



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

فرزانه فخمی^۱، علیرضا مطلبی آذر^۲، فریبرز زارع نهندی^۲، نعمت سخندان بشیر^۲، غلامرضا گوهری^{۳*}

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 از جمله 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. گلاسیسین 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 آگرا 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 گلاسیسین بتائین معنی‌دار بود، باین‌حال 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 بررسی شده اسید سالیسیلیک و تنش شوری نسبت به گیاه شاهد افزایش قابل توجهی 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 گلاسیسین بتائین مشاهده شد. چنین به نظر می‌رسد که کاربرد اسید سالیسیلیک 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، گلاسیسین 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 کمی 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 در نتیجه خشکی فیزیولوژیکی و بر هم زدن توازن غذایی گیاه می‌شود. گیاهان تحت تنش شوری،

سیب‌زمینی به‌عنوان یک محصول بسیار مهم غذایی، نقش مهمی در حل بحران غذا و رفع سوء‌تغذیه ایفا می‌کند که در حال حاضر کاهش کمی 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 در نتیجه خشکی فیزیولوژیکی و بر هم زدن توازن غذایی گیاه می‌شود. گیاهان تحت تنش شوری،

غلظت‌های بالای از یون K^+ و غلظت‌های پایین از Na^+ در سیتوسول حفظ می‌نمایند در واقع حفظ نسبت K^+/Na^+ از عناصر تحمل به شوری در گیاهان محسوب می‌شود (Aharon et al., 2003). عدم توازن متابولیکی ایجاد شده به‌وسیله سمیت 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. از آنجایی که آب از پتانسیل بالا به پتانسیل پایین حرکت می‌کند، انباشت این اسمولیت‌ها باعث پایین آمدن پتانسیل آب درون سلولی می‌شود و از هدر رفتن آب درون سلولی ممانعت می‌کند (Sunger et al., 2007). گلیسین 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 گلیسین بتائین را در کلروپلاست از طریق کولین و بتائین آلدئید سنتز می‌کنند. در مسیر بیوسنتزی گلیسین بتائین، کولین توسط آنزیم کولین مونو اکسیژناز به بتائین آلدئید و سپس توسط بتائین آلدئید دهیدروژناز به گلیسین بتائین تبدیل می‌گردد (Brauner et al., 2003). به نظر می‌رسد آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز (BADH) علاوه بر نقش در بیوسنتز گلیسین 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 از جمله ژن‌هایی است که به‌صورت مستقیم در تعدیل تنش نقش داشته و از طریق تبدیل بتائین آلدئید به گلیسین بتائین که یک آمینواسید تعدیل کننده تنش محسوب می‌شود، باعث مقاومت به شوری می‌شود (Munoz et al., 2010).

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 تیمامین و پیروکسین HCl و نیکوتینیک اسید استفاده گردید. پس از کشت ریزنمونه‌های تک گره، نمونه‌ها در شرایط

غلظت‌های بالای از یون K^+ و غلظت‌های پایین از Na^+ در سیتوسول حفظ می‌نمایند در واقع حفظ نسبت K^+/Na^+ از عناصر تحمل به شوری در گیاهان محسوب می‌شود (Aharon et al., 2003). عدم توازن متابولیکی ایجاد شده به‌وسیله سمیت 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. از آنجایی که آب از پتانسیل بالا به پتانسیل پایین حرکت می‌کند، انباشت این اسمولیت‌ها باعث پایین آمدن پتانسیل آب درون سلولی می‌شود و از هدر رفتن آب درون سلولی ممانعت می‌کند (Sunger et al., 2007). گلیسین 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 گلیسین بتائین را در کلروپلاست از طریق کولین و بتائین آلدئید سنتز می‌کنند. در مسیر بیوسنتزی گلیسین بتائین، کولین توسط آنزیم کولین مونو اکسیژناز به بتائین آلدئید و سپس توسط بتائین آلدئید دهیدروژناز به گلیسین بتائین تبدیل می‌گردد (Brauner et al., 2003). به نظر می‌رسد آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز (BADH) علاوه بر نقش در بیوسنتز گلیسین 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 از جمله ژن‌هایی است که به‌صورت مستقیم در تعدیل تنش نقش داشته و از طریق تبدیل بتائین آلدئید به گلیسین بتائین که یک آمینواسید تعدیل کننده تنش محسوب می‌شود، باعث مقاومت به شوری می‌شود (Munoz et al., 2010).

