Archive of SID

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد سیزدهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۹
۱-۸
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2019.1847.1436

مقاله پژوهشی

اثر اسید سالیسیلیک بر رونوشت برداری از ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز در سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رقم آگریا تحت تنش شوری

فرزانه فخیمی[۱]، علیرضا مطلبی آذر[۲]، فریبرز زارع نهندی[۲]، نعمت سخندان بشیر[۳]، غلامرضا گوهری[۴*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۲. دانشیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۳. استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۴. استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۶/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۰۸

چکیده

تنش شوری، یک تنش محیطی است که رشد و نمو گیاهان و تولید محصولات کشاورزی ازجمله سیب‌زمینی را در بیشتر نقاط جهان متأثر می‌سازد. بحران زیست‌محیطی دریاچه ارومیه و اثرات منفی آن بر زمین‌های کشاورزی اطراف این دریاچه به‌عنوان یک تهدید جدی برای تولید بسیاری از محصولات مهم و اقتصادی کشاورزی همچون سیب‌زمینی محسوب می‌شود. گلایسین بتائین در اکثر گیاهان به‌عنوان یک ماده غیر سمی باعث افزایش تحمل گیاهان به شرایط نامناسب تنش‌های شوری و خشکی می‌گردد. مطالعات زیادی در مورد چگونگی دخالت سالیسیلات‌ها در واکنش گیاهان به تنش‌های غیرزنده محیطی از قبیل تابش ماورای بنفش، خشکی، شوری و سرمازدگی انجام یافته است. در این تحقیق، تأثیر تنش شوری (کلرید سدیم) و تیمار اسید سالیسیلیک بر بیان ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز (LOC102601322) به روش RT-PCR نیمه کمی در گیاهچه‌های سیب‌زمینی رقم اگریا در محیط کشت MS بررسی شد. برای این منظور، آزمایشی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار با چهار ریز نمونه در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه تبریز به اجرا در آمد. عامل‌های آزمایش، شامل شوری (کلرید سدیم) در دو سطح (صفر و ۷۰ میلی‌مول بر لیتر)، اسید سالیسیلیک در چهار سطح (صفر، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مول بر لیتر) بود. نتایج نشان داد که اثر تیمار کلرید سدیم بر میزان گلایسین بتائین معنی‌دار بود، بااین‌حال اثر متقابل شوری و اسید سالیسیلیک بر صفات بیوشیمیایی معنی‌دار نبود. نتایج مولکولی نشان داد که میزان بیان ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز در تمام غلظت‌های بررسی‌شده اسید سالیسیلیک و تنش شوری نسبت به گیاه شاهد افزایش قابل‌توجهی نشان داد که حداکثر میزان بیان این ژن در غلظت ۱۰۰ مول بر لیتر اسید سالیسیلیک مشاهده شد. همبستگی معنی‌داری بین بیان ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز و میزان گلایسین بتائین مشاهده شد. چنین به نظر می‌رسد که کاربرد اسید سالسیلیک موجب کاهش اثرات منفی تنش شوری در گیاهچه‌های سیب‌زمینی در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: **بتائین آلدهید دهیدروژناز، تنش غیرزیستی، کشت درون شیشه‌ای، گلایسین بتائین، RT-PCR نیمه کمی.**

مقدمه

سیب‌زمینی به‌عنوان یک محصول بسیار مهم غذایی، نقش مهمی در حل بحران غذا و رفع سوءتغذیه ایفا می‌کند که در حال حاضر کاهش کمّی و کیفی عملکرد سیب‌زمینی در شرایط تنش شوری به اثبات رسیده است (Zaman et al., 2015; Bunding et al., 2017). تنش شوری یکی از تنش‌های مهم محیطی است که منجر به ایجاد شرایط فقدان آب در گیاه و درنتیجه خشکی فیزیولوژیکی و بر هم زدن توازن غذایی گیاه می‌شود. گیاهان تحت تنش شوری،

* نگارنده پاسخگو: غلامرضا گوهری. پست الکترونیک: gholamreza.gohari@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت‌های بالایی از یون K^+ و غلظت‌های پایین از Na^+ در سیتوسول حفظ می‌نمایند درواقع حفظ نسبت K^+/Na^+ از عناصر تحمل به شوری در گیاهان محسوب می‌شود (Aharon et al., 2003). عدم توازن متابولیکی ایجادشده به‌وسیله سمّیت یونی، تنش اسمزی و کمبود عناصر غذایی تحت شرایط شور منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد (Bai et al., 2018).

