falat-Bt. میزان قند محلول (A). محتوای پرولین (B). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) انجام شد.

Figure 5. The effect of different salinity levels in CH-Falat-Bt and CH-Falat: Sugar content (A), Proline (B). The comparison of means with Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۶- اثر سطوح مختلف شوری در گیاهان CH-Falat و CH-Falat-Bt. میزان بیان ژن *SOS1* (A) و میزان بیان ژن *SOS2* (B). بیان نسبی ژن‌های *SOS1* و *SOS2* به‌طور قابل‌توجهی در مقایسه با شاهد افزایش یافته است. میزان بیان ژن‌ها توسط ژن *actin* نرمال شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) است.

Figure 6. Effect of different salinity levels on CH-Falat-Bt and CH-Falat. Gene expression of *SOS1* (A) and gene expression of *SOS2* (B). The relative expression of *SOS1* and *SOS2* genes is significantly increased compared to the control. The levels of expression of genes were normalized by the Actin gene. The comparison of means is with Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نسبت به غیرتراریخته CH-Falat در سطوح تنش شوری بالاتر مطلوب بود و حاکی از وضعیت بهتر این گیاهان در مواجهه با تنش شوری است که می‌تواند به دلیل تفاوت در محتویات متابولیکی آنها باشد. با توجه به اینکه میزان تأثیر متابولیت‌های ثانویه گیاهی بر عملکرد محصولات Bt مشخص نیست، همچنین در برنامه‌های زیست‌محیطی، در نظر گرفتن تأثیر عوامل محیطی

طبق یافته‌های گزارش‌شده، گیاهان تراریخته CH-Falat-Bt نه تنها نسبت به برخی آفات پروانه‌ای شب‌پره گوجه‌فرنگی مقاوم هستند، بلکه با توجه به ارزیابی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و مولکولی و همچنین تغییرات متابولیکی در این پژوهش، نسبت به سطوح مختلف تنش شوری تحمل بیشتری نسبت به گیاهان غیرتراریخته CH-Falat (غیر تراریخته) نشان داد. خصوصیات بررسی‌شده

بررسی تأثیر تنش‌های محیطی بر میزان اثربخشی محصولات Bt در برابر آفات هدف، می‌بایست تأثیر شرایط محیط بر حشرات آفت، شرایط گیاه و تعاملات آفت-گیاه نیز باید به‌عنوان بخشی از مطالعه در نظر گرفته شود

فقط بر اثربخشی محصولات Bt در برابر آفات موردنظر، برای پیش‌بینی عملکرد محصولات Bt به‌تنهایی کافی نیست. در نتیجه مطالعه و پژوهش بیشتر ژنتیکی و فیزیولوژیکی در سطح گلخانه و مزرعه ضروری به‌نظر می‌رسد. درنهایت، علاوه‌بر

