بهبود تحمل تنش شوری در توت‌فرنگی با کاربرد استیک اسید و اثرگذاری بر خانواده ژنی ALDH و ژن ACS

زهرا میرفتاحی[۱]، سعید عشقی*[۱]، محمد اعتمادی[۱]، علی قرقانی[۱] و علی مقدم[۲]

[۱] بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

[۲] بخش بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

*نویسنده مسئول: eshghi@shirazu.ac.ir

چکیده

توت‌فرنگی از جمله محصولات حساس به شوری است و با توجه به شورشدن زمین‌های کشاورزی و کاهش کیفیت آب‌های آبیاری در سال‌های اخیر تولید این محصول را دچار مشکل کرده است. استات از جمله مواد شیمیایی شناخته شده است که می‌تواند آسیب‌های ناشی از تنش‌ها به‌ویژه تنش شوری را کاهش دهد. خانواده ژنی آلدهید دهیدروژناز (ALDH) که یک خانواده بزرگ ژنی است، توانسته است به تنش‌های محیطی پاسخ دهد. هدف از این پژوهش بررسی بیان خانواده ژنی ALDH و ژن ACS در شرایط تنش شوری (۴۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) با استفاده از کاربرد استیک اسید در دو غلظت (۱ و ۲ میلی‌مولار) در شرایط کشت هیدروپونیک بود. نتایج نشان داد که از خانواده ژنی ALDH، ALDH7B4 و ALDH3I1 به شدت تحت تاثیر تنش شوری و استیک اسید بودند. بیشترین میزان بیان ژن در تیمار ۱ میلی‌مولار استیک اسید در شرایط تنش شوری مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش شوری، بیشترین میزان بیان ژن ACS در تیمار ۲ میلی‌مولار استیک اسید در مقایسه با دیگر تیمارها مشاهده شد. در واقع نتایج نشان داد که از بین اعضای خانواده ژنی ALDH ژن ALDH3I1 بیشترین نقش را در ایجاد تحمل به تنش شوری در اثر کاربرد استیک اسید دارد و این نتیجه می‌تواند به‌عنوان یک راهکاری برای افزایش تحمل به تنش شوری در گیاهان در برنامه‌های بهنژادی و انتقال ژن مورداستفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی :آلدهید دهیدروژناز، استات،استیل کوآنزیم سنتتاز، تنش شوری.

مقدمه

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تهدیدها و تغییرات جهانی شرایط آب‌وهوایی است که می‌تواند میزان تولید محصولات را به خطر بیندازد و باعث افزایش کمبود مواد غذایی شود. ازاین‌رو گیاهان می‌توانند با استفاده از راهکارهای مختلف مانند تنظیم متابولیسم سلولی، پیغام رسانی هورمون‌ها و تغییرات کروماتینی و ژنتیکی شرایط پیشرو بهتر تحمل کنند (Kim *et al.*, 2017). در آرابیدوپسیس، مشخص شده است که تحمل به تنش خشکی به‌وسیله یک مسیر متابولیکی در تغییر گلیکولیز به سنتز استات تغییر می‌کند تا بدین‌وسیله بتواند مسیر پیغام‌رسانی جاسمونیک اسید را فعال کند و از این طریق افزایش تحمل به خشکی در گیاهان را افزایش دهد. کلید تغییر این وضعیت وابسته به داستیلاسیون هیستون HDA6 می‌باشد. در واقع کاربرد خارجی اسید استیک منجر به سنتز مصنوعی اسید جاسمونیک شده و اسید جاسمونیک تولید شده باعث افزایش میزان استیلاسیون هیستون H4 می‌شود و همین امر منجر به افزایش تحمل به تنش خشکی در آرابیدوپسیس می‌شود. HDA6 در واقع همولوگ ژن‌های HDAC1 در انسان و RPD3 در مخمر می‌باشد که دارای نقش‌های بسیار مهم از جمله خاموشی ژن می‌باشند (Earley *et al.*, 2010 ; Luo *et al.*, 2012). در این پژوهش مشاهده شد که میزان بیان ژن HDA6 در اثر تنش خشکی کاهش یافت و همین امر منجر به استیلاسیون هیستون H4 شد. سطح H4 در گیاهان شاهد به‌شدت کمبود، ولی با شروع تنش خشکی میزان بیان این ژن شروع به افزایش کرد. HDA6 باعث ممانعت از سنتز استات در شرایط طبیعی شد ولی در شرایط تنش به‌وسیله داستیلاسون که رخ می‌دهد، میزان بیان ژن آن‌ها کاهش می‌یابد. در گیاهان طبیعی در شرایط تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های ALDH2B7 و PCD1 در پاسخ به تنش خشکی افزایش می‌یابد که برای تولید استات لازم و ضروری هستند. بررسی های میکرواری نشان داد که ۳۵۷ ژن در شرایط تنش خشکی در تیمار با اسید استیک فعال شده‌اند. دراین‌بین ژن‌های مرتبط با هورمون