اسید سالیسیلیک یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید، یک تنظیم کننده رشد درونی از گروه ترکیبات فنلی طبیعی بوده که در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه نقش دارد (Yang

Plus بسیار خنک به میکروتیوب‌ها اضافه و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند، سپس ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردیدند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به هر یک از میکروتیوب‌ها اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شده و مجدداً برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میکروتیوب‌ها 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 به آرامی 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 از لحاظ کیفیت و کمیت 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.

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 مورد استفاده 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 در نهایت 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 سانتریفیوژ 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 میکروتیوب‌ها انتقال داده شدند. یک میلی‌لیتر محلول RNase

جدول ۱. توالی آغازگرهای BADH و اکتین مورد استفاده 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

(40 unit/μl)، ۴ میکرولیتر بافر واکنش (5X)، ۲ میکرولیتر Reverse (1۰ mM) dNTP و یک میکرولیتر آنزیم RevertAidTMM- (200 unit/μl) transcriptase (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

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 ممانعت‌کننده آنزیم RNase

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 به صورت 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 گلیسین 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 به طور 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 به طور معنی‌داری مقدار این آمینواسید هم افزایش یافت شکل (۱) نشان داد که به طور معنی‌داری مقدار گلیسین 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 کلراید و شاهد از نظر مقدار گلیسین بتائین وجود داشت. بالا رفتن میزان گلیسین 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 از جمله 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 گلیسین بتائین، از میزان انباشت گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی کاسته می‌شود که ممکن است کاهش اثرات منفی گونه‌های فعال اکسیژن در غلظت‌های بالای گلیسین بتائین به همین دلیل باشد (Duman et al., 2011).

فعالیت آنزیم M-MuLV، 42 درجه سانتی‌گراد است. به منظور 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. در نهایت 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 کمی به منظور ارزیابی نیمه کمی 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 طراحی شده 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 هر کدام 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.

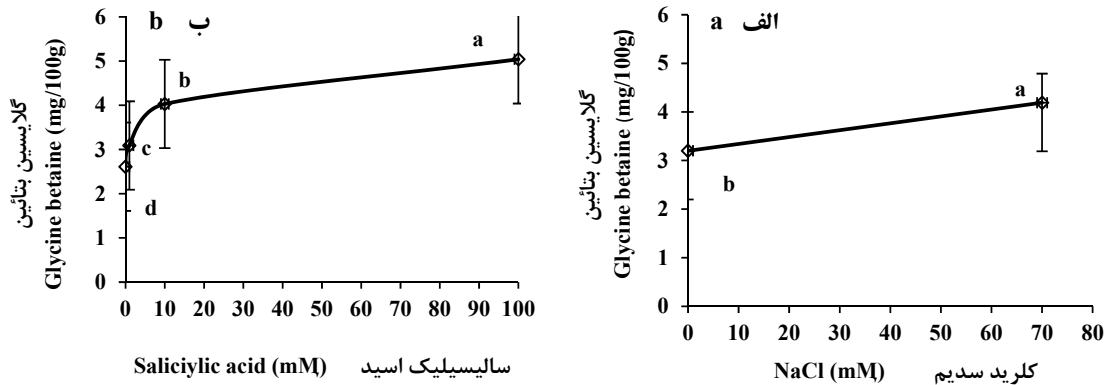
در مرحله نهایی محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. پس از تأیید تکثیر قطعات ژنی توسط الکتروفورز، عکس‌های گرفته‌شده از ژل توسط دستگاه سیستم تصویربرداری ژل مدل E-BOX-CX5 ساخت کمپانی Vilber فرانسه، در نرم‌افزار Image J نسخه r۱,۴۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. باندهای حاصل از ژن BADH و Actin، با استفاده از میزان Gray value در نرم‌افزار ImageJ امتیازدهی شدند. تمامی باندها بر اساس

نتایج حاکی از آن بود که RNA استخراجی می تواند با اطمینان بالا در مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گیرد. شکل ۲ باندهای مربوط به RNA ریبوزومی S18 و S28 را نشان می دهد (شکل ۲).