گیاهان مکانیسم‌های ویژه دیگری را دارا هستند تا در محیط فوق‌العاده شور رشد نمایند. یکی از این مکانیسم‌ها تعدیل وضعیت اسموتیکی سلول است (Mahajan and Tuteja., 2005). اختلال اصلی تنش شوری، افت آب درونی است برای جلوگیری از هدر رفتن آب سلول و حفاظت پروتئین‌های سلولی، گیاهان متابولیت‌های زیادی را انباشت می‌کنند که مولکول‌هایی با حلالیت بالا نامیده می‌شود. انباشت اسمولیت‌ها، تعدیل اسموتیکی را تسهیل می‌کند. ازآنجایی‌که آب از پتانسیل بالا به پتانسیل پایین حرکت می‌کند، انباشت این اسمولیت‌ها باعث پایین آمدن پتانسیل آب درون‌سلولی می‌شود و از هدر رفتن آب درون‌سلولی ممانعت می‌کند (Sunker et al., 2007). گلایسین بتائین یکی از ترکیبات آمین نوع چهارم و فراوان‌ترین ترکیب در گیاهان است که به‌عنوان یک اسمولیت اصلی در پاسخ به تنش شوری سنتز می‌شود (Yang et al., 2006). گیاهان گلایسین بتائین را در کلروپلاست از طریق کولین و بتائین آلدئید سنتز می‌کنند. در مسیر بیوسنتزی گلایسین بتائین، کولین توسط آنزیم کولین مونو اکسیژناز به بتائین آلدهید و سپس توسط بتائین آلدهید دهیدروژناز به گلایسین بتائین تبدیل می‌گردد (Brauner et al., 2003). به نظر می‌رسد آنزیم بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH) علاوه بر نقش در بیوسنتز گلایسین بتائین، در کاتابولیسم پلی آمین‌ها و سنتز حفاظت کننده اسمزی ۳-دی متیل سولفونیو پروپیونات ۵ نیز نقش ایفا می‌کند (Munoz-claress et al., 2010). ژن BADH ازجمله ژن‌هایی است که به‌صورت مستقیم در تعدیل تنش نقش داشته و از طریق تبدیل بتائین آلدهید به گلایسین بتائین که یک آمینواسید تعدیل‌کننده تنش محسوب می‌شود، باعث مقاومت به شوری می‌شود (Munoz et al., 2010).

اسید سالیسیلیک یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید، یک تنظیم‌کننده رشد درونی از گروه ترکیبات فنلی طبیعی بوده که در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه نقش دارد (Yang et al., 2006). مکانیسم عمل اسید سالیسیلیک در برابر تنش‌ها به نقش آن در تنظیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات دارای گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه برمی‌گردد. مطالعات نشان داده که کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک محرک، باعث افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Zarinkamar et al., 2013). همچنین افزایش فلاونوئیدها و آنتوسیانین در گیاه دارویی بابونه تحت تیمار اسید سالیسیلیک گزارش شده است. افزایش بیان ژن منتول دهیدروژناز و میزان منتول تحت تیمار اسید سالیسیلیک در گیاه نعناع فلفلی نیز گزارش شده است. (Rasouli, 2015) تیمار اسید سالیسیلیک باعث افزایش بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز و تولید گروهی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود (Taguchi et al., 2001). اسید سالیسیلیک بر سایر تنش‌ها به‌عنوان‌مثال در تنش سرما در ذرت (Faroog et al., 2008)، در تنش گرما در خردل (Hayat and Ahmad., 2006) موجب کاهش تنش و بهبود پارامترهای رشد گردید. اثرات تحریکی اسید سالیسیلیک بر رشد می‌تواند به دلایلی مانند افزایش تقسیم سلولی در مناطق مریستمی و تأثیر آن بر سایر هورمون‌ها و تأثیر بر دستگاه فتوسنتزی و فعالیت آنزیم روبیسکو، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و کاهش تنش اکسیداتیو و نشت یونی نام برد. با توجه به اثرات مثبت اسید سالیسیلیک در تعدیل اثرات شوری این آزمایش با هدف بررسی اثرات اسید سالیسیلیک بر میزان بیان ژن BADH در شرایط تنش شوری اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، تهیه محیط کشت و اعمال تیمارها

