مقاله پژوهشی

تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) تحت تنش شوری

مریم دهجی‌پور حیدرآبادی[1*]، محمدرضا دهقانی[1]، فاطمه مرادی اندوهجردی[1]، خلیل ملک‌زاده[1] و فاطمه سروش[2]

[1] گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان

[2] گروه علوم و مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۳۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۱/۰۷)

چکیده

مقاومت به تنش شوری، یکی از دغدغه‌های اساسی در مناطق خشک و نیمه‌خشک است. در این پژوهش تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک در تنش شوری بر پارامترهایی مانند محتوی نسبی آب، نشت یونی، میزان پرولین، مالون دی‌آلدئید، ترکیبات فنلی، پروتئین کل، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و بیان ژن آنزیم‌های مهم در بیوسنتز اسید رزمارینیک (فنیل‌آلانین آمونیالیاز و اسید رزمارینیک سینتاز) در کشت هیدروپونیک گیاه بادرنجبویه بررسی شد. به این منظور گیاهان بادرنجبویه رشدیافته در محلول هوگلند، در معرض پیش‌تیمار اسید استیک با غلظت ۱۰ میکرومولار قرار گرفتند. پس از حذف اسید استیک تیمار شوری با استفاده از کلرید سدیم با غلظت ۳۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۱ روز اعمال شد. نتایج نشان داد که پیش‌تیمار اسید استیک، موجب کاهش درصد نشت یونی و میزان مالون دی‌آلدئید و افزایش میزان پرولین و فنل کل در تنش شوری شده است. هم‌چنین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی با پیش‌تیمار اسید استیک نسبت به گیاهان کنترل کاهش کمتری نشان داد. افزایش فعالیت و بیان ژن آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در تنش شوری مشاهده شد. بیان نسبی ژن اسید رزمارینیک سینتاز و به‌همراه آن میزان اسید رزمارینیک در تنش شوری افزایش یافت. هم‌چنین میزان اسید رزمارینیک در گیاهچه‌های بادرنجبویه ارتباط مثبت و معنی‌داری با فعالیت و بیان ژن‌های کلیدی در سنتز اسید رزمارینیک داشت. با توجه به نتایج بدست آمده، استفاده از پیش‌تیمار اسید استیک، با به راه انداختن مکانیسم‌های حمایتی مانند کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، افزایش میزان پرولین، ترکیبات فنلی و رنگیزه‌های فتوسنتزی، در تعدیل تنش شوری نقش بسزایی داشته است.

واژه‌های کلیدی: اسید استیک، اسید رزمارینیک، بادرنجبویه، شوری، فنیل‌آلانین آمونیالیاز

مقدمه

از آنجایی‌که گیاهان موجودات غیرمتحرکی هستند، سازوکارهای بی‌شماری را جهت سازگاری با تغییرات ایجاد شده در شرایط رشد خود اتخاذ کرده‌اند تا تحت تأثیر عوامل محیطی، بدون تأثیرگذاری بر فرآیندهای سلولی، فیزیولوژیکی و نموی، انعطاف‌پذیری لازم را در پاسخ به تغییرات محیطی نشان دهند (Yang *et al*., 2018).

تنش شوری از مهم‌ترین و متداول‌ترین تنش‌های محیطی

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m.dahaji@vru.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

در جهان و از جمله ایران است که باعث کاهش بهره‌وری محصول در مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌شود. شوری به دلیل اثرگذاری‌های اسمزی بر دامنه گسترده‌ای از واکنش‌های سوخت‌وسازی، موجب کمبود آب در گیاه و اختلال در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیسم سلولی می‌شود. اثرات منفی غلظت‌های بالای نمک به‌صورت تأخیر در رشدونمو گیاه، مهار فعالیت‌های آنزیمی و کاهش میزان فتوسنتز مشاهده می‌شود. تنش شوری با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، به تنش اکسیداتیو منجر می‌شود (Isayenkov, 2012).

تنش شوری به‌دلیل اثرات سوء بر پایداری غشا تیلاکوئیدها و کاهش میزان کلروفیل، به‌شدت فتوسنتز را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از آنجایی‌که رنگیزه‌های فتوسنتزی دارای نقش کلیدی در فتوسنتز هستند کاهش در میزان فتوسنتز درنتیجه تنش شوری با کاهش در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی مرتبط است (Taibi *et al*., 2016). گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده در نتیجه تنش شوری از طریق پراکسیده کردن لیپیدهای غشایی، افزایش میزان مالون دی‌آلدئید، نفوذپذیری غشا و نشت یونی را موجب می‌شوند. بنابراین اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید و نشت یونی از غشای پلاسمایی به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم جهت تعیین تحمل تنش در گیاهان، مورد استفاد قرار می‌گیرد (Ashraf and Ali, 2008).

مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی توسط گیاهان به‌منظور بقا در شرایط تنش شوری بکار گرفته می‌شود. این مکانیسم‌های شامل هموستازی و کده‌بندی یون، انتقال و جذب یون، بیوسنتز مواد آلی اسموپروتکتانت و محلول‌های سازگار، فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدان، سنتز پلی‌آمین‌ها، تولید نیتریک اکسید و تنظیم هورمونی است (Gupta and Huang, 2014). تجمع پرولین معیاری شناخته‌شده برای تعدیل تنش شوری است. پرولین تجمع‌یافته در طی تنش شوری نه تنها تحمل در طول تنش را موجب می‌شود بلکه به‌عنوان ذخیره نیتروژن آلی در زمان بهبود تنش نیز عمل می‌کند. پرولین از طریق بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و حذف گونه‌های فعال اکسیژن، بهبود فعالیت فتوسیستم II در فتوسنتز و رشد گیاه، حفظ وضعیت آبی مناسب و پایدارنمودن ساختار درشت مولکول‌ها در غشا، تحمل به تنش را در گیاهان افزایش می‌دهد (Ben Ahmed *et al*., 2010).

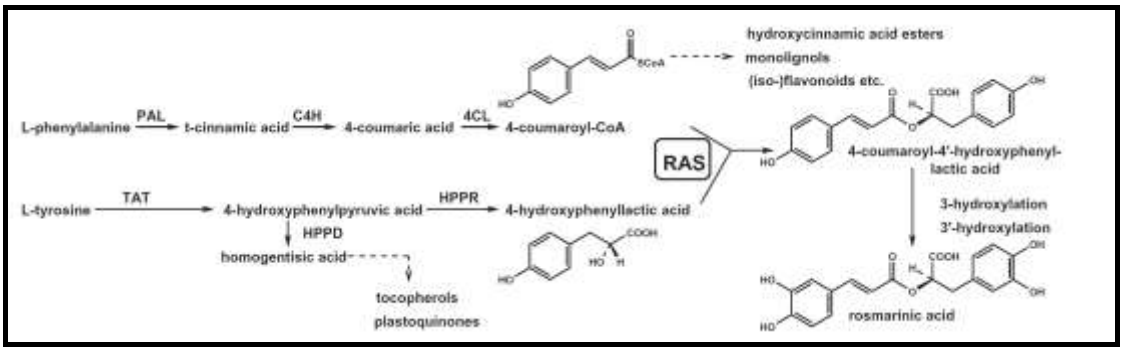
تعداد قابل توجهی از متابولیت‌های ثانویه مانند ترپنوئیدها و استروئیدها، فنولیک‌ها و فلاونوئیدها و آلکالوئیدها در تنش سلولی و پاسخ دفاعی، با حذف رادیکال‌های آزاد، به‌عنوان یک سازگاری با شرایط تنش، در گیاهان تولیدکننده این ترکیبات محسوب می‌شوند. شواهد نشان داده است که متابولیت‌های ثانویه در دفاع غیرآنزیمی گیاهان در برابر تنش‌ها نقش دارند (Edreva *et al*., 2008). سنتز و تجمع ترکیبات فنلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در پاسخ به تنش‌های محیطی تحریک می‌شود. این ترکیبات قادرند اثرات منفی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری را با حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تا حدودی کاهش دهند (Das and Roychoudhury, 2014).

بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* L. گیاهی با خواص دارویی از جمله تسکین‌دهنده، تب‌بر، ضداسپاسم، آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری، ضدویروس، کاهش‌دهنده ضربان قلب و آرام‌بخش است (Moradkhani *et al*., 2010). اسید رزمارینیک فراوان‌ترین ترکیب فنلی موجود در گیاه بادرنجبویه، استر اسید کافئیک و ۳،٤- دی‌هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید است. بیوسنتز اسید رزمارینیک از طریق مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدی با استفاده از پیش‌ماده فنیل‌آلانین صورت می‌گیرد که با دخالت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) به اسید سینامیک تبدیل می‌شود. آنزیم رزمارینیک اسید سینتاز (RAS)، آخرین واکنش را در مسیر بیوسنتزی اسید رزمارینیک کاتالیز می‌کند (شکل ۱).

در بررسی ترنسکریپتوم گیاهان تولیدکننده اسید رزمارینیک، ارتباط سنتز اسید رزمارینیک با بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی آن از جمله ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز تأیید شده است (Weitzel and Petersen, 2011).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی اسید رزمارینیک

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)، آنزیمی کلیدی در شروع مسیر فنیل پروپانوئیدی، جهت سنتز ترکیبات فنلی که نقش مهمی در دفاع گیاهان در مقابل تنش‌ها به عهده دارند ضروری است. فنیل‌آلانین آمونیالیاز پیش‌ماده مشترک (اسید سینامیک) برای بیوسنتز محصولات مختلف فنیل پروپانوئیدی را فراهم می‌کند. بنابراین، فنیل‌آلانین آمونیالیاز یکی از آنزیم‌های کلیدی است که جریان متابولیت‌های اولیه را به کانال متابولیسم ثانویه هدایت و کنترل می‌کند. افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در بسیاری از گیاهان به علت القای تولید ترکیبات فنلی به‌ویژه در تنش‌های گوناگون گزارش شده است (Sahu *et al*., 2013).

