افزایش مقاومت گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) به شوری خاک، تحت اثر تنظیم-کننده‌های رشد سالیسیلیک‌اسید و پنکونازول

فاطمه شکی[1]، حسن ابراهیم زاده معبود[1*]، وحید نیکنام[1]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۰
تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۹/۱۶

چکیده

شوری یکی از مهمترین فاکتورهای محیطی است که رشد و تولید گیاهان را محدود می‌کند و بخش قابل توجهی از زمین‌های کشاورزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، شناسائی روش‌هایی که موجب تخفیف اثر تنش شوری در گیاه شوند و تا حد ممکن از افت عملکرد گیاه جلوگیری نمایند، می‌تواند از روش‌های مقابله با این معضل باشد. در این تحقیق اثر سالیسیلیک-اسید و پنکونازول به تنهایی و به صورت همزمان بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گلرنگ تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای کلریدسدیم (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار)، سالیسیلیک‌اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) به مدت ۲۱ روز بر گیاهان اعمال شد. سپس برگ‌های گیاهان جمع‌آوری و در یخچال در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نتایج حاصل نشان داد که محتوای پروتئین تحت تنش شوری شدیدتر به یک دومِ گیاهان شاهد کاهش یافت. با این حال، محتوای پرولین حدود سه برابر و محتوای گلایسین‌بتائین، H_2O_2، MDA، ترکیبات فنلی کل و فعالیت رادیکال DPPH نیز تقریبا دو برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. بعلاوه، تنش شوری باعث افزایش بیان ژن‌های SOS1 و NHX1 در گلرنگ شد. تیمارهای سالیسیلیک‌اسید و پنکونازول نیز باعث افزایش محتوای پروتئین، گلایسین‌بتائین، H_2O_2، ترکیبات فنلی کل، فعالیت رادیکال DPPH و همچنین افزایش بیان ژن‌های SOS1 و NHX1 شدند. همچنین تیمار سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش محتوای پرولین و تیمار پنکونازول باعث کاهش MDA در گیاهان تحت تنش شد. در مجموع، نتایج نشان داد که برهمکنش این دو تنظیم‌کننده در گیاه می‌تواند اثرات کاهندگی و یا هم‌افزایی به دنبال داشته باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد که این دو تنظیم‌کننده رشد می‌توانند باعث افزایش سازگاری و مقاومت گیاه گلرنگ تحت شرایط تنش شوری شوند که با توجه به ارزان و قابل دسترس بودن آنها، برای افزایش مقاومت گلرنگ به تنش می‌توانند مورد توجه قرار گیرند.

۱-دانشجوی دکترا ، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده علوم زیستی
۲و۳- استاد، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده علوم زیستی
*(نویسنده مسئول: ebizadeh@ut.ac.ir)

واژه‌های کلیدی: *گلرنگ، شوری، سالیسیلیک‌اسید، پنکونازول، آنتی پورتر NHX1، آنتی پورتر SOS1*

مقدمه

امروزه، گرمایش جهانی (global warming) که منجر به تغییرات اقلیمی می‌شود، می‌تواند باعث شور شدن اولیه خاک شود. در واقع، گرم شدن کره زمین باعث کاهش بارندگی در بسیاری از مناطق شده است و کاهش بارندگی نیز می‌تواند منجر به افزایش میزان شوری خاک شود. شوری بخش قابل توجهی از زمین‌های کشاورزی را تحت تأثیر قرار داده است (Ali *et al.*, 2004). کشور ما نیز از نظر اقلیمی در منطقه خشک و نیمه‌خشک دنیا قرار دارد، از این‌رو شوری خاک و آب آبیاری یکی از مشکلات عمده پیش روی زراعت کشور است.

گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) گیاهی بومی ایران و متعلق به تیره کاسنیان (Asteraceae) می‌باشد که سازگاری بالایی با شرایط خشکی، شوری و گرما دارد. وجود انواع گونه‌های وحشی که در سراسر کشور پراکنده‌اند نشان از سازگاری بالای این گیاه با آب و هوای کشور دارد. با توجه بـه سازگاری بالای گلرنگ نسبت به شرایط نامساعد می‌توان این گیاه را در مناطق نامساعدتر و اراضی درجه دوم کشت نمود و با انجام مطالعات بیشتر و اصلاح ارقام مناسب می‌توان به بهبود وضعیت آن در ایران امید داشت (زینلی ۱۳۷۸).

به طور معمول، گیاهان در مواجهه با تنش‌های محیطی، خود را با برخی روش‌های راهبردی در سلول محافظت می‌کنند (Banu *et al.*, 2009). تجمع اسمولیت‌های سازگار مانند پرولین و گلایسین بتائین به عنوان راهبردی اساسی جهت محافظت گونه‌های مختلف گیاهی در پاسخ به تنش‌های محیطی مورد بررسی قرار گرفته است. این ترکیبات در پاسخ به تنش شوری نقش مهمی دارند و در سیتوزول سلول‌های گیاهی، جایی که سبب برقراری تعادل اسمزی است تجمع می‌یابند و به گیاه کمک می‌کنند تا بتواند در شرایط تنش اسمزی زنده بماند (Ashraf & Foolad, 2007).

تنش شوری به دلیل اثرات اسمزی بر فعالیت‌های متابولیک مختلف، کمبود آب را القا می‌کند و در نتیجه منجر به تنش اکسیداتیو از طریق افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که صدمه به سلول‌ها را از طریق اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نتیجه می‌دهد. شواهدی در ارتباط با نقش علامت‌رسانی گونه‌های فعال اکسیژن به خصوص پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به عنوان یک پیام‌رسان مولکولی در گیاهان وجود دارد. محققین معتقدند که H_2O_2 به عنوان فاکتور کلیدی در فرآیندهای آسیمیلاسیون و تحمل به تنش می‌باشد (Neill *et al.*, 2002). بعلاوه، از تجزیه اسیدهای چرب دارای پیوندهای غیراشباع در غشاء سلول‌های گیاهی، مالون دی آلدهید (MDA) تولید می‌شود که غلظت آن به عنوان یکی از شاخص‌های اصلی تنش اکسیداتیو محسوب می‌گردد. تنش شوری با تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، موجب آسیب اکسیداتیو به غشاء و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و تولید مالون دی آلدهید در گیاهان می‌گردد (Tun *et al.*, 2006). گروه دیگری از ترکیبات که

به طور معمول در شرایط تنشی در گیاه فعال می‌گردند ترکیبات فنلی می‌باشند. ترکیبات فنلی به عنوان گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که جزء آنتی اکسیدان‌ها محسوب می‌شوند و در تنش‌های غیر زیستی می‌توانند در روبش رادیکال های فعال اکسیژن ایفای نقش کنند.

از طرف دیگر، در محیط‌های شور، کده‌بندی یون‌هایی که بطور بالقوه آسیب‌رسان هستند راهکار موثری جهت سمیت-زدایی یونی فراهم می‌آورد و در عین حال نسبت بالای پتاسیم به سدیم را در سیتوزول حفظ می‌کند. بعلاوه، انباشتگی یون‌ها در داخل واکوئل، فشار اسمزی در جهت بهبود جذب آب را فراهم می‌نماید. آنتی پورترهای واکوئلی سدیم/پروتون (NHX1)، پروتئین‌های شامه‌ای هستند که تبادل سدیم را در مقابل پروتون در شامه‌های تونوپلاستی کاتالیز می‌کنند. بعلاوه، خروج Na^+ از سیتوپلاسم به درون آپوپلاست از طریق آنتی‌پورتر SOS1 صورت می‌گیرد. شواهد زیادی وجود دارد که بیان بالای این ژن‌ها در گونه‌های مختلف گیاهی، تحمل به شوری را افزایش می‌دهد (Pardo & Rubio 2011).