در این آزمایش از شاخساره های درون شیشه‌ای رقم آگریا عاری از ویروس که از مرکز تحقیقات کشاورزی اردبیل تهیه شده بود، استفاده گردید. برای تهیه محیط کشت از نصف غلظت نمک‌های محیط کشت پایه MS، پس از آماده‌سازی محیط کشت، مقادیر مختلف اسید سالیسیلیک (صفر، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی مول بر لیتر) به همراه صفر و ۷۰ میلی مول بر لیتر کلرید سدیم استفاده شد. علاوه بر این به محیط کشت از هورمون جیبرلین (GA3) ۰/۱ گرم بر لیتر و ایندول بوتیریک اسید (IBA) ۰/۱ گرم بر لیتر، به همراه نمک‌های تیامین و پیرودکسین HCl و نیکوتئنیک اسید استفاده گردید. پس از کشت ریزنمونه‌های تک گره، نمونه‌ها در شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

فتوپریود ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در ژرمیناتور نگه‌داری شد و پس از گذشت یک ماه از اعمال تیمارها ریز نمونه‌های گیاهی از ظروف کشت برداشته شد و سریعاً در فریزر ۸۰- منجمد گردید تا در سنجش‌ها و بررسی‌های مولکولی مورداستفاده قرار گیرد.

اندازه‌گیری گلایسین بتائین

برای سنجش میزان گلایسین بتائین ابتدا نمونه‌ها ابتدا خشک شد و سپس به ۰/۵ گرم از برگ ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد. یک میلی‌لیتر از عصاره گیاهی با یک میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۲ نرمال مخلوط و در حمام آب یخ قرار گرفت و درنهایت ۰/۲ میلی‌لیتر از یدید پتاسیم و ید را به مخلوط واکنش اضافه و مخلوط شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار جذب آن در ۳۶۵ نانومتر قرائت گردید.

استخراج RNA به‌منظور ساخت cDNA با کیت جداسازی RNA کل با استفاده از بافر RNX plus ساخت شرکت سیناژن انجام شد. به این منظور نمونه‌های گیاهی درون هاون توسط ازت مایع پودر گردید و داخل میکروتیوپ‌ها انتقال داده شدند. یک میلی‌لیتر محلول RNX-Plus بسیار خنک به میکروتیوب‌ها اضافه و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند، سپس ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردیدند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر یک از میکروتیوپ‌ها اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شده و مجدداً برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میکروتیوپ‌ها ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی بیرون ریخته شد و به رسوب باقی‌مانده یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه گردید و به‌آرامی ورتکس شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۸ دقیقه و سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد به رسوب خشک‌شده مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز اضافه گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. کیفیت RNA استخراج‌شده به کمک تکنیک‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ازلحاظ کیفیت و کمّیت تأیید شد.

در این تحقیق، ژن Actin به‌عنوان کنترل داخلی انتخاب و جهت تکثیر ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز از پرایمرهای طراحی‌شده به‌وسیله نرم‌افزار Oligo نسخه ۶,۳۷ استفاده شد. به این منظور توالی‌های موردنیاز از پایگاه اطلاعاتی Gene bank به دست آمد و با مقایسه دو انتهای ′۳ و ′۵ ژن، نواحی با بالاترین شباهت به‌عنوان پرایمر پیشرو و معکوس انتخاب شدند.