نقش حمایتی اسیدهای آلی در بهبود اثرات منفی تنش‌ها بر فیزیولوژی و متابولیسم سلولی در چندین مطالعه گزارش شده است. به‌عنوان مثال بررسی گیاهان هالوفیت نشان داد که این گیاهان با افزایش میزان اسید سیتریک درونی از طریق بهبود فتوسنتز، سرعت رشد نسبی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نسبت به شوری مقاومت نشان دادند (Sun and Hong, 2011). در همین راستا کاربرد خارجی اسید سیتریک، اثر تنش غیرزیستی بر میزان کلروفیل، نشت یونی، میزان مالون دی‌آلدئید را تعدیل نموده و نقش حمایتی اسید سیتریک در تنش غیرزیستی در گیاهان را تأیید کرده است (Hu *et al*., 2016; El-Tohamy *et al*., 2013). هم‌چنین پیش‌تیمار گیاهان با اسید سالیسیلیک با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه اثر منفی تنش بر فتوسنتز، رشد و نشت یونی را بهبود داد (Janda *et al*., 1999). بررسی گیاهان جهش‌یافته مقاوم به تنش خشکی نسبت به گیاهان وحشی نشان داد که گیاهان جهش‌یافته با افزایش میزان اسید استیک درونی، از طریق هدایت جریان متابولیسمی از گلیکولیز به سمت سنتز اسید استیک با تحریک مسیر پیام‌رسانی جاسمونات در گیاه، نسبت به تنش مقاوم بوده‌اند. براساس این نتایج پیشنهاد شد که اضافه‌کردن اسید استیک به محیط‌کشت گیاهان قبل از قرارگرفتن در معرض تنش می‌تواند آنها را در بقا در شرایط تنش حمایت کند (Kim *et al*., 2017).

در این پژوهش تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک در تنش شوری بر پارامترهایی مانند محتوی نسبی آب، نشت یونی، میزان پرولین، مالون دی‌آلدئید، ترکیبات فنلی، پروتئین کل، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و بیان ژن آنزیم‌های مهم در بیوسنتز اسید رزمارینیک (فنیل‌آلانین آمونیالیاز و اسید رزمارینیک سینتاز) در کشت هیدروپونیک گیاه دارویی بادرنجبویه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جوانه‌زنی بذرهای گیاه بادرنجبویه بعد از ضدعفونی کردن سطحی آن‌ها با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد، در تاریکی انجام شد. بعد از انتقال دانه‌رست‌های با طول یکسان به ظروف کشت مخصوص کشت هیدروپونیک حاوی محیط هوگلند تغییریافته شامل (برحسب میلی‌مولار): $Ca(NO_3)_2.\ 4H_2O$، ۲/۵؛ KNO_3، ۲/۵؛ $MgSO_4.\ 7H_2O$، ۱/۰؛ KH_2PO_4، ۰/۵؛ Fe-EDTA، ۰/۰۳۲؛ H_3BO_3، ۰/۰۴۵؛ $MnCl_2.\ 4H_2O$، ۰/۰۰۹۱؛ $ZnCl_2$، ۰/۰۰۰۷۶؛ $CuCl_2.\ 2H_2O$، ۰/۰۰۰۳۱؛ $NaMoO_4.\ 2H_2O$، ۰/۰۰۰۲۱، با اسیدیته ٦، گیاهان به‌مدت ٤٥

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

روز در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵°C و شدت نور ۶۰μmolm^{-2}S^{-1} قرار داده شدند. به‌منظور تأمین اکسیژن، هوادهی به‌طور پیوسته و جهت تأمین یکنواخت مواد مغذی، تعویض محلول غذایی هر ۲ تا ۳ روز یک‌بار صورت گرفت. پس از گذشت مدت زمان ۴۵ روز از رشد گیاهچه‌ها، پیش‌تیمار اسید استیک با غلظت ۱۰ میکرومولار به‌مدت ۹ روز صورت گرفت. سپس تیمار شوری با استفاده از کلرید سدیم با غلظت ۳۵ میلی‌مولار اعمال گردید. نمونه‌برداری در زمان‌های ۶ ساعت، ۲۴ ساعت و ۱۱ روز پس از آغاز تنش از قسمت‌های هوایی گیاه انجام و نمونه‌های گیاهی پس از انجماد با ازت مایع تا هنگام بررسی‌های بعدی به فریزر ۸۰°C- منتقل شدند. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

تعیین محتوی نسبی آب و نشت یونی: برای اندازه‌گیری این صفت ۰/۵ گرم (FW) از جوان‌ترین برگ توسعه‌یافته هر گیاه را جدا و سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در آب‌مقطر شناور و در تاریکی (جلوگیری از فتوسنتز) قرار داده شد. پس از گذشت این مدت وزن اشباع برگ (TW) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰°C قرار داده و پس از گذشت این مدت وزن خشک (DW) اندازه‌گیری شد .محتوی نسبی آب (RWC%) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Ritchie *et al.*, 1990).

$$RWC (\%) = [(FW- DW) / (TW- DW)] \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری نشت یونی به روش Lutts و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. به این منظور ابتدا ۰/۳ گرم نمونه توزین و با آب مقطر شست‌وشو داده شد. سپس درون لوله‌های آزمایش حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر در دمای ۲۵°C و به‌مدت ۲۴ ساعت با استفاده از شیکر تکان داده شد و پس از آن نشت یونی محلول L_1 اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد به نمونه‌ها ۲۰ سی‌سی آب مقطر اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو و در پایان نشت یونی محلول L_2 اندازه‌گیری شد و میزان کل نشت یونی EC (خسارت وارده به غشاء سلولی) از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$EC(\%) = [L_۱/(L_۱+L_۲)] \times ۱۰۰$$

نشت یونی با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (EC متر: مدل Eco Met ساخت کشور کره) در محلول آبی محتوی قطعات برگ اندازه‌گیری شد که میزان مواد محلول را در محلول آبی نشان داده و معیاری از آسیب وارد شده به غشاء سلول و خروج مواد محلول از غشاء سلولی به محلول آبی است.

سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی: برای سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید برگ از روش Arnon (۱۹۴۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم از نمونه برگی را در ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد درون هاون چینی ساییده شد. پس از صاف‌کردن محتوای هاون توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱، حجم کلی نمونه با استفاده از استون ۸۰ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. شدت جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena) در طول‌موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل‌های *a* و *b* و طول‌موج ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئید خوانده شد. میزان کلروفیل و کاروتنوئید با استفاده از روابط زیر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ محاسبه گردید.

$$\text{کلروفیل } a \text{ (mg g}^{-1}) = [۱۲/۷ (A_{۶۶۳}) - ۲/۶۹ (A_{۶۴۵})] \times V / (۱۰۰۰W)$$

$$\text{کلروفیل } b \text{ (mg g}^{-1}) = [۲۲/۹ (A_{۶۴۵}) - ۴/۶۸ (A_{۶۶۳})] \times V / (۱۰۰۰W)$$

$$\text{کلروفیل } a+b \text{ (mg g}^{-1}) = [۲۰/۲ (A_{۶۴۵}) - ۸/۰۲ (A_{۶۶۳})] \times V / (۱۰۰۰W)$$

$$\text{کاروتنوئید (mg g}^{-1}) = [۱۰۰۰ (A_{۴۷۰}) - ۱/۸۲ (\text{کلروفیل } a) - ۸۵/۰۲ (\text{کلروفیل } b)] / ۱۹۸ \times V / (۱۰۰۰W)$$

در رابطه‌های بالا، V حجم نمونه استخراج‌شده برحسب میلی‌لیتر و W وزن تر نمونه برحسب گرم است.

سنجش مالون دی‌آلدئید: سنجش مالون دی‌آلدئید به‌عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء به روش De Vos و همکاران (۱۹۹۱) انجام شد. ابتدا به میزان ۰/۲ گرم از نمونه‌ها سه میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ده درصد اضافه و مخلوط حاصل به‌مدت ده دقیقه در ۵۰۰۰ ×g

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از روشناور را به لوله‌های درب پیچ شیشه‌ای منتقل و به آن یک میلی‌لیتر تیوباربی‌توریک اسید (TBA) نیم درصد اضافه گردید. سپس مخلوط آزمایش به‌مدت نیم ساعت درون بن‌ماری تحت دمای ۱۰۰°C قرار گرفت. بلافاصله پس از خروج از بن‌ماری نمونه‌ها روی یخ منتقل و با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena) جذب آن‌ها در طول‌موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. میزان مالون دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی (ε=۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$) محاسبه شد.

سنجش پرولین: به‌منظور اندازه‌گیری میزان پرولین، ۰/۲ گرم از جوان‌ترین برگ‌ها را با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ٪۳ (W/V) ساییده و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. سپس به روشناور بدست آمده، دو میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال افزوده و به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار داده شد. پس از سردکردن مخلوط واکنش روی یخ، به آن چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه و سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. غلظت پرولین برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر با استفاده از منحنی استاندارد پرولین و معادله خط ($y=0.0021x-0.0285$; $R^2=0.9544$) تعیین شد. از غلظت‌های صفر تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پرولین به‌عنوان استاندارد استفاده شد (Bates *et al.*, 1973).

سنجش ترکیبات فنلی تام: میزان ترکیبات فنلی براساس روش رنگ‌سنجی فولین- سیوکالتیو و برحسب منحنی استاندارد اسید گالیک در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Singleton and Rossi, 1965). ۰/۲ گرم نمونه با سه میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ساییده و به‌مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۷۰°C قرار داده شد. سپس مخلوط را با سرعت ۹۰۰۰×g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و عصاره متانولی جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی مورد استفاده قرار گرفت. به ۲۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالتیو اضافه شد. به مخلوط حاصل بعد از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ ٪ اضافه و به‌مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد. درنهایت جذب هر نمونه در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena) خوانده و مقدار فنل کل برحسب منحنی استاندارد اسید گالیک با غلظت صفر تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و معادله خط ($Y=0.0062X+0.148$; $R^2=0.9734$) محاسبه شد.