های اسید جاسمونیک و اتیلن دارای بیشترین نقش بودند و از سوی دیگر نقش هورمون‌های اسید جاسمونیک و اتیلن در جهت افزایش تحمل به تنش خشکی در پژوهش‌های گذشته مشاهده شده است (Balbi and devote, 2008; Kazan, 2015).

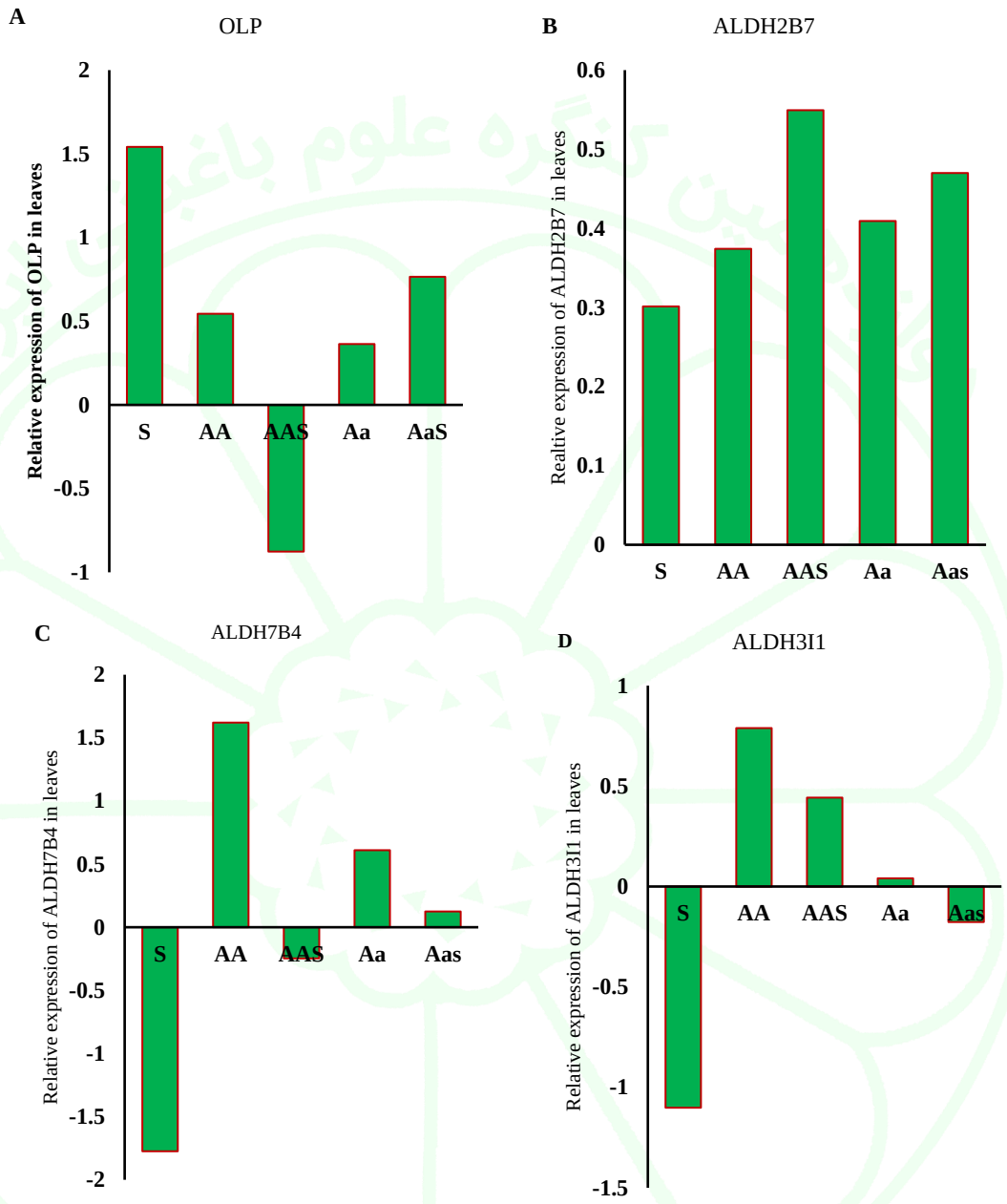
ALDH و PDC اعضاء یک خانواده هستند که نقش عملکردی مهمی در بیوسنتز اسید استیک در گیاهان را دارند. خانواده ژنی PDC در گیاهان و قارچ‌ها وجود دارد، درحالی‌که خانواده ژنی ALDH به گیاهان، مخمر و جانوران اختصاص دارد (Kotchoni *et al.*, 2006). در پژوهشی دیگر مشخص شد که میزان بیان ژن ALDH2B7 در قسمت بالادست خود به‌وسیله اسید آبسزیک و تنش اسمزی فعال می‌شوند. همچنین ALDHها نقش اصلی را برای ازبین‌بردن آلدهیدهای تولید شده در فرایند تنش‌های مختلف محیطی در گیاهان را دارند. در پژوهش‌های گذشته مشخص شد که بیان بیش از حد ژن ALDH3II میزان تحمل به تنش‌های محیطی را در گیاهان تراریخته افزایش می‌دهد. در این گیاهان میزان تحمل به تنش‌ها به‌وسیله کاهش میزان تولید پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدهید بود (Kotchoni *et al.*, 2006). بر اساس پژوهش‌های انجام شده در سایر گیاهان تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی نقش ژن‌های خانواده ژنی ALDH و ژن ACS در گیاهان وجود ندارد (حتی گیاه مدل، آرابیدوپسیس). ازاین‌رو پژوهش حاضر باهدف بررسی نقش کاربرد استیک اسید در شرایط تنش شوری و نقش‌های ژن‌های مرتبط در توت‌فرنگی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۹۸-۱۳۹۷ در گلخانه پژوهشی و آزمایشگاه بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انجام شد. بدین منظور نشاهای توت‌فرنگی رقم پاروس از نهالستانی تجاری در شهرستان مریوان استان کردستان تهیه و پس از ریشه‌دار شدن درون گلدان‌های ۳ لیتری حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت حجمی ۱:۱ کشت شدند. برای تغذیه ابتدا از محلول نیم غلظت محلول هوگلند و سپس از غلظت کامل آن استفاده شد. برای مطالعه اثر استیک اسید در ایجاد تحمل به تنش شوری، از دو غلظت مختلف استیک اسید یک و دو میلی‌مولار و برای مطالعه اثر تنش شوری از دو غلظت مختلف کلرید سدیم (۰ و ۴۰ میلی‌مولار) استفاده شد. تیمارهای استیک