جدول ۱. توالی آغازگرهای BADH و اکتین مورداستفاده در تکثیر قطعات

Table 1. The primer sequence of BADH and Actin for amplification.

Primer	5'-3' sequence	دمای ذوب Melting temperature (Tm)	تعداد نوکلئوتید Nucleotide Number
BADH Forward	**ATGGCAATTCCTAATATAC**	42.5	19
BADH Reverse	**TCACAGCTTTGAAGGAGA**	45.7	18
Actin Forward	**GAGGACAGGATGCTCCTCAG**	62.5	20
Actin Reverse	**AGACGCCTATGTGGGAGATG**	60.5	20

واکنش رونویسی معکوس طبق مراحل زیر انجام شد: ابتدا به هر یک از میکروتیوب‌های حاصل از مرحله تیمار با آنزیم DNase I یک میکرولیتر پرایمر الیگو dT (0.5 µg/µl) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر قرار داده شد. بلافاصله میکروتیوب‌ها در یخ قرار داده شدند و ۰/۵ میکرولیتر ممانعت کننده آنزیم RNase (40 unit/µl)، ۴ میکرولیتر بافر واکنش (5X)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM) و یک میکرولیتر آنزیم Reverse transcriptase (200 unit/µl) (RevertAid^{TM}M-MuLV)، به هر میکروتیوب اضافه شد. جهت سنتز cDNA مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. دمای بهینه

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنزیم M-MuLV، 42 درجه سانتی‌گراد است. به‌منظور غیرفعال سازی آنزیم RT و تخریب کمپلکس RNA-cDNA میکروتیوب‌ها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ترموسایکلر قرار داده شدند. محصول واکنش تا زمان استفاده در واکنش PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. درنهایت cDNA تولیدشده، در واکنش PCR بهینه‌شده برای ژن BADH قرار داده شد و محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

بررسی RT-PCR نیمه کمی

در این پژوهش از روش RT-PCR نیمه کمّی به‌منظور ارزیابی نیمه کمّی رونوشت برداری ژن BADH استفاده شد. واکنش PCR برای ژن‌های BADH و اکتین موجود در cDNA تیمارهای مختلف با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BADH و ژن کنترل داخلی اکتین (LOC102593148) انجام شد.

تکثیر رونوشت‌های ژنی با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده و در ترموسایکلر مدل T100 کمپانی BIO-RAD آمریکا صورت گرفت. برای انجام واکنش PCR به یک میکروتیوب استریل، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس PCR، 1 میکرولیتر cDNA و یک میکرولیتر از هرکدام از آغازگرها اضافه شد. سپس با آب استریل حجم نهایی مخلوط به ۲۰ میکرولیتر رسید. میکروتیوب سریعاً در دستگاه ترمال سایکلر گذاشته شد. برنامه زمانی و چرخه دمایی شامل پنج دقیقه نگهداری در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه نگهداری در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۶ ثانیه نگهداری در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر (دمای اتصال برای ژن BADH 66 درجه سانتی‌گراد و برای ژن اکتین ۶۴ درجه سانتی‌گراد بود)، یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس پنج دقیقه نگهداری در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. این برنامه‌ها با تعداد ۳۰ چرخه راه‌اندازی شد.

در مرحله نهایی محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. پس از تأیید تکثیر قطعات ژنی توسط الکتروفورز، عکس‌های گرفته‌شده از ژل توسط دستگاه سیستم تصویربرداری ژل مدل E-BOX-CX5 ساخت کمپانی Vilber فرانسه، در نرم‌افزار Image J نسخه r۱,۴۶ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. باندهای حاصل از ژن BADH و Actin، با استفاده از میزان Gray value در نرم‌افزار ImageJ امتیازدهی شدند. تمامی باندها بر اساس میزان Gray value موجود در باند ژن Actin توسط نرم‌افزار استاندارد شد. به این صورت که نسبت میزان Gray value موجود در باند ژن BADH به میزان Gray value موجود در باند ژن Actin به دست آمد و نمودار اعداد حاصل در نرم‌افزار اکسل رسم گردید.