سنجش پروتئین تام: سنجش پروتئین تام براساس روش Bradford (۱۹۷۶) انجام گرفت. پروتئین تام با استفاده از بافر پتاسیم بورات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۸/۸ حاوی بتا- مرکاپتواتانول ۲ میلی‌مولار استخراج شد. به ۱۰۰میکرولیتر عصاره یک میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه، بعد از مخلوط شدن، جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena) خوانده شد. غلظت پروتئین در نمونه‌ها با استفاده از رسم منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی (Bovin Serum Albumin) با غلظت صفر تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و معادله خط ($Y=0.0026X+0.065$; $R^2=0.9976$) محاسبه شد.

سنجش فعالیت ویژه آنزیم PAL: فعالیت آنزیم PAL به عنوان آنزیمی کلیدی در متابولیسم ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شد. ۰/۲ گرم نمونه برگی منجمد را درون هاون توسط بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸ حاوی مرکاپتواتانول دو میلی‌مولار ساییده و سپس با سرعت ۹۰۰۰×g به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤°C سانتریفیوژ و روشناور برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل فنیل‌آلانین (۱۰ میلی‌مولار) به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر، بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار به میزان یک میلی‌لیتر با اسیدیته ۸/۸، آب‌مقطر به میزان ۰/٤ میلی‌لیتر و عصاره استخراجی به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر بود. نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری و برای توقف واکنش آنزیمی از اسید کلریدریک ٦ مولار استفاده شد. اسید سینامیک موجود، سه مرتبه توسط اتیل استات استخراج و با جریانی از هوای تصفیه‌شده خشک گردید. میزان اسید سینامیک پس از حل‌کردن در NaOH ۰/۰۵ مولار، در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

برحسب میزان اسید سینامیک به ازای میلی‌گرم پروتئین در مدت زمان یک ساعت بیان شد.

سنجش اسید رزمارینیک: عصاره‌گیری نمونه‌های برگی خشک با استفاده از متانول انجام شد. برای سنجش میزان اسید رزمارینیک مخلوط آزمایش شامل ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره صاف‌شده، ۳ میلی‌لیتر اتانول و زیرکونیوم اکسی‌کلراید $ZrOCl_2$ در غلظت نهایی ۰/۵ مولار بود. مخلوط حاصل به‌مدت ۵ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۳٦۲ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت اسید رزمارینیک در هر نمونه، با استفاده از استاندارد اسید رزمارینیک برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد (Ozturk *et al*., 2010).

استخراج RNA و ساخت رشته اول cDNA: استخراج RNA نمونه‌ها با استفاده از کیت Column RNA isolation kit براساس دستورالعمل شرکت سازنده (دنا زیست آسیا) انجام و پس از حذف DNA ژنومی با استفاده از آنزیم DNase1، محصول شرکت Thremo Scientific، کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز تأیید شد. ساخت رشته اول cDNA از ۰/۵ میکروگرم RNA کل با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit شرکت Thermo Scientific انجام و بعد از رقیق‌سازی به‌عنوان الگو در واکنش‌های Real-time PCR مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز: برای بررسی کمی بیان ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز، از آغازگرهای اختصاصی با طول قطعه تکثیرشونده حدود ۱۳۰ جفت باز استفاده شد (جدول ۱). ساخت آغازگرها توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی به سفارش شرکت دنا زیست آسیا صورت گرفت.

مخلوط واکنش شامل ٤ میکرولیتر cDNA رقیق‌شده، ۰/۲۵ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین (RealQ Plus Master Mix Green) با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. دستگاه Real-time مدل 9600 plus شرکت Bioer، برای بررسی بیان ژن‌ها به روش Relative Quantitative PCR مورد استفاده قرار گرفت. مراحل واکنش شامل سه مرحله به‌ترتیب مرحله اول، ۹۵°C به‌مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم،٤۰ چرخه ۹۵°C به‌مدت ۱۵ ثانیه، ٦۰°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۲۵ ثانیه و مرحله سوم، منحنی ذوب از ۵۵ تا ۹۵°C با فاصله‌های افزایشی ۰/۵°C در مدت ۱۵ ثانیه بود. در بررسی کمی بیان ژن‌های مورد نظر از EF1α به‌عنوان شاهد داخلی استفاده شد. با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ تعداد نسخه‌های تکثیرشده برای هر ژن محاسبه گردید. مقدار نسخه‌های هر ژن در هر نمونه نسبت به مقدار نسخه‌های تکثیرشده ژن کنترل داخلی در همان نمونه نرمالیزه و سپس داده‌ها در نمونه‌های تیمار نسبت به شاهد کالیبره گردید.

تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. برای بررسی تفاوت‌های معنی‌دار، مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد با آزمون دانکن صورت گرفت. محاسبه میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارهای مربوط با استفاده از بسته نرم‌افزاری Excel نسخه ۲۰۱۳ انجام شد.

نتایج و بحث

محتوی نسبی آب و نشت یونی: درصد محتوی نسبی آب در زمان ۱۱ روز (۲٦٤ ساعت) پس از اعمال تنش شوری تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد (جدول ۲).

اگر چه کاهش درصد محتوی نسبی آب برگ در تنش شوری در گیاهان زیادی گزارش شده است؛ اما در تنش اسمزی ملایم ایجادشده در کشت هیدروپونیک گندم تفاوت معنی‌داری در محتوی نسبی آب برگ مشاهده نشد (Marcinska *et al*., 2013). نتایج این تحقیق در راستای نتایج این پژوهش بود. براساس نتایج Galeano و همکاران (۲۰۱۹)، درصد محتوی نسبی آب در گیاهان ساج که در معرض تنش ملایم قرار گرفته بودند ۱۱٪ بیش‌تر از گیاهان شاهد بود. دلیل عدم کاهش در محتوی نسبی آب برگ در تنش شوری این است که کاهش در جذب آب، به کاهش در مقدار آب برگ منجر می‌شود. درنتیجه گیاه برای حفظ وضعیت آبی خود

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

جدول ۱- فهرست آغازگرهای اختصاصی برای واکنش‌های RT-PCR (Doring *et al*., 2014)

ژن		توالی آغازگرها
MoPAL	رفت:	5' GCCGAAGTCATGAACGGAAAGC 3'
	برگشت:	5' CGCAGCCTTAACATAACCGCTC 3'
MoRAS	رفت:	5' ACGCCCCGACCTCAACCTTATC 3'
	برگشت:	5' AAGTGGTGCTCGTTTGCCACG 3'
MoEF1α	رفت:	5' TTGCTGCTGCAACAAGATGGAC 3'
	برگشت:	5' GGGACGAATGCGATTTTGTCGG 3'

جدول ۲- میزان محتوی نسبی آب و نشت یونی در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری

تیمار	محتوی نسبی آب (درصد)	نشت یونی (درصد)
شاهد	۸۰/۵۳ ± ۲/۷۱[a]	۵۹/۶۳ ± ۲/۹۸[b]
تنش شوری	۸۰/۴۲ ± ٤/۱۵[a]	۷۰/۲۱ ± ٦/۷٤[a]
اسید استیک + تنش شوری	۸۲/۱۸ ± ۲/٦٦[a]	۵۷/۹٤ ± ٤/۷۳[b]

داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن است.

روزنه‌ها را به حالت نیمه‌باز درآورده و با افزایش هدایت هیدرولیکی، جریان آب از ریشه به ساقه و درنهایت محتوی نسبی آب را در شرایط تنش افزایش داده است (Galeano *et al*., 2019).

تنش شوری به تنهایی درصد نشت یونی در زمان ۱۱ روز پس از اعمال تنش را، به میزان ۱۷/۷٤٪ نسبت به شاهد افزایش داد. درحالی‌که، در گیاهان با پیش‌تیمار اسید استیک همراه با تنش شوری درصد نشت یونی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). نفوذپذیری انتخابی غشا در سلول مانع ایجاد تعادل بین سلول و محیط خارج سلولی می‌گردد. افزایش میزان آسیب به غشای سلولی در شرایط تنش، کاهش نفوذپذیری انتخابی غشا و افزایش نشت یونی را موجب می‌شود (Ashraf and Ali, 2008). نتایج مطالعات زیادی نشان داده است که کاربرد اسید سالیسیلیک و اسید سیتریک در تنش‌های محیطی، کاهش معنی‌دار نشت یونی در گیاهان تحت تنش را به‌همراه داشته است (Ma *et al*., 2017; Soltani Maivan *et al*., 2017; Hu *et al*., 2016; Chaparzadeh and Hosseinzad-Behboud, 2015; El-Tohamy *et al*., 2013; Janda *et al*., 1999). بر این اساس در این پژوهش نیز، استفاده از پیش‌تیمار اسید استیک با ترمیم آسیب غشایی ناشی از تنش شوری درصد نشت یونی را کاهش داده است.

میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی: میزان کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل تحت تأثیر اثر اصلی تنش شوری، زمان پس از اعمال تنش شوری و اثرات متقابل این دو عامل در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت. اثر اصلی تنش شوری و اثر متقابل آن با زمان پس از اعمال تنش شوری بر میزان کاروتنوئید در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

بررسی اثر تنش شوری بر میزان کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید نشان داد که در زمان ٢٤ ساعت پس از اعمال تنش، تغییرات میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به شاهد معنی‌دار نبود؛ اما در زمان ۱۱ روز پس از اعمال تنش،

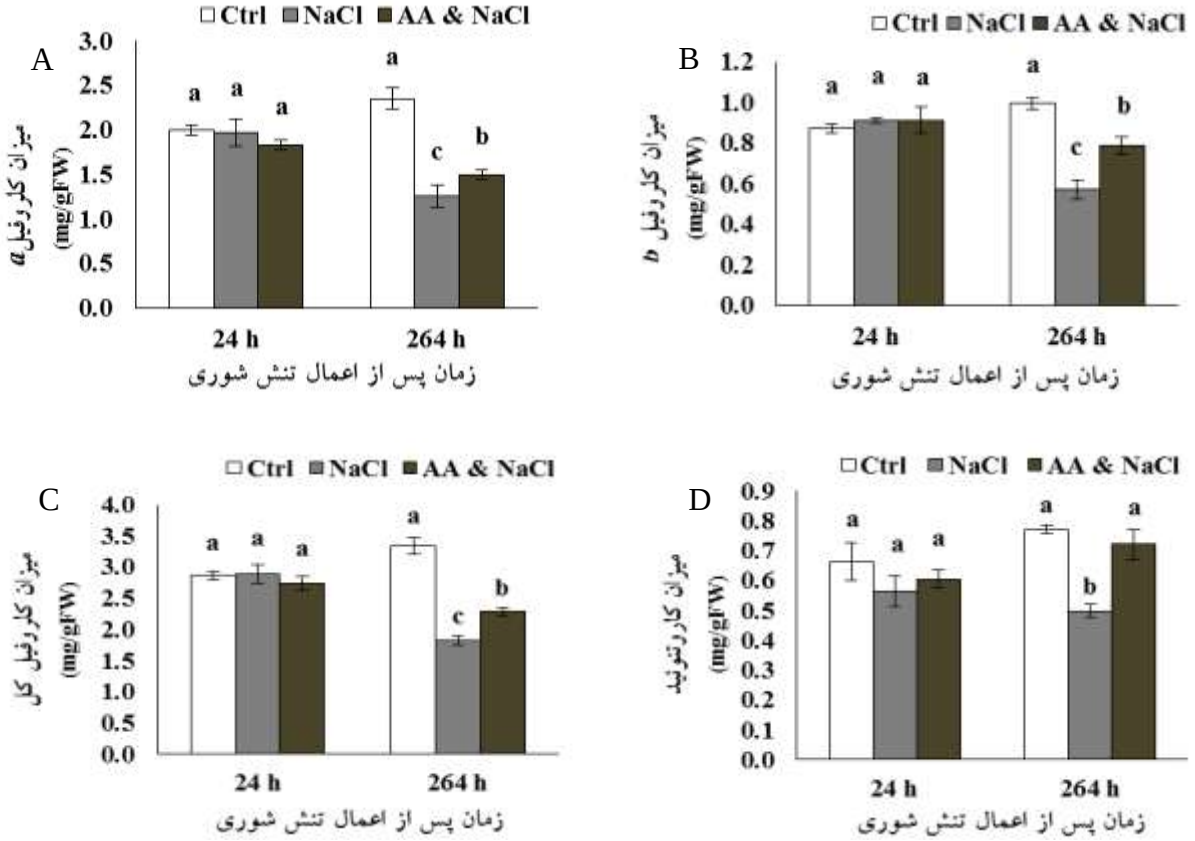
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات تنش شوری و زمان پس از اعمال تنش شوری بر میزان کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		کلروفیل *a*	کلروفیل *b*	کلروفیل کل	کاروتنوئید
تنش شوری	۲	۰/۵۷۴**	۰/۰۵۵**	۰/۹۴۴**	۰/۰۵۵**
اشتباه ۱	۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۲
زمان	۱	۰/۲۴۰**	۰/۰۶۱**	۰/۵۴۴**	۰/۰۱۳ns
تنش شوری × زمان	۲	۰/۴۴۷**	۰/۰۸۱**	۰/۹۰۴**	۰/۰۱۳**
اشتباه ۲	۶	۰/۰۱۶	۰/۰۰۱	۰/۰۱۴	۰/۰۰۱
R Square		۰/۹۷	۰/۹۶	۰/۹۸	۰/۹۵

*** و **به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ و ۱ درصد و ns عدم تفاوت معنی‌دار**



شکل ۲- تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک بر میزان کلروفیل *a* (A)، کلروفیل *b* (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئید (D) در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

کاهش معنی‌داری (در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵) در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به شاهد مشاهده شد. این در حالی است که پیش‌تیمار اسید استیک در تنش شوری، موجب افزایش معنی‌داری در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شده است (شکل ۲A-D).

کاهش کلروفیل به فعالیت آنزیم کلروفیلاز و تولید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

گونه‌های فعال اکسیژن در زمان تنش شوری نسبت داده شده است. گونه‌های فعال اکسیژن موجب برهم‌زدن ساختار غشایی کلروپلاست‌ها می‌شوند. از آنجایی‌که رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل *a* و *b*، در فتوسنتز دارای نقش کلیدی هستند کاهش در میزان فتوسنتز درنتیجه تنش شوری با کاهش در میزان کلروفیل مرتبط است (Taibi *et al*., 2016). نتایج Heidari (۲۰۱۲) بر روی گیاه ریحان (*Ocimum basilicm* L.) تحت تنش شوری نشان داد که تنش شوری علاوه بر کاهش رشد گیاهان، محتوای کلروفیل *a* و *b* را نیز کاهش داد. به‌رغم این‌که پژوهش‌های زیادی کاهش محتوای کلروفیل را تحت شرایط شوری گزارش کرده‌اند، افزایش سطح کلروفیل برگ در شرایط تنش در گیاه چغندر (*Beta vulgaris* L.) مشاهده شد (Jamil *et al*., 2006). به‌طورکلی افزایش محتوای کلروفیل برگ در شرایط تنش نشان‌دهنده افزایش کلروپلاست به‌منظور حفظ فتوسنتز گیاه است که خود از علائم مقاومت گیاه به تنش می‌باشد (Yang *et al*., 2006). از طرفی، کاهش در میزان کلروفیل در شرایط تنش به تخریب رنگدانه‌های کلروفیل، بی‌ثباتی در میزان پروتئین رنگدانه و همچنین تداخل یون‌های نمکی با ستنز پروتئین که مربوط به جزء ساختاری کلروفیل است نه تخریب آن، نسبت داده شده است (Jaleel *et al*., 2008). با توجه به نتایج پژوهش، استفاده از پیش‌تیمار اسید استیک در تنش شوری با افزایش محتوای کلروفیل در شرایط تنش از طریق بهبود فتوسنتز، مقاومت به تنش را موجب گردیده است.

بررسی‌ها نشان داده است که عوامل محیطی میزان کاروتنوئید را از نظر کمی و کیفی تحت تأثیر قرار می‌دهند. در تنش شوری عدم تعادل بین جذب نوری فتوسنتز و تثبیت کربن در چرخه کالوین منجر به تحریک و برانگیختگی بیش از حد الکترون‌ها و صدمه به دستگاه فتوسنتزی می‌شود. اتلاف انرژی مازاد الکترون‌ها با واسطه کاروتنوئید، از مکانیسم‌های مؤثر برای دفع انرژی مازاد و حفاظت از برگ در برابر اثرات مخرب انرژی برانگیختگی الکترون‌ها است (Muller *et al*., 2001). براساس نتایج این بررسی میزان کاروتنوئید در پیش‌تیمار اسید استیک تحت تنش شوری افزایش معنی‌داری نسبت به تنش شوری نشان داد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج کاربرد اسید سالیسیلیک در کدو تنبل که افزایش میزان کاروتنوئید را موجب شده است، سازگاری دارد (Norshazila *et al*., 2017).

میزان مالون دی‌آلدئید، پرولین، فنل و پروتئین تام: میزان مالون دی‌آلدئید، پرولین، فنل و پروتئین تام تحت تأثیر معنی‌دار اثرات اصلی تنش شوری و زمان پس از اعمال تنش شوری و اثر متقابل آن دو در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت (جدول ٤).

میزان مالون دی‌آلدئید در تنش شوری نسبت به گیاهان شاهد در ٢٤ ساعت و ١١ روز به‌ترتیب ٨٠٪ و ٩١٪ افزایش نشان داد. این درحالی است که میزان مالون دی‌آلدئید در تنش شوری با پیش‌تیمار اسید استیک در زمان ٢٤ ساعت ٢٨٪ و در زمان ١١ روز ٢٠٪ نسبت به تنش شوری کاهش نشان داده است (شکل ٣).

مالون دی‌آلدئید، محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است. تنش‌های غیرزیستی با ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن، باعث افزایش میزان مالون دی‌آلدئید می‌شوند (Labudda, 2013). نتایج این پژوهش نشان داد که پیش‌تیمار اسید استیک با کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، اثرات تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری را کاهش داده است. نتایج Jamal Omidi و همکاران (٢٠١٨) نشان داد که تنش خشکی افزایش میزان مالون دی‌آلدئید را در گیاه بادرنجبویه به‌دنبال داشت. استفاده از اسید سالیسیلیک در تنش خشکی به‌طور معنی‌داری میزان مالون دی‌آلدئید را کاهش داد. هم‌چنین نقش حمایتی اسید سالیسیلیک در تنش غیرزیستی، از طریق کاهش میزان مالون دی‌آلدئید در گیاه بادرنجبویه نشان داده شده است (Soltani Maivan *et al*., 2017).

براساس نتایج پژوهش حاضر، میزان پرولین با اعمال تنش شوری در گیاهان تحت تنش نسبت به شاهد افزایش یافت. افزایش میزان پرولین در تنش شوری با پیش‌تیمار اسید استیک نسبت به شاهد در تنش ٢٤ ساعت حدود سه برابر بود.