شناسائی روش‌هایی که موجب تخفیف اثر تنش شوری در گیاه شوند و تا حد ممکن از افت عملکرد گیاه جلوگیری نمایند، می‌تواند یکی از روش‌های مقابله با این معضل باشد. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، گروهی از ترکیبات طبیعی یا مصنوعی هستند که باعث تغییر در رشد و الگوهای نموی گیاه می‌شوند و تاثیر عمیقی روی فرآیندهای گیاه دارند (Nair *et al.*, 2009).

سالیسیلیک‌اسید ($C_7H_6O_3$) تنظیم‌کننده‌ی درون‌زای رشد با ماهیت فنلی است که به وسیله‌ی سلول‌های ریشه تولید می‌شود و دارای نقش کلیدی در تنظیم رشد و نمو گیاهی و پاسخ به تنش‌های محیطی است (Hayat *et al.*, 2010). سالیسیلیک اسید به عنوان یک جزء پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته شده است. پاسخ‌های دفاعی گیاه منجر به بیوسنتز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاهی مانند ترکیبات فنلی می‌شود که گیاهان می‌توانند از طریق القاء آنزیم‌های دفاعی به طیف وسیعی از تنش‌ها پاسخ دهند (Mueller *et al.*, 1993). ثابت شده است که سالیسیلیک اسید باعث کاهش اثرگذاری تنش‌های محیطی از راه افزایش هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد مانند اکسین و سیتوکینین می‌شود (Shakirova *et al.*, 2003).

تریازول‌ها گروه دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد هستند که خاصیت قارچ‌کشی دارند و باعث حفاظت از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی می‌گردند. این ترکیبات سبب تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی از جمله افزایش میزان کلروفیل، بزرگ شدن کلروپلاست‌ها و افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌شوند (Jaleel *et al.*, 2009). یکی از این ترکیبات پنکونازول است که به عنوان تنظیم‌کننده‌ی رشد محسوب می‌گردد (Hassanpour *et al.*, 2012).

در پژوهش حاضر، اثرات تعدیل‌کننده سالیسیلیک اسید و پنکونازول در کاهش اثرات تنش شوری بر رقم صفه گلرنگ بررسی شد. مطالعه برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی و همچنین بررسی بیان ژن‌های *SOS1* و *NHX1* به عنوان ژن‌های کلیدی در

مقاومت و تحمل گیاه به افزایش شوری خاک نیز از اهداف این تحقیق بوده است تا اینکه بتوان نتیجه گرفت آیا مجموعه تغییرات در محتوای این ترکیبات پس از کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد می‌تواند باعث افزایش تحمل شوری در گلرنگ شود.

مواد و روش ها

این آزمایش به صورت گلدانی و در گلخانه‌ی دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران در تابستان ۱۳۹۴ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به اجرا درآمد. بذرهای گیاه گلرنگ (رقم صفه، مقاوم به شوری) از موسسه‌ی اصلاح و تهیه بذر و نهال کرج تهیه گردید. بذور گلرنگ در گلدان‌هایی به قطر ۱۵سانتی‌متر حاوی خاک و پرلیت به نسبت ۲ به ۱ کشت داده شدند. گلدان‌ها در گلخانه تحت شرایط دمایی ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۵ ساعت رو شنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشتند. در سن ۲۵ روزگی گیاهان اعمال تنش شوری آغاز گردید. تیمارها، شامل ۳ تیمار NaCl (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار)، تیمار یک میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (Ghassemi-Golezani & Hosseinzadeh-Mahootchi, 2015) و تیمار ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر پنکونازول بوده است. سالیسیلیک اسید به صورت یک روز در میان و پنکونازول هفته‌ای یک‌بار بر گیاهان اعمال شد. غلظت‌های NaCl در این پژوهش بر اساس تحقیقات انجام شده در مطالعات پیشین روی گیاه گلرنگ و همچنین با توجه به میزان تحمل شوری خاک توسط گیاه انتخاب شدند. اعمال تنش شوری از طریق تهیه تیمارها در محلول غذایی هوگلند (Hoagland & Arnon, 1950) با رقت یک دوم خاص هر تیمار شوری و آبیاری گلدان‌ها با این محلول به صورت یک روز در میان صورت پذیرفت. بعد از گذشت ۲۱ روز برگ‌های گیاه جمع‌آوری و در یخچال در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین محتوای پروتئین محلول

به‌منظور استخراج محتوای پروتئینی نمونه‌های گیاهی، از بافر استخراج Tris-HCl با 6.8 pH استفاده شد. یک گرم از بافت گیاهی به همراه ۲ میلی‌لیتر از بافر استخراج شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه (rpm) سانتریفوژ گردید (J2-21 M, Beckman, Palo Alto, USA). برای سنجش میزان غلظت پروتئین موجود در عصاره پروتئینی استخراج شده از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976). بدین منظور ۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد با ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه‌ی عصاره گیاهی ترکیب و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری (UV-160, Shimadzu, and Tokyo, Japan) خوانده شد.

تعیین محتوای پرولین آزاد

به‌منظور استخراج و سنجش محتوای پرولین آزاد موجود در نمونه‌ها، ۱ گرم از بافت تر گیاه توسط ۴ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ در هاون چینی سائیده شد (Bates *et al.*, 1973). محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه (rpm) سانتریفوژ شد. یک میلی‌لیتر از روشناور حاصل با ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلایسیال و ۲ میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین (شامل ۱/۲۵ میلی‌گرم نین‌هیدرین حل شده در ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار و ۳۰ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال) و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بلافاصله به حمام یخ منتقل گردید. سپس به محلول واکنش ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و جذب محلول در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان پرولین بر حسب میکروگرم پرولین به ازای گرم وزن تر محاسبه گردید.

تعیین محتوای گلایسین بتائین

مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر گیاهی در ۳۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه برای تعیین محتوای گلایسین بتائین حل شد (Greive & Grattan, 1983). به محلول حاصل، معرف یدید پتاسیم سرد و اسید سولفوریک ۲ نرمال اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سپری شدن این زمان مقدار ۹ میلی‌لیتر ۱ و ۲ دی کلرواتان به محلول اضافه گردید. در نهایت، پس از گذشت ۳/۵-۳ ساعت به کمک منحنی استاندارد، جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۶۵ نانومتر خوانده شد.

تعیین محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

برای سنجش محتوای پراکسید هیدروژن مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر گیاه توسط ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد TCA در حمام یخ استخراج شد (Velikova *et al.*, 2000). عصاره‌ی به‌دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم اضافه و در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استانداردی با استفاده از پراکسید هیدروژن رسم و محتوای پراکسید هیدروژن نمونه‌ها (با ضریب خاموشی $0/28\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن به ازای گرم وزن تر محاسبه گردید.

پراکسیداسیون لیپیدها

به‌منظور تعیین محتوای پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء بر اساس محتوای مالون دی آلدهید (MDA) تولید شده، مقدار ۰/۲ گرم بافت تر گیاه توسط ۲ میلی‌لیتر TCA (اسیدتری‌کلرواستیک) ۰/۱ درصد استخراج شد (Heath & Packer, 1968). عصاره‌ی حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۱ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم و در دمای ۹۵ درجه

سانتی‌گراد قرار گرفته و نمونه‌ها به سرعت سرد گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط و دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی حاصل از سانتریفوژ در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و در نهایت مقدار مالون دی‌آلدهید (با ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی‌مول بر سانتی‌متر) که محصول پراکسیداسیون لیپیدهاست، براساس نانومول در گرم وزن تر محاسبه گردید.