این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار با چهار ریز نمونه در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه تبریز به اجرا در آمد. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

میزان گلایسین بتائین (GB)

مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که بین غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی مول بر لیتر اسید سالیسیلیک با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت و به‌طور معنی‌داری مقدار این آمینواسید در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی مول بر لیتر اسید سالیسیلیک بیشتر از شاهد بوده است، به نظر می‌رسد که غلظت مؤثر اسید سالیسیلیک که موجب افزایش مقدار این آمینواسید شد غلظت ۱۰۰ میلی مول بر لیتر اسید سالیسیلیک بود همچنین با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک به‌طور معنی‌داری مقدار این آمینواسید هم افزایش یافت شکل (۱) نشان داد که به‌طور معنی‌داری مقدار گلایسین بتائین در غلظت ۷۰ میلی مول بر لیتر سدیم کلراید بیشتر از شاهد بوده و اختلاف معنی‌داری بین غلظت ۷۰ میلی مول بر لیتر سدیم کلرید و شاهد ازنظر مقدار گلایسین بتائین وجود داشت. بالا رفتن میزان گلایسین بتائین در بسیاری از گیاهان زراعی از جمله گندم و پنبه در طی تنش شوری گزارش شده است (Manchanda and Garrg., 2008). احتمالاً افزایش این آمینواسید که ازجمله اسموپروتکتانت‌هایی است که قادر به محافظت گیاه در برابر انواع تنش‌ها و از طریق تنظیم اسمزی سلول، خنثی‌سازی سمیت انواع اکسیژن فعال، پایداری غشاء، تحمل گیاه به تنش‌های را افزایش می‌دهد (Ashraf et al., 2007). آزمایش دیگر نیز نشان داد که با افزایش غلظت گلایسین بتائین، از میزان انباشت گونه‌های فعال اکسیژن درون‌سلولی کاسته می‌شود که ممکن است کاهش اثرات منفی گونه‌های فعال اکسیژن در غلظت‌های بالای گلایسین بتائین به همین دلیل باشد (Duman et al., 2011).

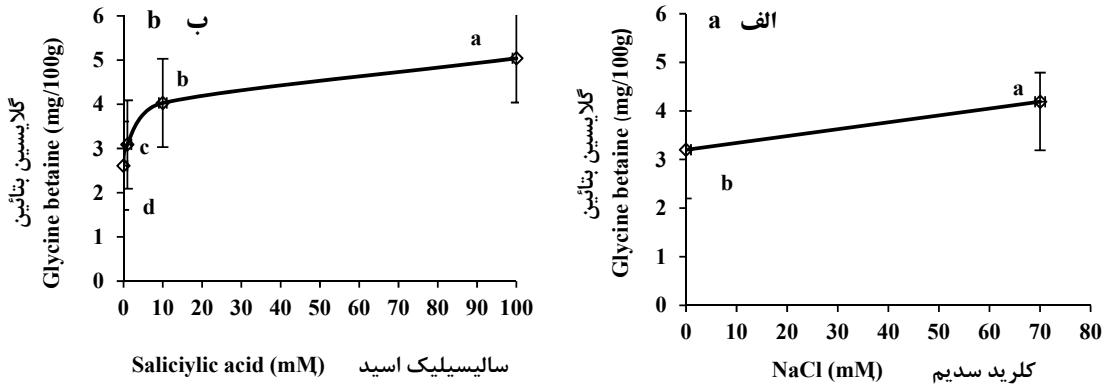
www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی رونوشت برداری از ژن *BADH*