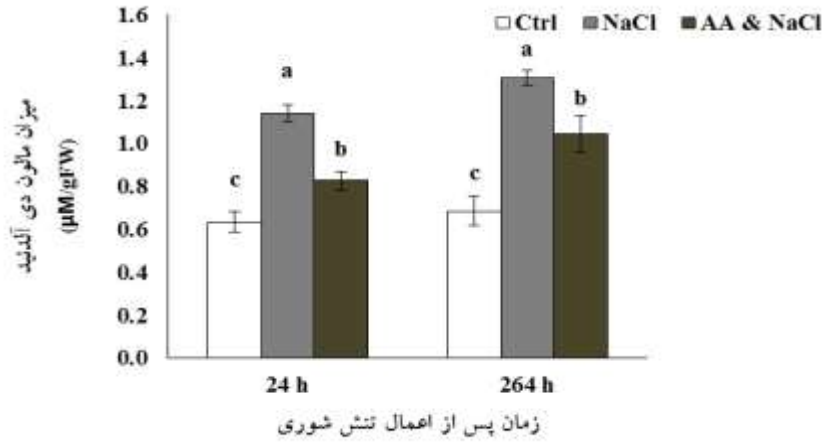
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

جدول ٤- تجزیه واریانس اثرات تنش شوری و زمان پس از اعمال تنش شوری بر میزان مالون دی‌آلدئید، پرولین تام، فنل تام و پروتئین تام

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		مالون دی‌آلدئید	پرولین	فنل تام	پروتئین تام
تنش شوری	۲	۰/٤٧٦**	٢٦٦/٧٧٧**	١٦٣٠٥٤/٧٩٣**	٤٤٦٧٣٦/٣٠٣**
اشتباه ۱	٦	۰/۰۰٤	۰/٧٠٨٢	١٩٠١/٢٦٤	٦٣٠١٥/٤٦٥
زمان	۱	۰/۰٩٧**	٥١/٥٤٥**	٢٣٤٣٩/٠١٢**	٧٧٠٢٥٥/٦٢٢**
تنش شوری × زمان	۲	۰/۰٢٢*	١٣٧/١٦٤**	٥٤٦١٩/٣٨٦**	١٦٨٧٠٤/٢٧٣**
اشتباه ۲	٦	۰/۰۰٢	١/٣٠١	١١٥٣/٢١١	١٤٨٥١/٣١٤
R Square		۰/٩٩	۰/٩٨	۰/٩٨	۰/٩٠

* و **به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ و ۱ درصد و ns عدم تفاوت معنی‌دار

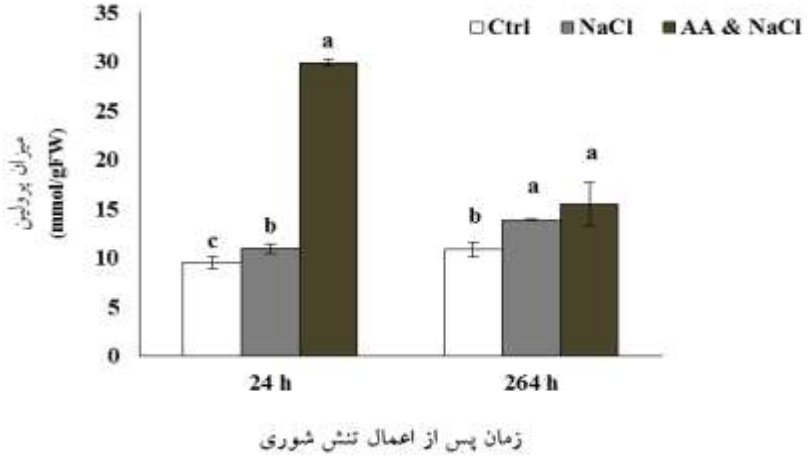


شکل ۳- تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک بر میزان مالون دی‌آلدئید در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

درحالی‌که این افزایش در تنش ۱۱ روز نسبت به شاهد ۱/۵ برابر بود که از لحاظ آماری با تنش شوری به تنهایی تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ٤).

انباشته‌شدن پرولین در پاسخ به تنش‌های محیطی گوناگون و در برخی فرآیندهای نموی به خوبی نشان داده شده است. نقش پرولین خارجی در محافظت از گیاه در مقابل تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، خشکی، فلزات سنگین و گرما به اثبات رسیده است (Takahashi *et al.*, 2004). هم‌چنین نتایج زیادی ارتباط بین انباشته‌شدن پرولین و تحمل تنش را در گیاهان نشان داده است. در بسیاری از موارد میزان پرولین در گیاهان مقاوم به تنش بالاتر از گونه‌های حساس به تنش بوده است. برای مثال، در ریشه‌های گیاه یونجه مقاوم، پرولین با سرعت خیلی زیادی در تنش شوری نسبت به گیاهان حساس به تنش شوری تجمع یافت (Petrusa and Winicov, 1997). در گندم نیز تجمع پرولین در گونه‌های متحمل به تنش در مقایسه با گونه‌های حساس بیشتر بوده است (Nayyar and Walia, 2003). نتایج Ahmadi و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد پیش‌تیمار گیاهچه‌های بادرنجبویه با نور LED، رشد و کیفیت گیاهچه‌های بادرنجبویه را با افزایش میزان پرولین نسبت به گیاهان بدون پیش‌تیمار تحت تنش خشکی بهبود داده است. در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]



شکل ٤- تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک بر میزان پرولین در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

نتایج این بررسی نیز تجمع بالای پرولین در پیش‌تیمار اسید استیک مشاهده شد که تأییدی بر نقش حمایتی اسید استیک در تنش شوری است. نتایج به‌دست آمده با نتایج سایر پژوهش‌گران سازگاری دارد (Man *et al*., 2011; Fu *et al*., 2017). به‌نظر می‌رسد گیاهانی که با پیش‌تیمار اسید استیک در شرایط تنش شوری قرار گرفته‌اند با افزایش سنتز پرولین به نوعی میزان اسمولیت‌ها را در خود افزایش داده تا با تنظیم اسمزی بهتر بتواند شرایط تنش را تحمل کنند.

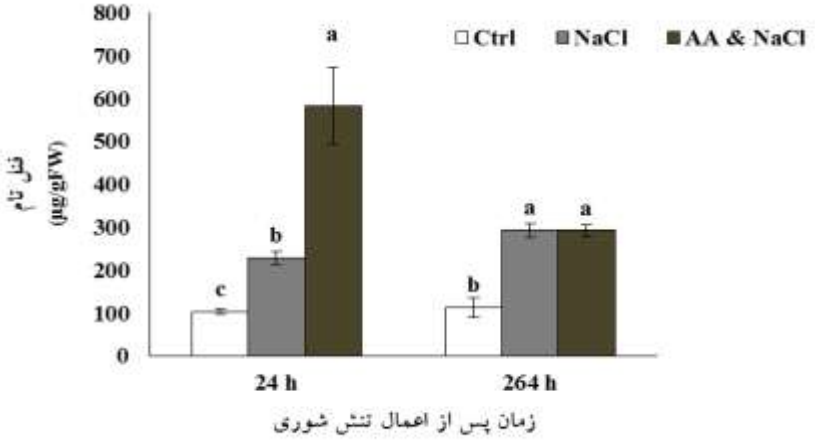
براساس شکل ۵ میزان فنل تام با اعمال تنش شوری در گیاهان بادرنجبویه افزایش یافت. بیشترین افزایش میزان فنل در تنش شوری با پیش‌تیمار اسید استیک در زمان ٢٤ ساعت مشاهده شد. با افزایش مدت زمان تنش (۱۱ روز) میزان فنل تام نسبت به شاهد افزایش نشان داد ولی پیش‌تیمار اسید استیک میزان فنل تام را تحت تأثیر قرار نداد (شکل ۵).

ترکیبات فنلی گروه بزرگی از ملکول‌های آلی هستند که به عنوان آنتی‌اکسیدان در پاسخ به تنش‌های محیطی، قادر به حذف رادیکال‌های آزاد هستند. از این‌رو ترکیبات فنلی به‌عنوان یک علامت برای تنش در نظر گرفته شده‌اند (Das and Roychoudhury, 2014). براساس نتایج این پژوهش، میزان ترکیبات فنلی در پیش‌تیمار اسید استیک نسبت به گیاهان شاهد و تحت تنش شوری افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۵). بررسی‌ها نشان داده است که سنتز ترکیبات فنلی به‌رغم کاهش رشد گیاه در شرایط تنش شوری، به‌صورت یک مکانیسمی دفاعی در برابر تنش عمل کرده و به مانند سدی دفاعی، گیاه را در مقابل تنش‌های محیطی حمایت می‌کنند (Das and Roychoudhury, 2014).

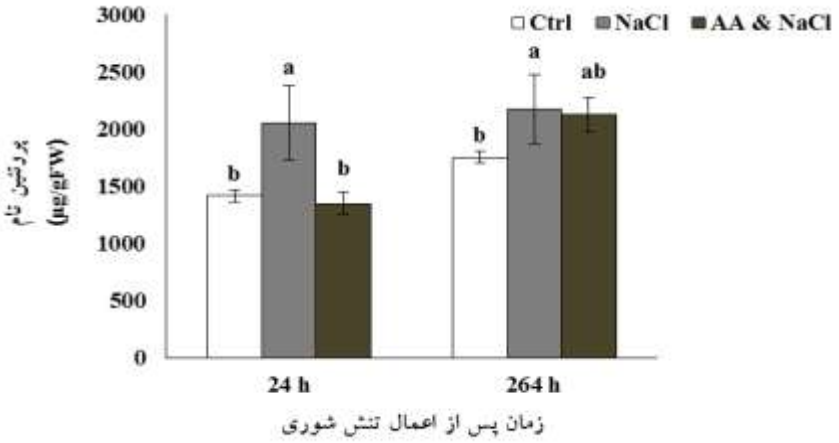
براساس نتایج نشان داده شده در شکل ٦ میزان پروتئین تام با اعمال تنش شوری نسبت به شاهد افزایش یافت. درحالی‌که میزان پروتئین تام، در تنش شوری با پیش‌تیمار اسید استیک نسبت به شاهد اختلافی نشان نداد.

نتایج پژوهش‌های صورت‌گرفته، تخریب اکسیداتیو پروتئین‌ها و کاهش میزان آن‌ها در حضور تنش‌های مختلف را نشان داده است. به عبارتی با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در زمان تنش و با تغییر بار الکتریکی خالص پروتئین‌ها، حساسیت آن‌ها را در مقابل شناسایی توسط سیستم‌های پروتئولیزکننده داخل سلولی مانند پروتئازها و پپتیدازها افزایش می‌دهد (Jaleel *et al*., 2008). از طرف دیگر، افزایش میزان پروتئین کل را در تنش‌های مختلف به‌دلیل افزایش سنتز پروتئین‌هایی مانند دهیدرین‌ها، پروتئین‌های شوک حرارتی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده است.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]



شکل ۵- تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک بر میزان فنل تام در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ٦- تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک بر میزان پروتئین کل در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

(Landi *et al*., 2019). افزایش میزان پروتئین‌ها در تنش شوری در این پژوهش، در راستای یافته‌های سایر محققین است که افزایش میزان پروتئین در تنش غیرزیستی را گزارش کرده‌اند (Gengmao *et al*., 2014; Ebrahimian and Bybordi, 2011).