تعیین محتوای ترکیبات فنلی کل

مقدار ۰/۱ گرم از بافت خشک گیاهی توسط متانول ۸۰ درصد در بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت استخراج شد (Ranganna, 1986). عصاره‌ی حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف و تبخیر شد و پس از انحلال مجدد در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل مورد استفاده قرار گرفت. در این روش از معرف فولین برای تعیین محتوای کل ترکیبات فنلی استفاده گردید. در نهایت، جذب نمونه‌ها در ۷۶۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)

برای این بررسی از روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. برای آماده‌سازی عصاره برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ۰/۱ گرم از بافت گیاهی توسط ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به مدت ۳ ساعت در بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری شد. رادیکال DPPH رادیکال آزاد پایداری به رنگ بنفش است و در اثر واکنش با آنتی‌اکسیدان‌ها احیا می‌شود و به زرد کمرنگ تغییر رنگ می‌دهد. واکنش در یک میلی‌لیتر متانول حاوی ۲و۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل هیدرات (DPPH) (غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره در غلظت‌های مورد نظر انجام شد. حجم نهایی مخلوط واکنش توسط متانول مطلق به ۴ میلی‌لیتر رسید. مخلوط‌های واکنش به مدت ۳۰ دقیقه، در غیاب نور نگهداری شدند. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. نمونه شاهد تنها دارای ۳ میلی‌لیتر متانول و یک میلی‌لیتر رادیکال DPPH متانولی است. درصد بازداری از DPPH نمونه‌ها با مقایسه‌ی نمونه‌های عصاره و نمونه‌ی شاهد و با استفاده از معادله زیر به دست آمد:

$$I\% = (A_{control}-A_{sample}/A_{control}) \times 100$$

که در آن I% برابر با درصد بازداری DPPH ، $A_{control}$ جذب شاهد و A_{sample} جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر بوده‌اند.

بررسی بیان ژن‌ها

RNA کل با استفاده از کیت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) استخراج شد. در مراحل استخراج RNA از هضم DNase روی ستون (On-Column DNase Digestion) برای از بین بردن هر گونه حضور DNA ژنومی مطابق با

دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه Qubit (Invirtogen) و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شدند.

برای ساخت cDNA نمونه RNA (۳ میکرولیتر) به همراه ۰/۵ میکرولیتر Oligo (dT) و ۰/۵ میکرولیتر راندوم هگزامر به میکروتیوبی سترون با حجم ۰/۵ میلی‌لیتر منتقل شد. توسط آب تیمار شده با DEPC حجم محلول به ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و برای سرد شدن به روی یخ منتقل گردید. سپس ۴ میکرولیتر بافر تکثیر، ۲ میکرولیتر dNTP و یک میکرولیتر Reverse transcriptase به محلول فوق اضافه و مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر انکوبه شد. محصول واکنش برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

برای طراحی پرایمرها (جدول ۱) از نرم افزارهای Oligo7 و Gene Runner (6.5.50) استفاده شد. جستجو با نرم‌افزار Blast با ژنوم گلرنگ انجام شد تا از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل گردد. نتایج نشان داد که پرایمرها دارای محل‌های اتصال منحصر به خود هستند و به طور اختصاصی به ژن‌های هدف متصل می‌گردند. بعلاوه، پرایمرها توسط برنامهGene Runner بررسی شده‌ی تا از نظر درصد GC، دمای Tm و نیز عدم وجود دایمر با یکدیگر اطمینان حاصل گردد. از ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرها برای بررسی بیان ژن‌ها با روش Real-Time PCR

Gene	Product	Forward primer (5´-3´)	Reverse primer (5´-3´)
Actin	Actin	TGTTCCAGCCATCTCATGTTGG	TCATGCGATCAGCAATTCCAGG
SOS1	Na^+/H^+ antiporter	CACGTCCCAAGAAGGCGCTGAT	CCAGCGCTTTGCCCATCATTTC
NHX1	Na^+/H^+ antiporter	TCGGGGAAGGCGTCGTGAAT	CCCAACAAAACCCCGCTCACTC

برای بررسی بیان ژن از روش کمیت سنجی نسبی توسط دستگاه Real-Time PCR (Applied Biosystems) و از Master mix SYBR Green Rox که حاوی رنگ آشکارساز سایبرگرین است استفاده شد. برنامه دمایی-زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ چرخه تکثیر با دمای واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، دمای اختصاصی اتصال آغازگر ژن مرجع به مدت ۳۰ ثانیه و دمای اختصاصی اتصال آغازگرهای دو ژن هدف ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سرانجام دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه در دستگاه اجرا شد.

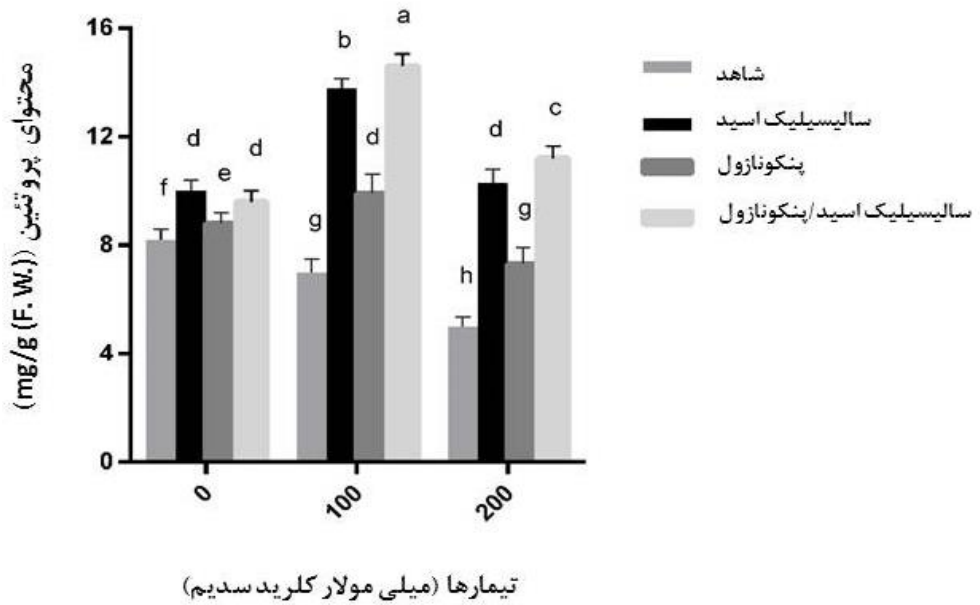
تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) بر روی داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) مورد تحلیل قرار گرفت. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها در سطح خطای ۰/۰۵ با آزمون دانکن (DMRT[1]) انجام شد. از نرم افزار Graphpad Prism 7.03 برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

محتوای پروتئین محلول

تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار محتوای پروتئین محلول در گیاهان گلرنگ شد (شکل ۱). تیمار سالیسیلیک اسید و پنکونازول به تنهایی و همزمان محتوای پروتئین‌ها را در گیاهان شاهد و تحت تنش افزایش داد. بالاترین محتوای پروتئین مربوط به گیاهان تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار همزمان سالیسیلیک اسید و پنکونازول بود. در این گیاهان محتوای پروتئین به بیش از دو برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت.