## References

- Abdeldym, E.A., El-Mogy, M.M., Abdellateaf, H.R. and Atia, M.A. (2020). Genetic characterization, agromorphological and physiological evaluation of grafted tomato under salinity stress conditions. *Agronomy*, **10**(1948): 1-26.
- Ahmadi, M. and Souri, M.K. (2018). Growth and mineral content of coriander (*Coriandrum sativum* L.) plants under mild salinity with different salts. *Acta Physiologiae Plantarum*, **40**: 1-8.
- Anjum, S., Wang, L., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L. and Zou, C. (2011). Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **197**: 177-185.
- Ashraf, M. (2004). Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **199**: 361-376.
- Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M. and Salekdeh, G.H. (2006). Effects of salinity levels on proteome of Suaeda aegyptiaca leaves. *Proteomics*, **6**: 2542-2554.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39**: 205-207.
- Ben Hamed, K., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A. and Abdely, C. (2007). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regulation*, **53**: 185-194.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, **32**: 170-189.
- Botella, M.Á., Hernández, V., Mestre, T., Hellín, P., García-Legaz, M.F., Rivero, R.M., Martínez, V., Fenoll, J. and Flores, P. (2021) Bioactive Compounds of tomato fruit in response to salinity, heat and their combination. *Agriculture*, **6**: 534-545.
- Chanratana, M., Joe, M.M., Roy Choudhury, A., Anandham, R., Krishnamoorthy, R., Kim, K., Jeon, S., Choi, J., Choi, J. and Sa, T. (2019). Physiological response of tomato plant to chitosan-immobilized aggregated *Methylobacterium oryzae* CBMB20 inoculation under salinity stress. *3 Biotech*, **9**: 1-13.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**: 19-21.
- Doganlar, Z.B., Demir, K., Basak, H. and Gul, I. (2010). Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. *African Journal of Agricultural Research*, **15**: 2056-2065.
- Gholami, A.A. (2018). Manipulating the pathway for the synthesis of carotenoids to improve the quality of food products through biotechnology. *Journal of Biosafety*, **10**: 1-15.
- Girón-Calva, P.S., Twyman, R.M., Albajes, R., Gatehouse, A.M. and Christou, P. (2020). The impact of environmental stress on Bt crop performance. *Trends in Plant Science*, **25**: 264-278.
- Guo, M., Wang, X.S., Guo, H.D., Bai, S.Y., Khan, A., Wang, X.M., Gao, Y.M. and Li, J.S. (2022). Tomato salt tolerance mechanisms and their potential applications for fighting salinity: A review. *Frontiers in Plant Science*, **13**: 949-954.
- Hajiahmadi, Z., Shirzadian-Khorramabad, R., Kazemzad, M. and Sohani, M.M. (2020). A novel, simple, and stable mesoporous silica nanoparticle-based gene transformation approach in *Solanum lycopersicum*. *3 Biotech*, **10**: 1-13.
- Hand, M.J., Taffouo, V.D., Nouck, A.E., Nyemene, K.P.J., Tonfack, B., Meguekam, T.L. and Youmbi, E. (2017). effects of salt stress on plant growth, nutrient partitioning, chlorophyll content, leaf relative water content, accumulation of osmolytes and antioxidant compounds in pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **45**: 481-490.
- Hayford, M.B., Medford, J.L., Hoffman, N.L., Rogers, S.G. and Klee, H.J. (1988). Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamicin acetyltransferases. *Plant Physiology*, **86**: 1216-1222.
- Iqbal, M., Akhtar, N., Zafar, S. and Ali, I. (2008). Genotypic responses for yield and seed oil quality of two Brassica species under semi-arid environmental conditions. *South African Journal of Botany*, **74**: 567-571.