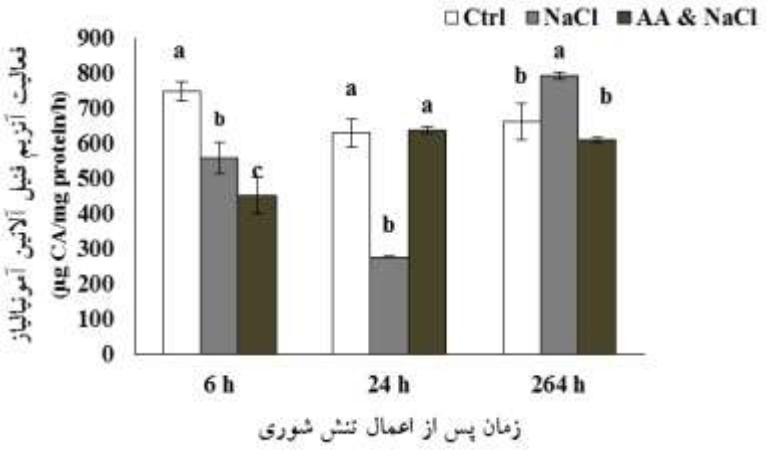
میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز: فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز در زمان‌های ٦، ٢٤ ساعت و ۱۱ روز پس از اعمال تنش شوری اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، میزان بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز تحت تأثیر اثرات اصلی تنش شوری و زمان پس از اعمال تنش شوری و اثرات متقابل دو عامل در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت (جدول ۵).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

جدول ۵- تجزیه واریانس اثرات تنش شوری و زمان پس از اعمال تنش شوری بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و میزان بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز	بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز	بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز
تنش شوری	۲	۴۸۳۰۳/۷۹۲**	۱/۰۱۵**	۰/۸۸۷**
اشتباه۱	۶	۸۹۰/۷۴۹	۰/۰۶۸	۰/۱۲۱
زمان	۲	۶۸۲۴۵/۶۶۹**	۳/۳۴۷**	۲/۲۶۰**
تنش شوری×زمان	۴	۸۶۴۴۳/۲۵۰**	۲/۳۹۹**	۰/۷۹۲**
اشتباه ۲	۱۲	۱۱۹۰/۷۶۰	۰/۰۷۰	۰/۰۷۰
R Square		۰/۹۸	۰/۹۶	۰/۹۲

*** و ** به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ و ۱ درصد و ns عدم تفاوت معنی‌دار**



شکل ۷- تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری در گیاهان تحت تنش شوری نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۷). در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش شوری، تنش شوری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش داد درحالی‌که افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاهان با پیش‌تیمار اسید استیک و تنش شوری نسبت به تنش شوری به‌گونه‌ای بود که نسبت به گیاهان شاهد تفاوت معنی‌دار را نشان نداد. با ادامه تنش به‌مدت ۱۱ روز افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز با تنش شوری نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. اما فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاهان با پیش‌تیمار اسید استیک در تنش شوری نسبت به گیاهان شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۷).

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، آنزیمی کلیدی در شروع مسیر فنیل پروپانوئیدی، جهت سنتز ترکیبات فنلی که نقش مهمی در دفاع گیاهان در مقابل تنش‌ها به عهده دارند ضروری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

است. این آنزیم در اغلب موارد، به‌صورت یک محافظ علیه تنش‌های گیاهی عمل می‌کند (Sahu *et al*., 2013). براساس نتایج این تحقیق در ساعات اولیه تنش، کاهش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز مشاهده شد. با گذشت ۲۴ ساعت از شروع تنش گیاهان تحت پیش‌تیمار اسید استیک فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به گیاهان تحت تنش شوری نشان دادند که نشان‌دهنده مقابله بهتر این گیاهان با تنش شوری از طریق سنتز ترکیبات فنلی است. درحالی‌که با افزایش زمان تنش به مدت ۱۱ روز، کاهش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در پیش‌تیمار اسید استیک نسبت به گیاهان تحت تنش شوری، نشان‌دهنده نقش تعدیل‌کننده پیش‌تیمار اسید استیک در شدت تنش می‌باشد که کاهش فعالیت را به‌دنبال داشته است.

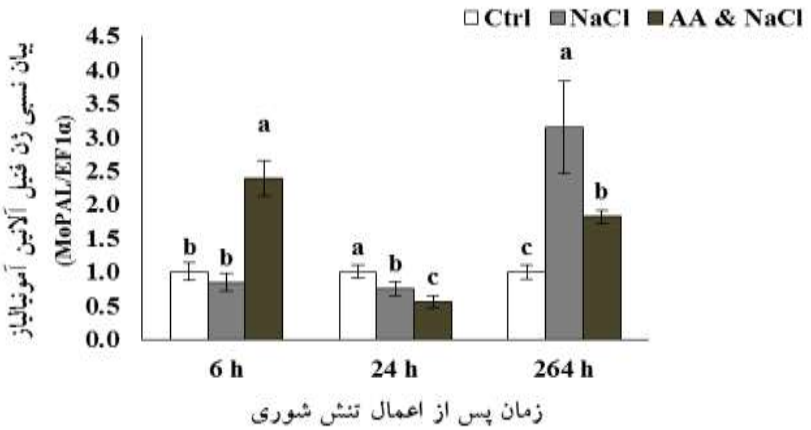
بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در شروع تنش شوری نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد؛ درحالی‌که پیش‌تیمار اسید استیک در تنش شوری، افزایش بیان نسبی این ژن را به میزان ۲/۳۸ برابر نسبت به شاهد موجب گردید (شکل ۸). با گذشت زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش شوری نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۵$) بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز مشاهده شد به‌گونه‌ای که این کاهش بیان در پیش‌تیمار اسید استیک بیشتر بود. در زمان ۱۱ روز پس از تنش شوری، بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در تنش شوری و پیش‌تیمار اسید استیک و تنش شوری نسبت به شاهد به‌ترتیب ۳/۱۳ و ۱/۸۲ برابر افزایش یافت (شکل ۸).

فنیل‌آلانین آمونیالیاز آنزیمی تترامر است که با خانواده چند ژنی کوچکی در گیاهان بیان می‌شود (Olsen *et al*., 2008). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که فعالیت و بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در برابر تنش‌های مختلف، از قبیل زخم، خشکی، شوری، فلزات سنگین و حملات ویروسی، باکتریایی یا قارچی تغییر می‌کند؛ بنابراین این آنزیم در پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی دخالت دارد (Gao *et al*., 2008). بررسی‌ها نشان داده است ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بعد در مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدی اغلب در هماهنگی با بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز تنظیم می‌شوند که به تجمع محصولات فنیل پروپانوئیدی منتهی می‌گردد. سنتز بدون الگو (De novo) ایزوفرم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز توسط تنش‌های گوناگون القا و بیان متفاوت ایزوفرم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز، سنتز و تجمع ترکیبات فنلی را در بافت‌های مختلف موجب می‌شود (Bate *et al*., 1994). هم‌چنین فنیل‌آلانین آمونیالیاز به‌عنوان یک پل بین متابولیسم اولیه و بیوسنتز ترکیبات ثانویه، یک محل بالقوه برای تنظیم مسیر فنیل پروپانوئیدی است. بنابراین، بررسی الگوی بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی به‌منظور درک بهتر مکانیسم‌های دفاعی در مقابل تنش‌های مختلف در گیاهان دارویی به‌طور قابل توجهی مفید خواهد بود. نتایج کاربرد اوزون بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاه بادرنجبویه، افزایش دو برابری بیان این ژن را در زمان ۲۴ ساعت نسبت به شاهد نشان داد (Doring *et al*., 2014). هم‌چنین افزایش بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در تحمل بیشتر به شرایط تنش در گیاهان زیادی گزارش شده است (Nag and Kumaria, 2018; Soleimani *et al*., 2017; Mohammadkhani *et al*., 2016; Valifard *et al*., 2015). براساس نتایج این پژوهش بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز به‌عنوان یک شاخص شرایط تنش بلند مدت در گیاهان تأیید می‌شود. به عبارتی بررسی بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز می‌تواند یک گزینه مناسب برای فناوری مهندسی ژنتیک محصولات کشاورزی در جهت تحمل به تنش باشد. نتایج بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز نیز نشان داد با افزایش زمان تنش، کاهش بیان این ژن در پیش‌تیمار اسید استیک مشاهده شده است که با فعالیت آن مطابقت داشت. این نتایج نیز نقش حمایتی اسید استیک را در مقابله با تنش شوری تأیید می‌کنند.