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) و تیمار سالیسیلیک‌اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) روی محتوای پروتئین محلول در اندام هوایی گیاه گلرنگ. میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P\leq0.05$).

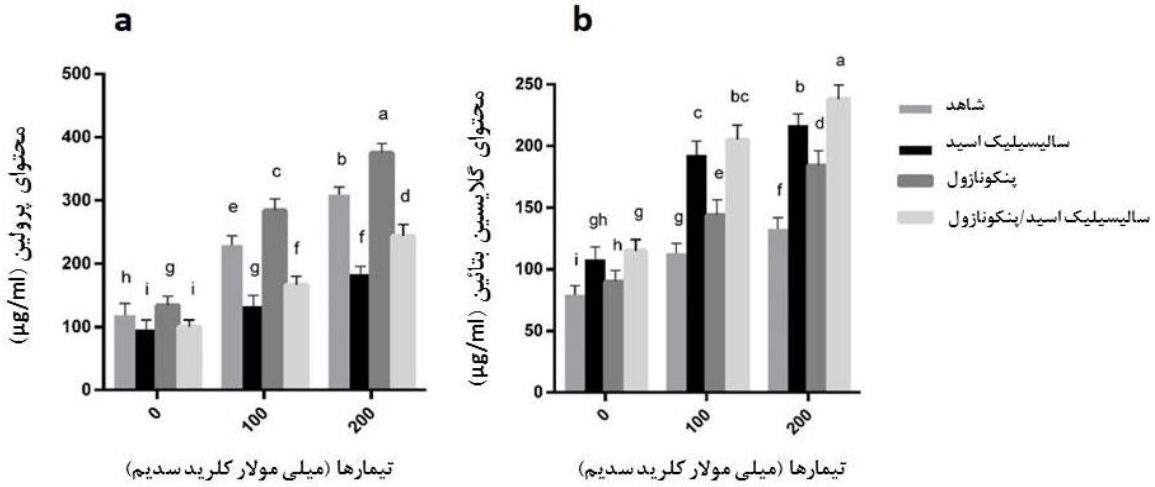
محتوای پرولین و گلایسین بتائین

نتایج نشان داد که محتوای پرولین تحت تنش شوری در گیاهان افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۲-a) تیمار سالیسیلیک اسید باعث کاهش محتوای این ترکیب در گیاهان شاهد و تحت تنش شد، در حالی که تیمار پنکونازول به تنهایی و

[1]Duncans Multiple Range Test

همزمان با سالیسیلیک اسید محتوای پرولین را به طور معنی‌داری افزایش داد. بیشترین محتوای پرولین در گیاهان تحت تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار پنکونازول مشاهده شد.

گلایسین بتائین، از دیگر اسمولیت‌های سازگار است که محتوای آن در گیاهان تنش دیده افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۲-b). محتوای این ترکیب به‌طور چشمگیری تحت تنش شوری افزایش یافت. تیمار سالیسیلیک اسید و پنکونازول به تنهایی و همزمان محتوای این ترکیب را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. بالاترین محتوای گلایسین بتائین در گیاهان تحت تیمار



۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار همزمان دو تنظیم‌کننده بود، به‌طوری‌که محتوای آن نزدیک به دو برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت.

شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) و تیمار سالیسیلیک‌اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) روی محتوای پرولین (a) و گلایسین بتائین (b) در اندام هوایی گیاه گلرنگ. میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند (P≤0.05).

محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

محتوای پراکسید هیدروژن در گلرنگ با افزایش غلظت کلرید سدیم به تدریج افزایش یافت (شکل ۳-a). تیمار سالیسیلیک اسید و پنکونازول به تنهایی و همزمان در گیاهان شاهد و تحت تنش باعث افزایش معنی‌دار این محتوا گردید. بیشترین محتوای H_2O_2 در گیاهان تحت تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار همزمان دو تنظیم‌کننده مشاهده شد.

پراکسیداسیون لیپیدها

مالون دی آلدئید به عنوان فرآورده‌ی نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدها است و به عنوان شاخص آسیب غشایی به شمار می‌آید. میزان پراکسیداسیون لیپید به‌عنوان تجمع محتوای مالون دی آلدئید در بافت گیاهی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که پراکسیداسیون لیپیدها تحت تنش شوری در گیاهان افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۳-b).

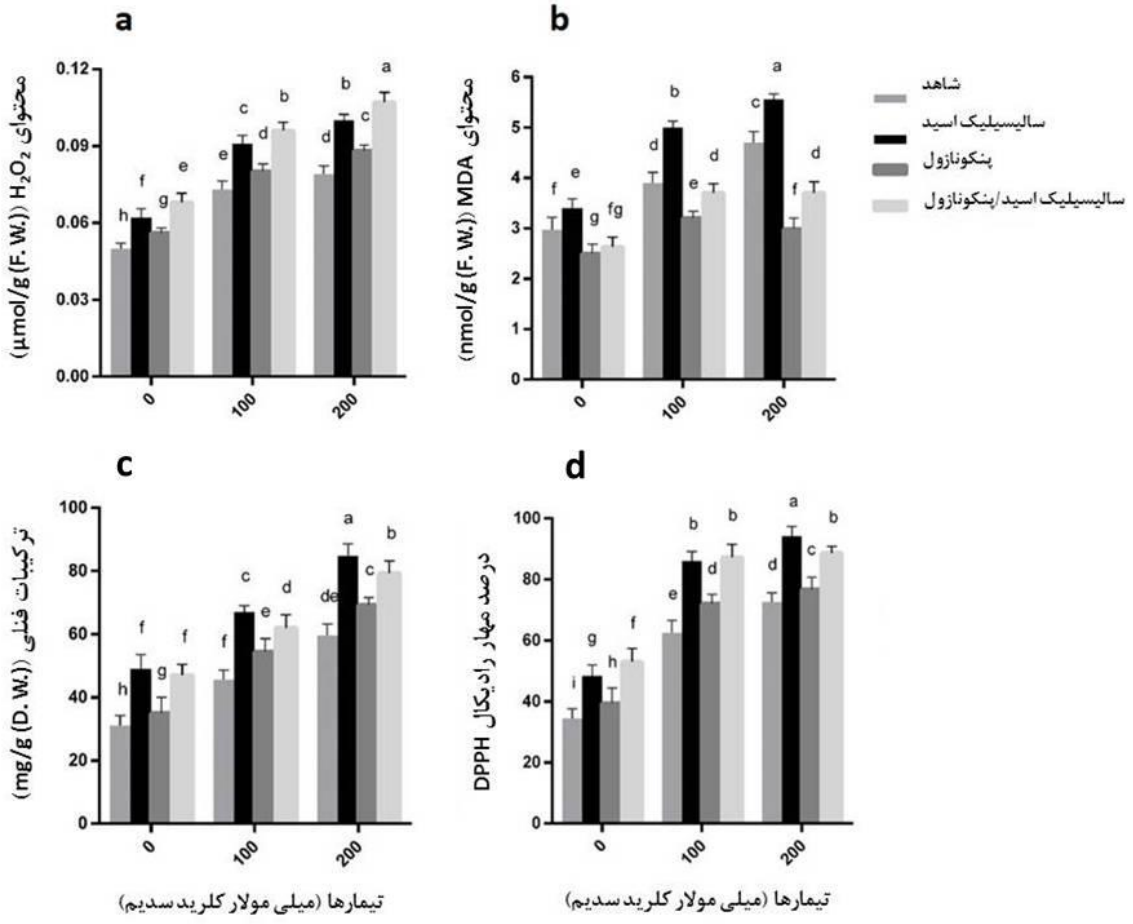
تیمار سالیسیلیک اسید باعث افزایش معنی‌دار محتوای مالون دی‌آلدئید در گیاهان شاهد و تحت تنش شد درحالی که، تیمار پنکونازول محتوای آن را کاهش داد. کاربرد هم‌زمان دو تنظیم‌کننده نیز باعث کاهش معنی‌دار محتوای MDA در گیاهان شد. بالاترین محتوای MDA در گیاهان تحت تنش ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