اسید به صورت هفته‌ای یک‌مرتبه و تیمار تنش شوری به صورت حل کردن نمک در محلول غذایی در اختیار گیاهان قرار گرفت. نوع طرح آزمایش مورداستفاده در این پژوهش، به صورت فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی ۴ تکرار و وجود ۳ گلدان در هر تکرار انجام شد. از زمان آغاز تیمارها تا پایان آزمایش حدود سه ماه طول کشید. در پایان آزمایش فاکتورهای مربوط به بیان ژن‌های خانواده ژنی ALDH و ژن ACS مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از بافت برگ در پایان آزمایش با روش تک‌مرحله‌ای مبتنی بر محلول ترایزول استخراج شد. به این صورت ۰/۲ گرم از بافت تازه، ۱ میلی‌لیتر ترایزول اضافه شد و پس از طی مراحل کامل استخراج، در نهایت ۳۰ میکرولیتر آب تیمار شده با دپس (DEPC) به رسوب به‌دست‌آمده اضافه شد. به‌منظور به‌دست‌آوردن RNA خالص و عاری از DNA، نمونه‌های RNAهای جدا شده با استفاده از آنزیم DNase شرکت زیست فناوران RNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده تیمار شدند. کیفیت RNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد تعیین و غلظت با دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مشخص شد. برای ساخت DNA مکمل (cDNA) از کیت سنتز cDNA شرکت زیست فناوران RNA طبق دستورالعمل استفاده شد. از آن جا که ژن‌های ALDH و ACS تاکنون در جنس *Fragaria* × *anannasa* توالی‌یابی نشده‌اند، برای تعیین توالی آن‌ها ابتدا از سایت NCBI توالی ژنی گونه *Fragaria vesca* دریافت شد و هم ردیفی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 انجام گرفت. بر اساس نواحی حفاظت شده این توالی‌ها و با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 آغازگرها طراحی شدند. نهایتاً پس از جداسازی و تعیین توالی قسمت‌هایی از ژن‌های خانواده ژنی ALDH و ACS آغازگرهای اختصاصی جهت بررسی بیان این ژن‌ها در توت‌فرنگی طراحی شد. جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌های مرتبط به روش RT-PCR از ژن کنترل داخل actin استفاده شد. همچنین جهت بررسی و تشخیص تنش شوری از ژن OLP که به‌عنوان ژن شناخته شده برای تنش شوری می‌باشد، استفاده شد. آنالیز واریانس داده‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