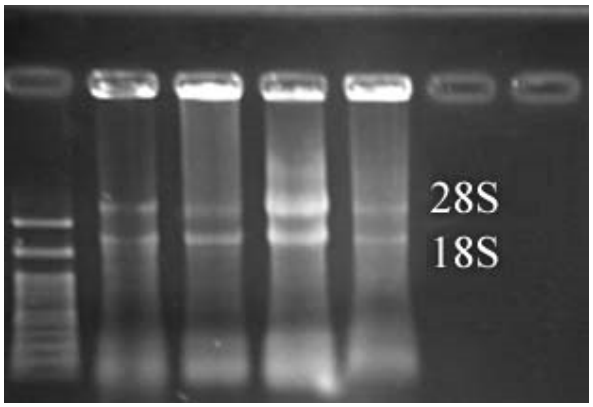
استخراج RNA

نمونه‌های RNA استخراج‌شده به روش اسپکتروفتومتری (۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد تا کیفیت و آلودگی RNA مشخص گردد. نتایج حاکی از آن بود که RNA استخراجی می‌تواند با اطمینان بالا در مراحل بعدی تحقیق مورداستفاده قرار گیرد. شکل ۲ باندهای مربوط به RNA ریبوزومی S28 و S18 را نشان می‌دهد (شکل ۲).



شکل ۱. تأثیر تیمار شوری (الف) و سالسیلیک اسید (ب) بر میزان تولید گلایسین بتائین در سیب‌زمینی رقم آگریا. حروف مختلف بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد است خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای معیار می‌باشند.

Fig. 1. Effects of Salinity and Salicylic acid treatment on glycine betaine in Agria cultivar of potato. The different letters are significantly different at the level of 5%. Vertical lines represent a standard error.



شکل ۲. اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی 28 S و 18 S استخراج‌شده از گیاه سیب‌زمینی.

Fig. 2. RNA quantification and visualization of 28S and 18 of ribosomal RNA extracted from potato

نتایج اثر تیمارهای شوری و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن *BADH*

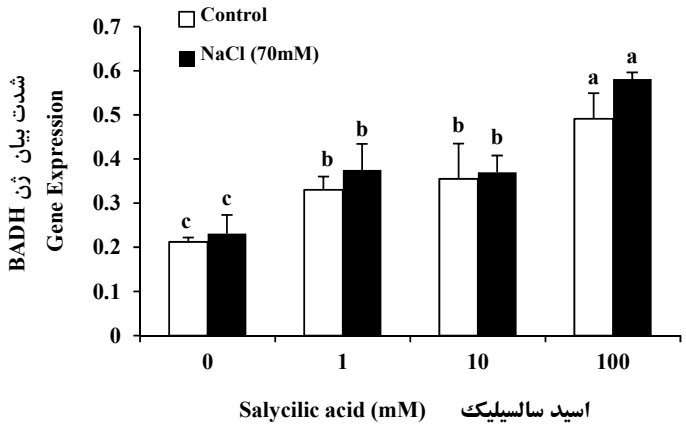
نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی نشان داد که بیان این ژن به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای تحت تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان بیان این ژن برای غلظت ۱۰ میلی مولار اسید سالیسیلیک و کمترین میزان در تیمار شاهد و بدون اسید سالیسیلیک بود (شکل ۳). ضمناً همان‌طور که از نتایج مشخص است به نظر می‌رسد شوری

www.SID.ir

Archive of SID

به‌طور قابل‌توجهی باعث افزایش رونوشت برداری از این ژن شده است و درواقع به نظر می‌رسد که شوری محرک رونوشت برداری از این ژن در راستای ایجاد مقاومت به تنش است. همچنین با توجه به اثرات افزایشی اسید سالیسیلیک در بیان ژن BADH در این گیاه به نظر می‌رسد، افزایش اثر دو عامل بیان ژن BADH توانایی گیاه در مقابله با تنش شوری را افزایش دهد. همچنین تیمار اسید سالیسیلیک اثری هم‌راستا با شوری در افزایش بیان ژن BADH و تقویت این سازوکار دفاعی در برابر تنش شوری داشته باشد. نتایج بررسی میزان بیان ژن BADH تحت تیمار اسید سالیسیلیک نشان داد که بیان این ژن در غلظت یک میلی مولار نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و بیشترین مقدار بیان در غلظت ۱۰۰ میلی مولار مشاهده شد، به نظر می‌رسد که اسید سالیسیلیک با فعال کردن کینازهایی که در مسیر انتقال پیام تنش شوری قرار دارند باعث القای بیان ژن‌هایی مثل BADH و افزایش مقاومت به تنش شوری می‌گردد (Hasehmi et al., 2018).