محتوای ترکیبات فنلی

محتوای ترکیبات فنلی کل با افزایش غلظت کلرید سدیم به‌تدریج افزایش یافت (شکل ۳-C). تیمار سالیسیلیک اسید و پنکونازول به‌تنهایی و همزمان در گیاهان شاهد و تحت تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی گردید. بالاترین محتوای این ترکیبات در گیاهان تحت تنش ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی درگیاهان بر اساس میزان فعالیت جاروبگری رادیکال آزاد DPPH تعیین شد (شکل۳-d). فعالیت جاروبگری DPPH در گلرنگ تحت تنش شوری به طور معنی‌داری افزایش یافت. تیمار سالیسیلیک‌اسید و پنکونازول به

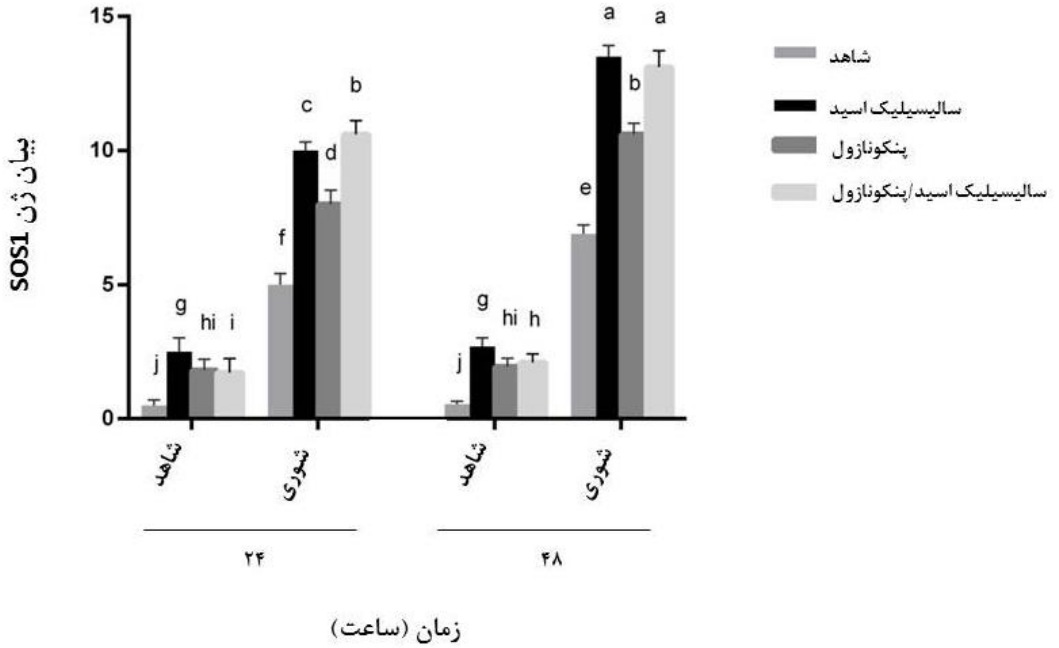


تنهایی و همزمان در گیاهان شاهد و تحت تنش باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید. بالاترین میزان فعالیت در گیاهان تحت تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار سالیسیلیک اسید بود.

شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) و تیمار سالیسیلیک‌اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) روی محتوای H_2O_2 (a)، MDA (b) ترکیبات فنلی کل (c) و فعالیت جاروب‌گری رادیکال‌های آزاد (d) در اندام هوایی گیاه گلرنگ. میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P\leq0.05$).

بررسی بیان ژن *SOS1*

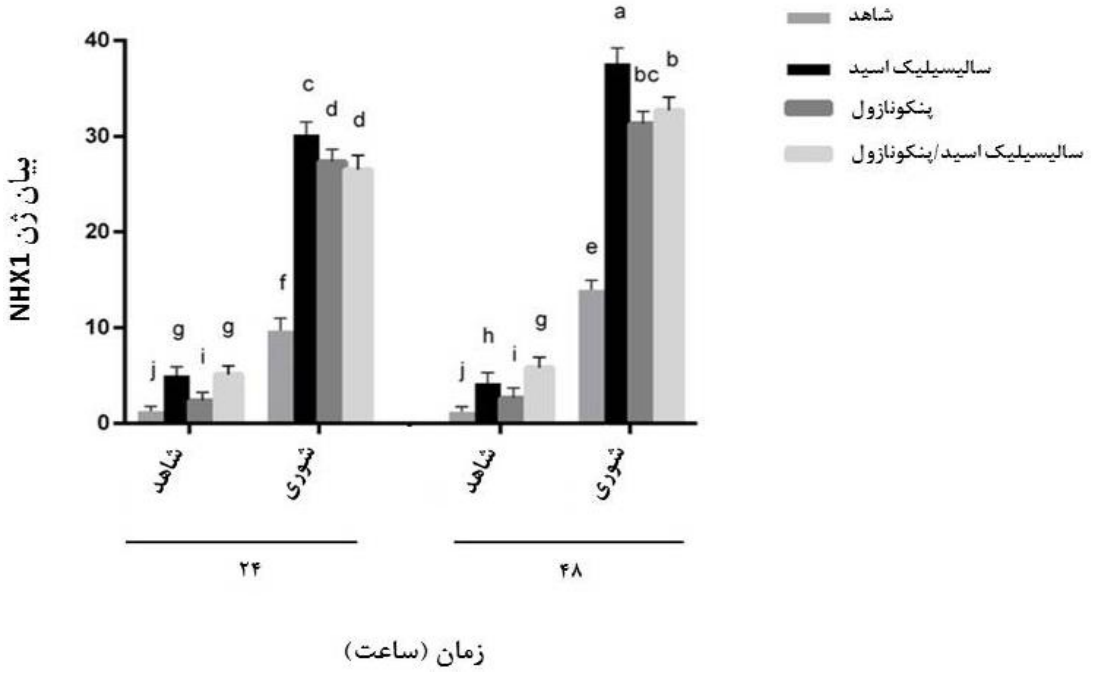
میزان بیان ژن *SOS1* در گیاهان تحت تیمار کلرید سدیم به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴). تیمار SA و PEN به‌تنهایی و همزمان در گیاهان شاهد و تحت تنش باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن گردید. بیشترین میزان بیان ژن *SOS1* پس از ۴۸ ساعت از برداشت و در گیاهان تحت تنش شوری و تیمار SA به تنهایی و همزمان با PEN بود.



شکل ۴- آنالیز بیان ژن *SOS1* تحت تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، تیمار سالیسیلیک‌اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از برداشت در اندام هوایی گیاه گلرنگ. میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P\leq0.05$).

بررسی بیان ژن *NHX1*

میزان بیان ژن *NHX1* در گیاهان تحت تیمار کلرید سدیم به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۵). تیمار SA و PEN به‌تنهایی و همزمان در گیاهان شاهد و تحت تنش باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن گردید. بیشترین میزان بیان ژن *NHX1* پس از ۴۸ ساعت از برداشت و در گیاهان تحت تنش شوری و تیمار SA مشاهده شد.