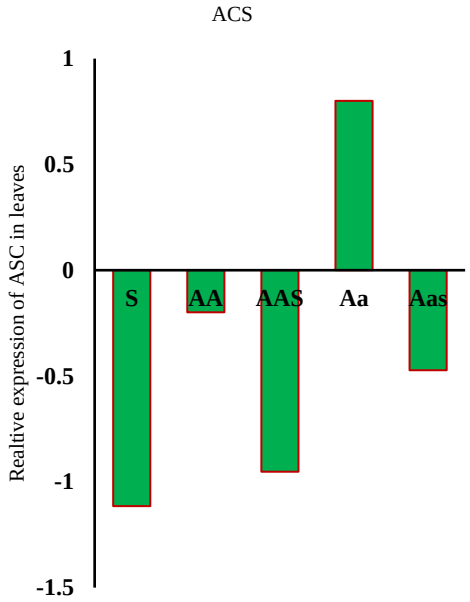
نتایج و بحث

نتایج نشان داد که تنش شوری منجر به افزایش بیان ژن OLP در شرایط تنش شوری شد ولی کاربرد استیک اسید در شرایط تنش شوری میزان بیان این ژن را کاهش داد به‌گونه‌ای که کمترین میزان بیان آن در تیمار یک میلی‌مولار استیک اسید در شرایط تنش شوری مشاهده شد. در واقع افزایش بیان این ژن در شرایط شوری نشان از در معرض قرارگرفتن در شرایط تنش شوری می‌باشد و نشان می‌دهد که گیاهان در شرایط تنش شوری بودند. میزان بیان ژن ALDH2B7 در اثر تنش شوری تغییر چندانی نداشت و تیمارهای استیک اسید تغییرات چندانی در میزان بیان آن‌ها نشان نداد. از سوی دیگر میران بیان ژن‌های ALDH3I1 و ALDH7B4 در اثر تنش شوری کاهش یافت. این در حالی است که تیمارهای استیک اسید در هر دو غلظت به‌ویژه در غلظت یک میلی‌مولار استیک اسید منجر به افزایش بیان نسبی آن‌ها شد. در واقع کاربرد استیک اسید منجر به افزایش این دو ژن شد و افزایش بیان این دو ژن در واقع در ایجاد تحمل به تنش شوری در ایجاد پیغام رسانی شرکت کرده و باعث افزایش تحمل سلول‌ها در شرایط تنش شوری شد. اگرچه در پژوهش-های گذشته در شرایط تنش خشکی بیشترین بیان ژن‌ها مربوط به ژن ALDH2B7 بود (Kim *et al.*, 2017) ولی در پژوهش ما میزان بیان ژن تفاوت چندانی در دو شرایط تنش و بدون تنش مشاهده نشد. همچنین در پژوهش‌های مربوط به گیاه آرابیدوپسیس مشخص شد که ژن‌های ALDH7B4 و ALDH3I1 بیشترین نقش را در شرایط تنش شوری داشتند (Zhao *et al.*, 2017) که این نتیجه مشابه با نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش ما می‌باشد؛ بنابراین نتایج این پژوهش نشان داد که ژن‌های ALDH3I1 و ALDH7B4 مسئول ایجاد تحمل به تنش شوری در اثر کاربرد استیک اسید در گیاهان می‌باشند.