در بین ترکیبات محرک، اسید سالیسیلیک از مولکول‌های تأثیرگذار در مسیر علامت رسانی تنش‌ها است که به نقش آن در تحمل گیاه نسبت به شرایط تنش شوری به‌خوبی پی برده شده است و به‌تازگی نقش آن به‌عنوان یک ترکیب پیام‌رسان در فعال کردن پاسخ‌های گیاهان پررنگ‌تر شده است. این ترکیب ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کند که آنزیم‌ها و درنهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی راه‌اندازی کنند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه شوند (Jayakannan et al., 2015). شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از انتقال سیگنال را القا می‌کند که با تشخیص اسید سالیسیلیک توسط پذیرنده‌ها شروع می‌شود از طرف دیگر با توجه به بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز گلایسین بتائین می‌توان از اسیدسالیسیلیک جهت افزایش بیان ژن BADH در سنتز گلایسین بتائین استفاده کرد (Ahmad et al., 2018).



شکل ۳- تأثیر تیمار شوری و سالسیلیک اسید بر شدت بیان ژن BADE در سیب‌زمینی رقم آگریا. حروف مختلف بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig. 3. Effects of Salinity and Salicylic acid treatment on BADH gene expression. The different letters are significantly different at the level of 5%.

اسید سالیسیلیک همچنین باعث افزایش تولید گلایسین بتائین شد که درواقع نشان‌دهنده همبستگی مثبت بین بیان ژن BADH و گلایسین بتائین شد به‌طوری‌که روند تغییرات میزان بیان این ژن با روند تغییرات تولید گلایسین بتائین در غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک مطابقت داشت. نتیجه این تحقیق با یافته‌های تاگوچی و همکاران (Taguchi et al., 2001) و زیمرمن و همکاران (Zarrinkamar et al., 2013) که گزارش کردند اسید سالیسیلیک موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز و تولید گروهی متابولیت‌های ثانویه همچون آنتوسیانین و انواع فلاونوئیدها در گیاهان می‌شود مطابقت دارد. به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد اسید سالیسیلیک از طریق افزایش بیان ژن BADH باعث افزایش تولید گلایسین بتائین شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری نهایی

بررسی نتایج آزمایش حاضر چنین به نظر می‌رسد که صفات موردبررسی در آزمایش تحت تأثیر اولین سطح تنش شوری قرار گرفتند، همچنین کاربرد اسید سالیسیلیک منجر به بهبود پارامترهای بیوشیمیایی و مولکولی و افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش شوری گردید، اما در شرایط بدون تنش تأثیری بر پارامترهای ذکرشده نداشت. بر اساس تحقیقات پیشین با علم بر اینکه غلظت ۱۰۰ میلی مولار احتمال بروز علائم سمیت در گیاه را افزایش می‌دهد، بااین‌وجود در بین غلظت‌های اسید سالیسیلیک غلظت ۱۰۰ میلی مول بیشترین تأثیر مثبت را در کاهش اثرات تنش شوری بر گیاه داشت. همچنین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش تیمار اسید سالسیلیک باعث افزایش شدت بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز گردید که می‌تواند باعث بهبود اثرات منفی ناشی از تنش شوری گردد.

منابع

Aharon, G.S., Apse, M.P., Duan, S.H., Hua, X., Blumwald, E., 2003. Characterization of a family of vacuolar Na^+/H^+ antiporters in Arabidopsis thaliana. Plant and Soil. 10, 245–256.