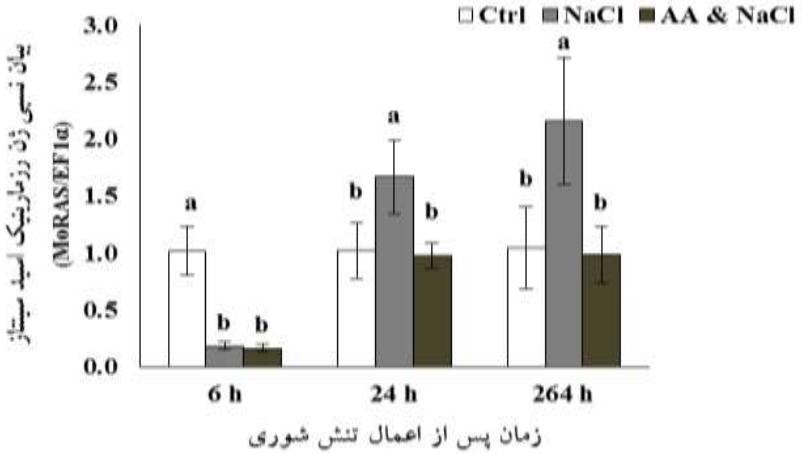
بیان نسبی ژن اسید رزمارینیک سینتاز در زمان ٦ ساعت پس از اعمال تنش شوری، نسبت به گیاهان شاهد از لحاظ آماری کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۹). با افزایش مدت زمان تنش شوری، بیان نسبی ژن اسید رزمارینیک سینتاز در تنش شوری نسبت به شاهد به میزان ۱/٦ و ۲ برابر به‌ترتیب در زمان‌های ۲۴ ساعت و ۱۱ روز پس از تنش افزایش یافت. درحالی‌که با پیش‌تیمار اسید استیک در تنش شوری بیان نسبی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]



شکل ۸- تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک بر بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

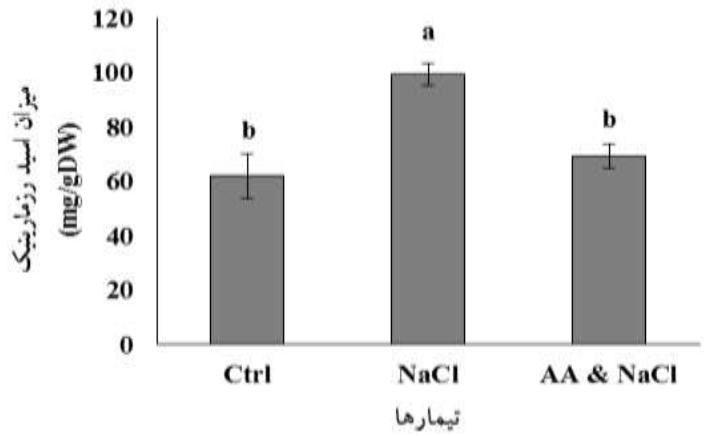


شکل ۹- تأثیر پیش‌تیمار اسید استیک بر میزان بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

ژن اسید رزمارینیک سینتاز نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

نتایج بررسی DNA ژنومی و ساترن‌بلات در بادرنجبویه نشان داده است که ژن اسید رزمارینیک سینتاز در بادرنجبویه فاقد اینترون است و تنها یک نسخه از این ژن در بادرنجبویه حضور دارد (Weitzel and Petersen, 2011). بنابراین بادرنجبویه یک گیاه مدل دارویی مناسب جهت پژوهش‌های در زمینه تنظیم بیوسنتز اسید رزمارینیک است. براساس نتایج پژوهش‌ها در تنش خشکی در گیاه آویشن، افزایش بیان ژن RAS مشاهده شد (Trocsanyi *et al*., 2015). بیان ژن RAS با استفاده از اسید آبسیزیک به‌عنوان یک هورمون تنش در کشت شاخه بادرنجبویه افزایش یافت (Mousavi and Shabani, 2019). تابش اوزون در گیاه بادرنجبویه، بیان ژن اسید رزمارینیک سینتاز را پس از ۲۴ ساعت از شروع تابش نسبت به شاهد ۱/۵ برابر افزایش داد (Doring *et al*., 2014). افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز در تنش خشکی و شوری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]



شکل ۱۰- میزان اسید رزمارینیک در گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

نسبت به گیاهان شاهد در گیاه بادرنجبویه نیز گزارش شده است (Vafadar *et al*., 2020; Ahmadi *et al*., 2019).

با توجه به مسیر بیوسنتزی اسید رزمارینیک در گیاه بادرنجبویه (شکل ۱)، آنزیم رزمارینیک اسید سینتاز آخرین مرحله را در این مسیر متابولیسمی کاتالیز می‌کند. لذا در بررسی بیان نسبی ژن این آنزیم، نتایج این پژوهش نشان داد که بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز با افزایش زمان تنش شوری، افزایش نشان داده است. به عبارت دیگر سنتز متابولیت ثانویه اسید رزمارینیک پس از سنتز پیش‌ماده‌های لازم برای این ترکیب توسط آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز صورت می‌گیرد.

میزان اسید رزمارینیک: چنان‌چه در شکل ۱۰ نشان داده شده است میزان اسید رزمارینیک در تنش شوری به میزان ٦۰٪ نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است. اگرچه پیش‌تیمار اسید استیک در تنش شوری میزان اسید رزمارینیک را نسبت به شاهد ۱۱٪ افزایش داد ولی این افزایش مقدار از لحاظ آماری (P ≤ ۰/۰۵) معنی‌دار نبود (شکل ۱۰).

اثر تنش شوری بر افزایش متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها، پلی‌فنل‌ها، تروپان آلکالوئیدها، آنتوسیانین‌ها و پلی‌آمین‌ها در گیاهان مختلف نشان داده شده است (Akula and Ravishankar, 2011). این ترکیبات با حذف رادیکال‌های آزاد، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی در گیاهان تولیدکننده این ترکیبات نقش دارند (Edreva *et al*., 2008). چنان‌چه در نتایج این پژوهش مشاهده می‌شود پیش‌تیمار اسید استیک در تنش شوری با تعدیل تنش کاهش میزان اسید رزمارینیک را نسبت به تنش شوری موجب شده است.

بررسی‌های اولیه ارتباط تغییرات میزان اسید رزمارینیک را با فعالیت و بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی آن در گیاه بادرنجبویه مرتبط نشان داده‌اند که در این میان فعالیت و بیان اختصاصی دو ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز با میزان اسید رزمارینیک نسبت به سایر آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی بارزتر است (Weitzel and Petersen, 2011). در این راستا افزایش میزان اسید رزمارینیک درنتیجه افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز در گیاه بادرنجبویه تحت تنش شوری مشاهده شده است (Vafadar *et al*., 2020). براساس نتایج این پژوهش افزایش فعالیت و بیان ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز به افزایش میزان ترکیبات فنلی از جمله اسید رزمارینیک در شرایط تنش شوری در بلند مدت منجر گردیده است.

از آزمون همبستگی پیرسون جهت آزمون رابطه میزان اسید رزمارینیک با فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز و بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز استفاده شد. تحلیل همبستگی، نشان‌دهنده ارتباط مثبت و معنی‌داری بین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

جدول ٦- ضرایب همبستگی بین میزان اسیدرزمارینیک با فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز و بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز

	فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز	بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز	بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز
میزان اسید رزمارینیک	۰/۷٦٥*	۰/۹۰۱**	۰/۸۲۳**

* و **به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ و ۱ درصد

میزان اسید رزمارینیک و فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز و هم‌چنین بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز بود (جدول ٦). بیشترین میزان همبستگی را میزان اسید رزمارینیک و بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز با هم دارند. گزارش‌هایی مبنی بر وجود همبستگی بین فعالیت و بیان آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز اسید رزمارینیک در گیاهان تحت تنش وجود دارد (Doring *et al*., 2014). در تأیید نتایج این پژوهش همبستگی مثبت بیان ژن RAS با تجمع اسید رزمارینیک در گیاهان در معرض تنش خشکی و شوری گزارش شده است (Vafadar *et al*., 2020; Trocsanyi *et al*., 2015).

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت تأثیر تنش شوری بر کشاورزی و کیفیت محصولات کشاورزی در جهان، پژوهشگران همواره به‌دنبال راه‌هایی مقرون به‌صرفه، آسان و مطمئن برای مقابله با این تنش در سراسر دنیا بوده‌اند. به‌رغم این‌که کشور ما در سطح وسیعی با اثرات تنش شوری مواجه است، پژوهش‌های کافی در این زمینه انجام نشده است. بر طبق نتایج به‌دست آمده از این پژوهش پیش‌تیمار اسید استیک با تنظیم اسمزی و حفاظت از ساختارهای گیاه، بازسازی و حفظ نفوذپذیری غشا در گیاهان در شرایط تنش، آسیب‌های وارده به غشای سلولی را کاهش و با بهبود فتوسنتز نقش حمایتی در شرایط تنش شوری را فراهم کرده است. بنابراین استفاده از پیش‌تیمار اسید استیک می‌تواند به‌عنوان راهکاری ارزان و آسان جهت سازش گیاهان با شرایط تنش شوری مورد توجه پژوهشگران قرار گیرد تا با افزایش زمینه‌های پژوهشی در این خصوص، گامی در جهت کاهش اثرات سوء این تنش برداشته شود.

منابع

Ahmadi, T., Shabani, L. and Sabzalian, M. R. (2019) Improvement in drought tolerance of lemon balm, *Melissa officinalis* L. under the pre-treatment of LED lighting. Plant Physiology and Biochemistry 139: 548-557.

Akula, R. and Ravishankar, G. A. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior 6: 1720-1731.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Ashraf, M. and Ali, Q. (2008) Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). Environmental and Experimental Botany 63: 266-273.

Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W., Dixon, R. A., Lamb, C. J. and Elkind, Y. (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 91: 7608-7612.

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhriss, M. and Ben Abdullah, F. (2010) Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 4216-4222.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

Chaparzadeh, N. and Hosseinzad-Behboud, E. (2015) Evidence for enhancement of salinity induced oxidative damages by salicylic acid in radish (*Raphanus sativus* L.). Journal of Plant Physiology and Breeding 5: 23-33.

Das, K. and Roychoudhury, A. (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS scavengers during environmental stress in plants. Frontiers in Environmental Science 2: 53-66.

De Vos, C., Schat, H., De Waal, M., Vooijs, R. and Ernst, W. (1991) Increased resistance to copper induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. Physiologia Plantarum 82: 523-528.

Doring, A. S., Pellegrini, E., Della Batola, M., Nali, C., Lorenzini, G. and Petersen, M. (2014) How do background ozone concentrations affect the biosynthesis of rosmarinic acid in *Melissa officinalis*? Journal of Plant Physiology 171: 35-41.

Ebrahimian, E. and Bybordi, A. (2011) Influence of different proportion of nitrate, ammonium and silicium on activity of antioxidant enzymes and some physiological traits in sunflower under conditions of salt stress. Journal of Food, Agriculture and Environment 9: 1052-1058.

Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gurel, A., Aktas, L. and Gesheva, E. (2008) Stress protective role of secondary metabolites: Diversity of functions and mechanisms. General and Applied Plant Physiology 34: 67-78.

El-Tohamy, W., El-Abagy, H., Badr, M. and Gruda, N. (2013) Drought tolerance and water status of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by citric acid application. Journal of Applied Botany and Food Quality 86: 212-216.