شکل ۵- آنالیز بیان ژن *NHX1* تحت تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، تیمار سالیسیلیک‌اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از برداشت در اندام هوایی گیاه گلرنگ. میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P\leq0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

تنش شوری از طریق ایجاد محدودیت در جذب عناصر غذایی، کمبود آب قابل استفاده گیاه و سمیت عناصر غذایی، کاهش قدرت رشد سلولی را به همراه دارد (Enferad *et al.*, 2004). نسبت بالای سدیم به پتاسیم طی تنش شوری، واکنش‌های آنزیمی مختلفی را در سیتوپلاسم تحت تاثیر قرار می‌دهد. پتاسیم عنصری مهم در سنتز پروتئین به شمار می‌آید (Parida & Das, 2005). بنابراین کاهش در محتوای پروتئین‌ها را می‌توان به عنوان اثر مخرب سدیم در نظر گرفت که با تاثیر منفی بر آنزیم‌های موثر در سنتز پروتئین منجر به کاهش محتوای آن می‌شود. نتایج مشابه در *Raphanus sativus* (Muthukumarasamy *et al.*, 2000) و *Phaseolus vulgaris* (Khadri *et al.*, 2007) نیز مشاهده شده است.

افزایش پروتئین‌های محلول توسط SA و PEN در گلرنگ مشاهده شد. SA در تولید پروتئین‌های دفاعی و انواع متفاوتی از کینازها و روبیسکو تاثیرگذار می‌باشد (Parvaiz & Satyawati, 2008). احتمال می‌رود SA بتواند با تاثیر بر آنزیم‌های مسیر سنتز و یا تجزیه پروتئین‌ها در افزایش میزان آنها دخالت داشته باشد. بعلاوه، محققان دریافته‌اند که افزایش محتوای پروتئین در گیاهان به‌واسطه‌ی PEN می‌تواند به دلیل افزایش تولید سیتوکینین تحت کاربرد خارجی PEN باشد (Hassanpour *et al.*, 2013). به نظر می‌رسد که بین تنظیم‌کننده‌های SA و PEN اثر هم‌افزایی وجود دارد به‌طوری‌که اعمال همزمان آنها در گلرنگ باعث افزایش بیشتر محتوای پروتئین محلول گردید. تنظیم اسمزی به عنوان یک مکانیسم سازشی دخیل در تحمل گیاه

به تنش است که به حفظ فشار تورگور کمک می‌کند. حفظ فشار تورگور معمولاً با تجمع متابولیت‌هایی همچون پرولین و گلایسین بتائین همراه است که متابولیسم طبیعی گیاه را مختل نمی‌کنند (Orcutt & Nilsen, 2000). در این تحقیق، محتوای پروتئین تحت تنش شوری کاهش یافت در حالی که محتوای پرولین افزایش یافت. احتمالاً افزایش محتوای پرولین به دلیل هیدرولیز پروتئین و یا بازدارندگی سنتز پروتئین باشد (Jaleel *et al.*, 2008). محلول‌پاشی برگی SA در این تحقیق سبب کاهش محتوای پرولین در گیاهان شد (شکل ۲-a). نتایج ما با نتایج حاصل از بررسی اثر SA بر گونه‌های مختلف گیاهی مانند *Phaseolus vulgaris* (Palma *et al.*, 2009) و *Artemisia annual* L. (Aftab *et al.*, 2011) تحت تنش شوری مطابقت دارد. این نتایج نشان داده‌اند که SA با کاهش محتوای پرولین اضافی در شرایط تنشی باعث برقراری تعادل اسمزی در سیتوزول می‌گردد. تیمار PEN نیز باعث افزایش بیشتر محتوای پرولین گردید. نتایج مشابهی در گیاهان بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) (Hojati *et al.*, 2011) و پونه معطر (*Mentha Pulegium*) (Hassanpour *et al.*, 2013) مشاهده شد. افزایش بیشتر محتوای پرولین با تیمار تریازول با ایجاد تعدیل اسمزی بهتر به پایداری بیشتر غشاء و آنزیم‌ها در شرایط تنشی کمک نمود و منجر به افزایش میزان فتوسنتز شد (Zhang *et al.*, 2007). اعمال همزمان SA و PEN محتوای پرولین را کاهش داد که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اثر کاهندگی این دو تنظیم‌کننده باشد.

گزارش‌هایی وجود دارد که نشان‌دهنده‌ی اثرات مثبت اعمال خارجی گلایسین بتائین روی رشد گیاهان تحت تنش شوری است (Ashraf & Foolad, 2007; Singh & Gautam, 2013). پژوهشگران نشان داده‌اند که پیش‌تیمار بذرهای گوجه‌فرنگی با SA افزایش تولید گلایسین بتائین را تحت تنش شوری به دنبال دارد. آنها ثابت کرده‌اند که SA نقش القاکننده روی بتائین آلدهید به عنوان پیش‌ساز گلایسین بتائین دارد (Singh & Gautam, 2013). همچنین PEN به‌طور چشمگیری در پاسخ به تنش دهیدراسیون افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد که تحمل به دهیدراسیون به واسطه‌ی اعمال خارجی PEN می‌تواند دلیلی بر افزایش محتوای گلایسین بتائین باشد. اعمال همزمان دو تنظیم‌کننده بر گیاهان نیز اثرات هم‌افزایی دارد و محتوای گلایسین بتائین را افزایش می‌دهد.

پراکسید هیدروژن به طور طبیعی در گیاه تولید می‌شود. این ترکیب پاسخ‌های دفاعی متنوعی را در سلول هدف‌گیری می‌کند و نیز باعث تجمع SA و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌گردد (Shirasu *et al.*, 1997). مطالعات بسیاری این ادعا را پشتیبانی کرده‌اند؛ از جمله تیمار گیاه تنباکو با H_2O_2 که باعث القای محتوای SA می‌شود (Leon *et al.*, 1995). بر اساس نتایج حاصل مشخص شد که تیمار SA هم‌زمان با کاهش تنش باعث افزایش محتوای H_2O_2 در گیاهان می‌شود. پیشنهاد شده است که SA با اتصال و در پی آن بازداشتن فعالیت آنزیمی کاتالاز/SABP (پروتئین متصل شونده به SA)، مقدار H_2O_2 را افزایش می‌دهد و به عنوان پیامی برای بیان ژن‌های مرتبط با افزایش مقاومت گیاه عمل می‌کند. بنابراین، کاتالاز پیام SA را از راه اتصال با آن دریافت و سپس آن پیام را با ممانعت از فعالیت آنزیمی خود منتقل می‌نماید و در نتیجه مقدار H_2O_2 افزایش می‌یابد.

افزایش H_2O_2 توسط تریازول‌ها نیز در گیاه *Catharanthus roseous* گزارش شده است (Jaleel *et al.*, 2007). به‌نظر می‌رسد تریازول‌ها نه تنها از گیاه در برابر تنش محافظت می‌کنند، بلکه علائمی شبیه به تنش را نیز جهت افزایش سطح H_2O_2 القاء می‌کنند. در واقع تریازول‌ها با افزایش سطح H_2O_2 می‌توانند منجر به افزایش تحمل تنش شوند. در این پژوهش، تیمار همزمان SA و PEN منجر به افزایش بیشتر محتوای H_2O_2 شد که نشان‌دهنده‌ی اثر هم‌افزایی این دو ترکیب است.