- Irigoyen, J., Einerich, D. and Sánchez-Díaz, M.** (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, **84**: 55-60.
- Kaya, M.D., Okçu, G., Atak, M., Cikalı, Y. and Kolsarıcı, Ö.** (2006). Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy*, **24**: 291-295.
- Khan, A., Khan, A.L., Muneer, S., Kim, Y.-H., Al-Rawahi, A. and Al-Harrasi, A.** (2019). Silicon and salinity: crosstalk in crop-mediated stress tolerance mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, **10**: 1429.
- Lee, B.H. and Zhu, J.K.** (2010). Phenotypic analysis of Arabidopsis mutants: electrolyte leakage after freezing stress. *Cold Spring Harbor Protocols*, **1**: 970-972.
- Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C.** (2001). Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, **1**: F4. 2.1-F4. 2.6.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J.I., Damsz, B., Narasimhan, M.L., Hasegawa, P.M., Joly, R.J. and Bressan, R.A.** (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal*, **31**: 699-712.
- Naz, A.A., Arifuzzaman, M., Muzammil, S., Pillen, K. and Léon, J.** (2014). Wild barley introgression lines revealed novel QTL alleles for root and related shoot traits in the cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genetics*, **15**: 1-12.
- Nazari Khakshoor, E., Azadi, A., Fourozesh, P., Etminan, A. and Majidi Hervan, E.** (2022). Prioritization and Identification of Candidate Genes Associated with Root Traits Under Salinity Stress in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Genetic Researches*, **9(1)**: 71-84 (In Persian).
- Peng, Q., Yu, Q. and Song, F.** (2019). Expression of cryogenes in *Bacillus thuringiensis* biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**: 1617-1626.
- Raiola, A., Rigano, M.M., Calafiore, R., Frusciante, L. and Barone, A.** (2014). Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of Inflammation*, **2014**: 1-16.
- Saeidi-Sar, S., Abbaspour, H., Afshari, H. and Yaghoobi, S.R.** (2013). Effects of ascorbic acid and gibberellin A3 on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**: 667-677.
- Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.** (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.
- Salami, R., Mohammadi, S.A., Ghafarian, S. and Moghaddam, M.** (2016). Expression analysis of Hv TIP2; 3 and Hv TIP4; 1 in sensitive and tolerant barley genotypes under salinity stress. *Plant Genetic Researches*, **2(2)**: 1-14 (In Persian).
- Samal, K.C. and Rout, G.R.** (2018). Genetic improvement of vegetables using transgenic technology. In: Rout, G.R. and Peter K.V., Eds., *Genetic Engineering of Horticultural Crops*, pp. 193-224, Academic Press, Cambridge, UK.
- Shahzad, B., Shabala, L., Zhou, M., Venkataraman, G., Solis, C.A., Page, D., Chen, Z.H. and Shabala, S.** (2022). Comparing essentiality of SOS1-mediated Na<sup>+</sup> exclusion in salinity tolerance between cultivated and wild rice species. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**: 1-12.
- Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J. and Zhu, J.K.** (2003). Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, **21**: 81-85.
- Souri, M.K. and Tohidloo, G.** (2019). Effectiveness of different methods of salicylic acid application on growth characteristics of tomato seedlings under salinity. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, **6**: 26.
- Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F. and Koca, H.** (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, **168**: 223-231.
- Xie, Q., Zhou, Y. and Jiang, X.** (2022). Structure, Function, and Regulation of the Plasma Membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter Salt Overly Sensitive 1 in Plants. *Frontiers in Plant Science*, **13**: 1-13.
- Yue, L., Zhuang, Y., Gu, Y., Li, H., Tu, S., Yang, X. and Huang, W.** (2021). Heterologous expression of *Solanum tuberosum* NAC1 gene confers enhanced tolerance to salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Plant Biology*, **64**: 531-542.
- Zhu, J.K.** (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, **167**: 313-324.
- Ziaf, K., Amjad, M., Pervez, M.A., Iqbal, Q., Rajwana, I.A. and Ayyub, M.** (2009). Evaluation of different growth and physiological traits as indices of salt tolerance in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, **41**: 1797-1809.

## The effect of Salt Stress on some Morpho-Physiological and Molecular Traits of Transgenic Tomato Plants of T3 Containing *cryIAb* Gene

Khadijeh Abbaszadeh<sup>1</sup>, Reza Shirzadian-Khorramabad<sup>2,\*</sup>, Mohammad Mahdi Sohani<sup>2</sup> and Zahra Hajiahmadi<sup>3</sup>

- 1- Ph.D. Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
- 3- Ph.D., Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: November 7, 2022 – Accepted: March 14, 2023)

### Abstract

Salinity stress affects morpho-physiological and biochemical traits of plants. The transgenic Bt plants play a significant role in pest control, but their response and ability to cope with environmental stresses still need to be evaluated. Therefore, effect of salinity stress at 0, 50, 100, 150, and 200 mM on morphological, physiological, and molecular traits of T<sub>3</sub> transgenic tomato plants containing *cryIAb* gene (CH-Falat-Bt) was investigated and compared with that of the non-transgenic control (CH-Falat). Evaluation of the morphological traits (leaf area, root length, fresh and dry weight of roots) at different salinity levels revealed that CH-Falat-Bt transgenic plants are more tolerant to salinity stress compared to CH-Falat non-transgenic plants. The chlorophyll content at 150 and 200 mM salinity levels was 12 and 9% plants, respectively. Moreover, the amount of RWC, carotenoids, proline and soluble sugars increased significantly in transgenic plants as salinity levels increased. The relative expression of *SOS1* and *SOS2* genes showed a significant increase in all salinity levels in CH-Falat-Bt transgenic plants compared to CH-Falat non-transgenic plants. The amount of electrolyte leakage in the transgenic plants was significantly reduced compared to the non-transgenic plants. The results of morphological, physiological, and molecular investigations of CH-Falat-Bt transgenic plants confirmed that the undesirable effects of salinity stress on transgenic plants is much less than non-transgenic ones. In general CH-Falat-Bt transgenic plants are more tolerant to different applied salinity levels than the wild variety.

**Keywords:** Salt stress, Tomato, Bt, *CryIAb*, *SOS1*, *SOS2*

---

\* Corresponding Author, E-mail: r.shirzadian@guilan.ac.ir