Ahmad, P., Alyemeni, M.N., Ahanger, M.A., Wijaya, L., Alam, P., 2018. Salicylic acid (SA) induced alterations in growth, biochemical attributes and antioxidant enzyme activity in faba bean (*Vicia faba* L.) seedlings under NaCl toxicity. Russian Journal of Plant Physiology. 65(1), 104-114.

Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007.Roles of glycine betaine and proline in improve plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59, 206-216.

Bai, Y., Kissoudis, C., Yan, Z., Visser, R., Linden, D., 2017. Plant behaviour under combined stress: tomato responses to combined salinity and pathogen stress. The Plant Journal. 93(4), 781-793.

Brauner, F., Sebela, M., Snegaroff, J., Pec, P., Meunier, J.C., 2003. Pea seedling amino aldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. Plant Physiology and Biochemistry. 41, 1-10.

Bündig, C., Vu, T.H., Meise, P., Seddig, S., Schum, A., Winkelmann, T., 2017. Variability in osmotic stress tolerance of starch potato genotypes (*Solanum tuberosum* L.) as revealed by an in vitro screening: role of proline, osmotic adjustment and drought response in pot trials. Journal of Agronomy and Crop Science. 203, 206–218 .

Duman, F., Aksoy, A., Aydin, Z., Temizgul, R., 2011. Effects of exogenous glycine betaine and trehalose on cadmium accumulation and biological response of an aquatic plant. Water, Air and Soil Pollution. 217, 545-556.

Farooq, M., Aziz, T, Barsa, S.M., Cheema, M.A., Rahman, H., 2008. Chilling tolerance in hybrid maze induced by priming whit salicylic acid. Crop Science. 194, 161-168.

Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A., 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. Environmental and Experimental Botany. 68, 14-25.

Hashemi, F.S.G., Ismail, M.R., Rafii, M.Y., Aslani, F., Miah, G., Muharam, M.M., 2018. Critical multifunctional role of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in plants. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 26, 1-15.

Mahajan, S., Tuteja, N., 2005.Cold salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics. 444, 139 -158.

Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z., Shabala, S., 2015. Salicylic acid in plant salinity stress signaling and tolerance. Plant Growth Regulation. 76(1), 25-40 .

Manchanda, G., Garg, N., 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. Acta Physiology Plantarum. 30, 595-618.

Munoz-Clare's, R.A., Diaz Sanchez, A.G., Gonzalez-Seguura, L., Montiel, C., 2010. Kinetic and structure features of betaine aldehyde dehydrogenase: Mechanistic and regulatory implication. Archives of Biochemistry and Biophysics. 493, :71-81.

Mittova, V., Guy, M., Tal, M., Volokita, M., 2004. Salinity up-regulates theanti oxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt tolerant tomato species

www.SID.ir

Archive of SID

Lycopersicon pennellii. Journal of Experimemta Botany. 55, 1105-1113.

Sunker, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K., 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. Trends in Plant Science. 12, 301-309.

Taguchi, G., Yazawa, T., Hayashida, N., Okazaki, M., 2001. Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransfrases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin European. Journal of Biochemistry. 268, 4086-4094.

Yang, T., Zong, L.Z., Hongbo, S.H., Feng, D., 2006. Effect of water deficits on the activity of antioxidative enzyme and osmoregulation among three different genotype of Radix at seedling stage. Physiology and Biochemistry. 60, 9-65.

Zaman, M.S., Ali, G.M., Muhammad, A., Farooq, K., Hussain, I., 2015. In vitro screening of salt tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties Sarhad. Journal of Agriculture. 31, 106-113.

Zarrinkamar, F., Abdollazadeh Zaviehjak, A., Sharifi, M., Behmanesh, M., 2013. Effect of salicylic acid in flavonoids, apigenin, anthocyanin and carbohydrate in Mutricaria. Journal of Plant Biology. 5, 6-14.

www.SID.ir