ارزیابی رونوشت برداری از ژن BADH

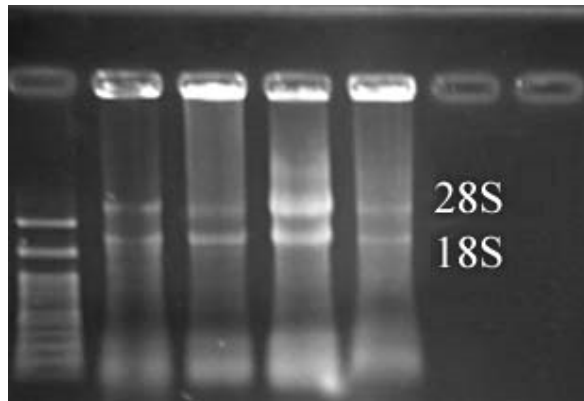
استخراج RNA

نمونه های RNA استخراج شده 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.



شکل ۱. تأثیر تیمار شوری (الف) و سالیسیلیک اسید (ب) بر میزان تولید گلیسین بتائین در سیب زمینی رقم آگریا. حروف مختلف بیانگر معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد است خطوط عمودی نشان دهنده خطای معیار می باشند.

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.



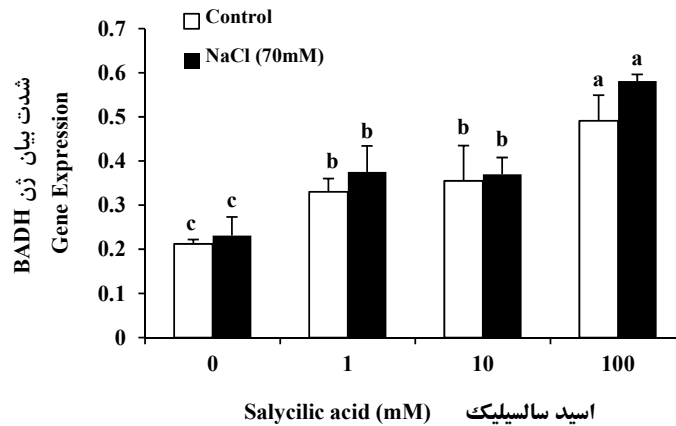
شکل ۲. اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی S 18 و S 28 استخراج شده از گیاه سیب زمینی.
Fig. 2. RNA quantification and visualization of 28S and 18S of ribosomal RNA extracted from potato

افزایش یافت به طوری که 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 همان طور که از نتایج مشخص است به نظر می رسد شوری

نتایج اثر تیمارهای شوری و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن BADH نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی نشان داد که بیان این ژن به طور قابل ملاحظه ای تحت تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک

در بین ترکیبات محرک، اسید سالیسیلیک از مولکول‌های تأثیرگذار در مسیر علامت‌رسانی 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 پرننگ‌تر شده است. این ترکیب ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کند که آنزیم‌ها و در نهایت 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 گلاسیسین بتائین می‌توان از اسیدسالیسیلیک جهت افزایش بیان ژن BADH در سنتز گلاسیسین بتائین استفاده کرد (Ahmad et al., 2018).

به‌طور قابل‌توجهی باعث افزایش رونوشت برداری از این ژن شده است و درواقع به‌نظر 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 به‌نظر 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 میلی‌مولار نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و بیشترین مقدار بیان در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد، به‌نظر 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).



شکل ۳- تأثیر تیمار شوری و سالیسیلیک اسید بر شدت بیان ژن BADH 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%.

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 گلاسیسین بتائین شد.

اسید سالیسیلیک همچنین باعث افزایش تولید گلاسیسین بتائین شد که درواقع نشان‌دهنده همبستگی مثبت بین بیان ژن BADH و گلاسیسین بتائین شد به‌طوری‌که روند تغییرات میزان بیان این ژن با روند تغییرات تولید گلاسیسین 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.,)

پیشین با علم بر اینکه غلظت ۱۰۰ میلی مولار احتمال بروز علائم سمیت در گیاه را افزایش می‌دهد، باین‌وجود 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 سالیسیلیک باعث افزایش شدت بیان ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز گردید که می‌تواند باعث بهبود اثرات منفی ناشی از تنش شوری گردد.

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

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 maize 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 Physiologiae 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 the anti oxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt tolerant tomato species

- Lycopersicon pennellii*. Journal of Experimenta 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 glucosyltransferases 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., Abdollahzadeh 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.