سطح MDA حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء به‌عنوان شاخصی برای آسیب اکسایشی به کار می‌رود (Demiral & Türkan, 2005). در این تحقیق، محتوای MDA با افزایش تنش شوری افزایش یافت و تیمار SA باعث افزایش بیشتر آن شد. به نظر می‌رسد که SA با افزایش تولید H_2O_2 از طریق مهار فعالیت کاتالاز منجر به افزایش MDA می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به‌دست آمده توسط محققان دیگر در بررسی اثر SA در افزایش محتوای MDA در سایر گونه‌های گیاهی تحت تنش مطابقت دارد (Esra & Ustun, 2012; Schmid-Siegert *et al.*, 2012). تیمار PEN در گیاهان باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها شد. کاهش MDA توسط ترکیبات تریازولی در گندم نیز گزارش شده است (Berova *et al.*, 2002). به نظر می‌رسد که ترکیبات تریازولی با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها باعث مقاومت به تنش شوری در گلرنگ شدند. کاهش معنی‌دار محتوای MDA در گلرنگ تحت اعمال همزمان دو تنظیم‌کننده می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اثر کاهندگی این ترکیبات باشد.

مطالعات بسیاری در ارتباط با تاثیر تنش‌های اسمزی روی ترکیبات فنلی صورت گرفته است. آنها نشان دادند که تجمع ترکیبات فنلی به عنوان مکانیسم سازش جهت روبش رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از آسیب سلول می‌باشد (Harborne & Williams, 2000). افزایش ترکیبات فنلی به دنبال تیمار با SA در این تحقیق می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم PAL باشد (Hahlbrock & Scheel, 1989). همچنین افزایش این ترکیبات تحت تیمار PEN نشان‌دهنده‌ی این است که این تنظیم‌کننده نیز می‌تواند باعث کاهش اثرات معکوس تنش شوری شود. نتایج حاصل از این تحقیق مشابه با فرضیه Fletcher و Hofstra (۱۹۹۰) می‌باشد. آنها پیشنهاد کردند که تریازول‌ها با افزایش ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌توانند باعث افزایش تحمل تنش شوند. این دو تنظیم‌کننده اثر هم‌افزایی دارند که نشان می‌دهد می‌توانند به صورت همزمان برای مقابله با شرایط تنش مورد استفاده قرار گیرند.

عدم تعادل بین تولید و حذف ROS باعث ایجاد تنش اکسایشی می‌شود. در تمامی گیاهان فعالیت آنتی اکسیدانی با میزان ترکیبات فنلی رابطه مستقیم دارد. Peterson و همکاران (۲۰۰۲) فعالیت آنتی اکسیدانی جو دوسر را با روش DPPH اندازه‌گیری و میزان ترکیبات کل عصاره را تعیین کردند. این تحقیق نشان داد بین میزان ترکیبات فنلی و توان آنتی اکسیدانی اندازه‌گیری شده رابطه مستقیمی وجود دارد. در تحقیق حاضر فعالیت رادیکال DPPH در پاسخ به تنش افزایش یافت و تیمار دو

تنظیم‌کننده منجر به افزایش بیشتر آن شد. افزایش هم‌عرض سطوح ترکیبات فنلی با فعالیت DPPH نشان می‌دهد افزایش فعالیت DPPH ممکن است به دلیل افزایش سطح ترکیبات فنلی توسط SA و PEN باشد که اثر هم‌افزایی داشتند.

طبق مطالعات انجام شده، افزایش سدیم در محیط اطراف ریشه موجب انتشار کلسیم به سیتوزول می‌گردد و توسط پروتئینی به نام SOS3 حس می‌شود و تشکیل کمپلکس SOS3 با SOS2 را تسریع می‌کند (Halfter *et al.*, 2000) که می‌تواند باعث فسفریلاسیون و فعالیت آنتی‌پورتر SOS1 شود (Quintero *et al.*, 2002). بعلاوه، NHX1 آنتی‌پورتری در غشای تونوپلاست است و شواهد زیادی وجود دارد که بیان بالای آن تحمل به شوری را افزایش می‌دهد. به‌عنوان مثال، در برنج، پس از بیان ژن *NHX1*افزایش تحمل به شوری مشاهده شد، در صورتی‌که برنج‌های تراریخته توانایی رشد کمتری داشتند (Fukuda *et al.*, 2004). سالیسیلیک اسید با روش‌های مختلف از جمله بخش‌بندی سدیم، تعدیل اسمزی و ساخت پروتئین‌کینازها در اثر تنش، موجب سازگاری به تنش می‌شود (Singh & Gautam, 2013). اطلاعات موجود نشان می‌دهد که سالیسیلیک اسید MAP kinasesرا فعال می‌کند (Mikołajczyk *et al.*, 2000). کینازها علاوه بر تنش شوری به تیمارهای سالیسیلیک اسید نیز واکنش نشان می‌دهند و بیان آنها، تحت تیمار سالیسیلیک اسید افزایش می‌یابد، بنابراین افزایش بیان ژن‌های *SOS1* و *NHX1* می‌تواند ناشی از تغییر در بیان ژن‌های کدکننده‌ی کینازها باشد. به نظر می‌رسد که SA و PEN با افزایش فعالیت کینازهایی مانند SOS2که در مسیر پاسخ به تنش شوری قرار دارند باعث القای بیان *SOS1* و *NHX1* شوند.

در مجموع، نتایج حاصل نشان داد که تنش شوری اثرات مخربی در گیاه گلرنگ دارد. این اثرات از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد می‌شود که انباشتگی این ترکیبات باعث پراکسیداسیون لیپیدها و اختلال در متابولیسم سلول می‌گردد. کاربرد سالیسیلیک اسید و پنکونازول باعث بهبود رشد گیاه و کاهش اثرات منفی تحت تنش شوری می‌شود. این دو تنظیم کننده با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و همچنین بیان برخی ژن‌های درگیر در مسیر تحمل شوری باعث افزایش مقاومت به تنش شوری می‌شوند. بنابراین، با توجه به اینکه این ترکیبات نسبتاً ارزان و در دسترس می‌باشند، برای افزایش مقاومت گیاهان به‌ویژه گیاهان زراعی به شوری می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

زینلی، ا. ۱۳۷۸. گلرنگ (شناخت تولید و مصرف)، چاپ اول، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Aftab, T., Khan, M. M. A., da Silva, J. A. T., Idrees, M. & Naeem, M. (2011). Role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in Artemisia annua L. Journal of Plant Growth Regulation 30(4): 425-435.

Ali, Y., Aslam, Z., Ashraf, M. & Tahir, G. (2004). Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. International Journal of Environmental Science & Technology 1(3): 221-225.

Ashraf, M. & Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and experimental botany 59(2): 206-216.

Banu, M. N. A., Hoque, M. A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. & Murata, Y. (2009). Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. Journal of Plant Physiology 166(2): 146-156.

Bates, L., Waldren, R. & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil 39(1): 205-207.

Berova, M., Zlatev, Z. & Stoeva, N. (2002). Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. Bulg. J. Plant Physiol 28(1-2): 75-84.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72(1-2): 248-254.

Demiral, T. & Türkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental and experimental botany 53(3): 247-257.

Enferad, A., Poustini, K., Hosseini, N. M. & Khajeh-Ahmad-Attari, A. (2004). Physiological responses of rapeseed (Brassica napus L.) varieties to salinity. JWSS-Isfahan University of Technology 7(4): 103-113.

Esra, K. & USTUN, A. S. (2012). Phenylalanine Ammonia Lyase Activity in Stem of Pepper (Capsicum annuum L.) Infected by Phytophthora capsici L. Gazi University Journal of Science 25(2): 307-312.

Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H. & Tanaka, Y. (2004). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na+/H+ antiporter from rice. Plant and Cell Physiology 45(2): 146-159.