شکل ۱. نمودار الگوی بیان نسبی ژن‌های ALDH3I1، ALDH7B4، ALDH2B7، OLP در برگ گیاه توت‌فرنگی، تیمارها شامل: S (تنش شوری ۴۰ میلی‌مولار کلرید سدیم)، AA (تیمار استیک اسید یک میلی‌مولار در شرایط بدون تنش شوری)، AAS (تیمار یک میلی‌مولار استیک اسید همراه با تنش شوری)، Aa (تیمار ۲ میلی‌مولار استیک اسید همراه با تنش شوری) و AaS (تیمار ۲ میلی‌مولار استیک اسید همراه با تنش شوری)، حروف یکسان عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

همچنین بررسی میزان بیان ژن ACS نشان داد که در شرایط تنش شوری میزان بیان آن کاهش‌یافته است (شکل ۲). از سوی دیگر بیشترین میزان بیان ژن در تیمار ۲ میلی‌مولار استیک اسید در هر دو شرایط بدون و با تنش شوری مشاهده شد.



شکل ۲. نمودار الگوی بیان نسبی ژن‌های ALDH3I1، ALDH7B4، ALDH2B7، OLP در برگ گیاه توت‌فرنگی. تیمارها شامل: S (تنش شوری ۴۰ میلی‌مولار کلرید سدیم)، AA (تیمار استیک اسید یک میلی‌مولار در شرایط بدون تنش شوری)، AAS (تیمار یک میلی‌مولار استیک اسید همراه با تنش شوری)، Aa (تیمار ۲ میلی‌مولار استیک اسید همراه با تنش شوری) و AaS (تیمار ۲ میلی‌مولار استیک اسید همراه با تنش شوری)، حروف یکسان عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

منابع

Balbi, V., Devoto, A. 2008. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. New Phytologist, 177(2):301-318.

Earley, K. W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A. T., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pikaard, C. S. 2010. Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. Genes & Development, 24(11):1119-1132.

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

Kazan, K. 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. Trends in Plant Science, 20(4):219-229.

Kim, J.M., To, T.K., Matsui, A., Tanoi, K., Kobayashi, N.I., Matsuda, F., Bashir, K. 2017. Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. Nature Plants, 3(7):17097.

Kotchoni, S. O., Kuhns, C., Ditzer, A., Kirch, H. H., Bartels, D. 2006. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. Plant, Cell & Environment, 29(6):1033-1048.

Luo, M., Yu, C. W., Chen, F. F., Zhao, L., Tian, G., Liu, X., Wu, K. 2012. Histone deacetylase HDA6 is functionally associated with AS1 in repression of KNOX genes in Arabidopsis. PLoS Genetics, 8(12).

Zhao, J., Missihoun, T. D., Bartels, D. 2017. The role of Arabidopsis aldehyde dehydrogenase genes in response to high temperature and stress combinations. Journal of experimental botany, 68(15):4295-4308.

Improving salinity stress tolerance in strawberries using acetic acid and affecting ALDH gene family and ACS gene

Zahra Mirfattahi[1], Saeid Eshghi*[2], Mohammad Etemadi[3], Ali Gharaghani[4], and Ali Moghadam[5]

1Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

2 Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

3 Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

4 Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

5Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran

*Author for correspondence: eshghi@shirazu.ac.ir; Tell/Fax: +98(71)32286133

Abstract

Strawberries are one of the most sensitive crops and due to the salinization of agricultural lands and the decrease in the quality of irrigation water in recent years, the production of this product has been difficult. Acetate is one of the known chemicals that can reduce the damage caused by stresses, especially salinity. The aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family, a large gene family, has been able to respond to environmental stresses. The aim of this study was to investigate the expression of ALDH gene family and ACS gene under salinity stress (40 mM sodium chloride) using acetic acid in two concentrations (1 and 2 mM) under hydroponic culture. The results showed that the ALDH, ALDH7B4 and ALDH3I1 gene families were strongly affected by salinity and acetic acid stress. The highest level of gene expression was observed in 1 mM acetic acid treatment under salinity stress. Also, under salinity stress, the highest expression of ACS gene was observed in 2 mM acetic acid treatment compared to other treatments. In fact, the results showed that among the members of the ALDH gene family, the ALDH3I1 gene has the most role in creating salinity stress tolerance due to the use of acetic acid, and this result can be used as a solution to increase salinity stress tolerance in plants in programs. Breeding and gene transfer to be used.

Keywords: Acetate; Aldehyde dehydrogenase; Acetyl CoA; Salinity stress