Fu, Y., Ma, H., Chen, S., Gu, T. and Gong, J. (2017) Control of proline accumulation under drought via a novel pathway comprising the histone methylase CAU1 and the transcription factor ANAC055. Journal of Experimental Botany 69: 579-588.

Galeano, E., Vasconcelos, T. S., de Oliveira, P. N. and Carrer, H. (2019) Physiological and molecular responses to drought stress in teak (*Tectona grandis* L.) Plos One 14: 1-26.

Gao, S., Ouyang, C., Wang, S., Xu, Y., Tang, L. and Chen, F. (2008) Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. Plant, Soil and Environment 54: 374-381.

Gengmao, Z., Quanmei, S., Yu, H., Shihui, L. and Changhai, W. (2014) The physiological and biochemical responses of a medicinal plant (*Salvia miltiorrhiza* L.) to stress caused by various concentrations of NaCl. Plos One 9: 1-6.

Gupta, B. and Huang, B. (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. International Journal of Genomics 2014: 1-18.

Heidari, M. (2012) Effects of salinity stress on growth, chlorophyll content and osmotic components of two basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes. African Journal of Biotechnology 11: 379-384.

Hu, L., Zhang, Z., Xiang, Z. and Yang, Z. (2016) Exogenous application of citric acid ameliorates the adverse effect of heat stress in tall fescue (*Lolium arundinaceum*). Frontiers in Plant Science 7: 179.

Isayenkov, S. (2012) Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. Cytology and Genetics 46: 302-318.

Jaleel, C. A., Gopi, R., Kishorekumar, A., Manivannan, P., Sankar, B. and Panneerselvam, R. (2008) Interactive effects of triadimefon and salt stress on antioxidative status and ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus*. Acta Physiologiae Plantarum 30: 287.

Jamal Omidi, F., Mohajjel Shoja, H. and Sariri, R. (2018) Effect of water-deficit stress on secondary metabolites of *Melissa officinalis* L.: Role of exogenous salicylic acid .Caspian Journal of Environmental Sciences 16: 121-134.

Jamil, M., Lee, D. B., Jung, K. Y., Ashraf, M., Lee, S. C. and Rha, E. S. (2006) Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. Journal of Central European Agriculture 7: 273-282.

Janda, T., Szalai, G., Tari, I. and Paldi, E. (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. Planta 208: 175-180.

Kim, J. M., To, T. K., Matsui, A., Tanoi, K., Kobayashi, N. I., Matsuda, F., Habu, Y., Ogawa, D., Labudda, M. (2013) Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An Effective Tool for Plant Breeding CeON Repository 1-13.

Landi, S., Capasso, G., Azaiez, B., Ezzahra, F., Jallouli, S., Ayadi, S., Trifa, Y. and Esposito, S. (2019) Different roles of heat shock proteins (70 kDa) during abiotic stresses in barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. Plants 8: 248-267.

Lutts, S., Kinet, J. and Bouharmont, J. (1996) NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Annals of Botany 78: 389-398.

Ma, X., Zheng, J., Zhang, X., Hu, Q. and Qian, R. (2017) Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress on *Dianthus superbus* (Caryophyllaceae) by activating photosynthesis, protecting morphological structure, and enhancing the antioxidant system. Frontiers in Plant Science 8: 600-613.

Man, D., Bao, Y. X., Han, L. B. and Zhang, X. (2011) Drought tolerance associated with proline and hormone metabolism in two tall fescue cultivars. HortScience 46: 1027-1032.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

Marcinska, I., Czyczylo-Mysza, I., Skrzypek, E., Filek, M., Grzesiak, S., Grzesiak, M. T., Janowiak, F., Hura, T., Dziurka, M. and Dziurka, K. (2013) Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes. Acta Physiologiae Plantarum 35: 451-461.

Mohammadkhani, N., Heidari, R., Abbaspour, N. and Rahmani, F. (2016) Salinity effects on expression of some important genes in sensitiveand tolerant grape genotypes. Turkish Journal of Biology 40: 95-108.

Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A. and Meftahizade, H. (2010) *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. Journal of Medicinal Plants Research 4: 2753-2759.

Mousavi, S. and Shabani, L. (2019) Rosmarinic acid accumulation in *Melissa officinalis* shoot cultures is mediated by ABA. Biologia Plantarum 63: 418-424.

Muller, P., Li, X. P. and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiology 125: 1558-1566.

Nag, S. and Kumaria, S. (2018) In silico characterization and transcriptional modulation of phenylalanine ammonia lyase (PAL) by abiotic stresses in the medicinal orchid *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. Phytochemistry 156: 176-183.

Nayyar, H. and Walia, D. (2003) Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. Biologia Plantarum 46: 275-279.

Norshazila, S., Koy, C., Rashidi, O., Ho, L., Azrina, I., Nurul Zaizuliana, R. and Zarinah, Z. (2017) The effect of time, temperature and solid to solvent ratio on pumpkin carotenoids extracted using food grade solvents. Sains Malaysiana 46: 231-237.

Olsen, K. M., Lea, U. S., Slimestad, R., Verheul, M. and Lillo, C. (2008) Differential expression of four Arabidopsis PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. Journal of Plant Physiology 165: 1491-1499.

Ozturk, M., Duru, M. E., Ince, B., Harmandar, M. and Topcu, G. (2010) A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. Food Chemistry 123: 1352-1356.

Petrusa, L. M. and Winicov, I. (1997) Proline status in salt-tolerant and salt-sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. Plant Physiology and Biochemistry 35: 303-310.

Ritchie, S. W., Nguyen, H. T. and Holaday, A. S. (1990) Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Science 30: 105-111.

Sahu, R., Gangopadhyay, M. and Dewanjee, S. (2013) Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. Acta Physiologiae Plantarum 35: 1473-1481.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

Soleimani, Z., Afshar, A. and Nematpour, F. (2017) Responses of antioxidant gene and enzymes to salinity stress in the *Cuminum cyminum* L. Russian Journal of Plant Physiology 64: 361-367.

Soltani Maivan, E., Radjabian, T., Abrishamchi, P. and Talei, D. (2017) Physiological and biochemical responses of *Melissa officinalis* L. to nickel stress and the protective role of salicylic acid. Archives of Agronomy and Soil Science 63: 330-343.

Sun, Y. L. and Hong, S. K. (2011) Effects of citric acid as an important component of the responses to saline and alkaline stress in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). Plant Growth Regulation 64: 129-139.

Taibi, K., Taibi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M. and Mulet, J. M. (2016) Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. South African Journal of Botany 105: 306-312.

Takahashi, S., Seki, M., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Narusaka, M., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A. and Akiyama, K. (2004) Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a full-length cDNA microarray. Plant Molecular Biology 56: 29-55.

Trocsanyi, E., Gyorgy, Z., Inotai, K., Szabo, K., Pluhar, Z., Radacsi, P., Malekzadeh, M. and Nemeth-Zamborine, E. (2015) Enhanced rosmarinic acid accumulation and rosmarinic acid synthase gene expression under drought stress in thyme (*Thymus vulgaris*). Planta Medica 81: 246.

Vafadar, F., Amooaghaie, R., Ehsanzadeh, P., Ghanadian, M., Talebi, M. and Ghanati, F. (2020) Melatonin and calcium modulate the production of rosmarinic acid, luteolin, and apigenin in *Dracocephalum kotschyi* under salinity stress. Phytochemistry 177: 112422.

Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Niazi, A. and Moghadam, A. (2015) Phenylalanine ammonia lyase isolation and functional analysis of phenylpropanoid pathway under salinity stress in Salvia species. Australian Journal of Crop Science 9: 656-665.

Weitzel, C. and Petersen, M. (2011) Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. Phytochemistry 72: 572-578.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F. and Wang, Q. (2018) Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules 23: 762-788.

Yang, X., Chen, X., Ge, Q., Li, B., Tong, Y., Zhang, A., Li, Z., Kuang, T. and Lu, C. (2006) Tolerance of photosynthesis to photoinhibition, high temperature and drought stress in flag leaves of wheat: A comparison between a hybridization line and its parents grown under field conditions. Plant Science 171: 389-397.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]

The effect of acetic acid pretreatment on some physiological and molecular parameters of lemon balm (*Melissa Officinalis* L.) under salinity stress

Maryam Dehjipour Heidarabadi [1*], Mohammad Reza Dehghani [1], Fatemeh Moradi Andohjerdi [1], Khalil Malekzadeh [1], Fatemeh Soroush [2]

[1] Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Valiasr University, Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
[2] Department of Water Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Valiasr University, Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
(Received: 21/08/2020, Accepted: 26/01/2021)

Abstract

Salinity resistance is one of the main concerns in arid and semi-arid regions. In this study, the effect of acetic acid pretreatment in salinity stress was investigated on parameters such as relative water content, electrolyte leakage, proline, malondialdehyde, phenolic compounds, as well as protein and photosynthetic pigments content, phenylalanine ammonialyase enzyme activity and expression of important enzymes in rosmarinic acid biosynthesis (phenylalanine ammonialyase and rosmarinic acid synthase) in hydroponic culture of *Melissa officinalis* L. The seedlings which were grown in Hoagland's solution were pre-treated with acetic acid (10 µM) and then the salinity stress was carried out with NaCl (35 mM) for 11 days. The results indicated that electrolyte leakage percent and malondialdehyde content were decreased, whereas, proline and phenol content were increased in acetic acid pretreated plants in salinity stress. Also, photosynthetic pigments content showed less reduction in acid acetic pretreated plants compared to the control plants. Phenylalanine ammonia lyase activity and gene expression increased in salinity stress. Increasing in rosmarinic acid synthase gene expression resulted in increasing rosmarinic acid content. Also, the amount of rosmarinic acid had a positive and significant relationship with the activity and the expression of key genes in its biosynthesis. The results suggested that the use of acetic acid pretreatment, by initiating support mechanisms such as decreasing in peroxidation of membrane lipids, increasing in proline, phenolic compound, activity and expression of genes involved in phenolic compound and photosynthetic pigments played an important role in salinity stress modulation.

Keywords: Acetic acid, Lemon balm, Phenylalanine ammonialyase, Rosmarinic acid, Salinity

Corresponding author, Email: m.dahaji@vru.ac.i

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.13.5]