Ghassemi-Golezani ,K. & Hosseinzadeh-Mahootchi, A. (2015). Improving physiological performance of safflower under salt stress by application of salicylic acid and jasmonic acid. WALIA journal 31: 104-109.

Greive, C. & Grattan, S. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary-amino compounds. Plant Soil 70: 303-307.

Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Annual review of plant biology 40(1): 347-369.

Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J.-K. (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. Proceedings of the National Academy of Sciences 97(7): 3735-3740.

Harborne JB, Williams CA. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55: 481-504.

Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam, V., Najafi, F. & Razavi, K. (2012). Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (Mentha pulegium L.). Acta physiologiae plantarum 34(4): 1537-1549.

Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam, V., Najafi, F. & Razavi, K. (2013). Penconazole induced changes in photosynthesis, ion acquisition and protein profile of Mentha pulegium L. under drought stress. Physiology and Molecular Biology of Plants 19(4): 489-498.

Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. & Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. Environmental and experimental botany 68(1): 14-25.

Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics 125(1): 189-198.

Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station 347(2nd edit).

Hojati, M., Modarres-Sanavy, S. A. M., Ghanati, F & .Panahi, M. (2011). Hexaconazole induces antioxidant protection and apigenin-7-glucoside accumulation in Matricaria chamomilla plants subjected to drought stress. Journal of Plant Physiology 168(8): 782-791.

Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P. & Panneerselvam, R. (2008). Exogenous application of triadimefon affects the antioxidant defense system of Withania somnifera Dunal. Pesticide biochemistry and physiology 91(3): 170-174.

Jaleel, C. A., Kishorekumar, A., Manivannan, P., Sankar, B., Gomathinayagam, M., Gopi, R., Somasundaram, R. & Panneerselvam, R. (2007). Alterations in carbohydrate metabolism and enhancement in tuber production in white yam (Dioscorea rotundata Poir.) under triadimefon and hexaconazole applications. Plant Growth Regulation 53(1): 7-16.

Jaleel, C. A., Zhao, C., Mohamed, S., Al-Juburi ,H. J., Moussa, H. R., Gomathinayagam, M. & Panneerselvam, R. (2009). Alterations in sucrose metabolizing enzyme activities and total phenol content of Curcuma longa L. as affected by different triazole compounds. Frontiers of Biology in China 4(4): 419- 423.

Khadri, M., Tejera, N. & Lluch, C. (2007). Sodium chloride–ABA interaction in two common bean (Phaseolus vulgaris) cultivars differing in salinity tolerance. Environmental and experimental botany 60(2): 211-218.

Leon, J., Lawton, M. A. & Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. Plant physiology 108(4): 1673-1678.

Mikołajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszyńska, G., Klessig, D. F. & Dobrowolska, G. (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid–induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. The plant cell 12(1): 165-178.

Mueller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E. & Zenk, M. H. (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences 90(16): 7490-7494.

Muthukumarasamy, M., Gupta, S. D. & Panneerselvam, R. (2000). Influence of triadimefon on the metabolism of NaCl stressed radish. Biologia Plantarum 43(1): 67-72.

Nair, V. D., Jaleel, C. A., Gopi, R. & Panneerselvam, R. (2009). Changes in growth and photosynthetic characteristics of Ocimum sanctum under growth regulator treatments. Frontiers of Biology in China 4(2): 192-199.

Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. & Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of Experimental Botany 53(372): 1237-1247.

Orcutt, D. & Nilsen, E. (2000).The physiology of plants under stress, volume 2: soil and biotic factors. New York: John Wiley and Sons.

Palma, F., Lluch, C., Iribarne, C., García-Garrido, J. M. & García, N. A. T. (2009). Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in Phaseolus vulgaris. Plant Growth Regulation 58(3): 307-316.

Pardo, J. M. & Rubio, F. (2011). Na+ and K+ transporters in plant signaling. Transporters and pumps in plant signaling, Springer. 65-98.

Parida, A. K. & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and environmental safety 60(3): 324-349.

Parvaiz, A. & Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. Plant Soil and Environment 54(3): 89.

Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K. & Pardo, J. M. (2002). Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na+ homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences 99(13): 9061-9066.

Rahman, S., Miyake, H. & Takeoka, Y. (2002). Effects of exogenous glycinebetaine on growth and ultrastructure of salt-stressed rice seedlings (Oryza sativa L.). Plant Production Science 5(1): 33-44.

Ranganna, S. (1986). Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products. Tata McGraw-Hill Education.

Said-Al Ahl, H. & Omer, E. (2011). Medicinal and aromatic plants production under salt stress. A review. Herba polonica 57(1): 72-87.

Schmid-Siegert, E., Loscos, J. & Farmer, E. E. (2012). Inducible malondialdehyde pools in zones of cell proliferation and developing tissues in Arabidopsis. Journal of Biological chemistry 287(12): 8954-8962.

Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. & Fatkhutdinova, D. R. (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant science 164(3): 317-322.

Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V. K., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. The plant cell 9(2): 261-270.

Singh, P. K. & Gautam, S. (2013). Role of salicylic acid on physiological and biochemical mechanism of salinity stress tolerance in plants. Acta physiologiae plantarum 35(8): 2345-2353.

Tsegaw, T., Hammes, S. & Robbertse, J. (2005). Paclobutrazol-induced leaf, stem, and root anatomical modifications in potato. HortScience 40(5): 1343-1346.

Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I. S. & Scherer, G. F. (2006). Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in Arabidopsis thaliana seedlings. Plant and Cell Physiology 47(3): 346-354.

Velikova, V., Yordanov, I. & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant science 151(1): 59-66.

Wuyts, N., De Waele, D. & Swennen, R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (Musa acuminata Grande naine) roots. Plant Physiology and Biochemistry 44(5): 308-314.

Zhang, M., Duan, L., Tian, X., He, Z., Li, J., Wang, B. & Li, Z. (2007). Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. Journal of Plant Physiology 164(6): 709-717.

Improving salt resistance of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through growth regulators: Salicylic acid and Penconazole

F.Shaki, H. Ebrahimzadeh Maboud, V. Niknam

Received:2018.1.10
Accepted:2019.12.7

Abstract

Salinity is one of the most important environmental factors that limit plant growth and its productivity. In addition, a significant part of agricultural lands has been affected by salinity. Therefore, identifying the methods which reduce the salinity effects on plants to prevent plant yield loss can be one way to cope with this problem. In this study, the effects of salicylic acid and penconazole were investigated on some physiological and molecular paramethers in safflower under salinity. Sodium chloride (0, 100, 200 mM), salicylic acid (1mM), and penconazole (15mg/l) were applied for 21 days on plants. Results revealed that protein content decreased under salinity while Proline, Glycine betaine, H_2O_2, MDA, Phenolics, and DPPH activity increased as well as *SOS1* and *NHX1* genes expression. Exogenous application of salicylic acid and penconazole increased protein, glycine betaine, H_2O_2, and phenolic contents, DPPH activity, as well as *SOS1* and *NHX1* genes expression under salinity but proline content decreased by salicylic acid and MDA content decreased by penconazole. Additionally, the results showed that the interaction of these two regulators could have antagonistic or synergic effects on plants. Overall, it seems that the exogenous application of these growth regulators can cause the adaptability in safflower to salinity. Due to the low price and availability, the use of these components can be considered in order to increase safflower resistance to salinity.

Keywords: Safflower, salinity, Salicylic acid, Penconazole, NHX1 antiporter, SOS1 antiporter.

1- PhD student, University of Tehran, Science Campus, Faculty of Life Sciences
2,3- Professor, University of Tehran, Science Campus, Faculty of Life Sciences
* (Responsible author: ebizadeh@ut.ac.ir)