Crop Biotech.
Winter (2017) 20: 55-63.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره بیستم، زمستان ۱۳۹۶ (۶۳-۵۵)

بررسی نیمه‌کمی بیان ژن بتائین‌آلدئید دهیدروژناز در گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* cv. Agria) تحت تنش شوری

ژیلا محمدی[۱]، علیرضا مطلبی‌آذر[۲]، فریبرز زارع‌نهندی[۲]، علیرضا تاری‌نژاد[۳] و غلامرضا گوهری[٤*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲. دانشیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
٤. استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۹/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/۱۲/۲۳)

Semi quantitative analysis of betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in potato plant under salinity stress

Zhila Mohammadi[1], Alireza Motallebi-Azar[2], Fariborz Zaree-Nahandi[3], Alireza Tarinejad[2], Gholamreza Gohari[3*]

1. Former M.Sc. Student of Horticulture, Department of Horticulture, Faculty Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
(Received: Dec. 10, 2017 - Accepted: Mar. 14, 2018)

Abstract

The present study was aimed to investigate of nitric oxide effect on betaine aldehyde dehydrogenase gene expression and glycine betaine synthesis in *Solanum tuberosum* cv. Agria under salinity stress on in vitro condition. The experiment treatments included four level of sodium nitroprussideas a nitric oxide donor (0, 10^{-3}, 10^{-4} and 10^{-5}mM) and two level of sodium chloride (0 and 70 mM). In the present study, MS media culture was used and sodium nitroprusside was applied for increasing the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression (the responsible gene of glycine betaine synthesis) under salinity stress. Four weeks after treatment, total RNA of treated explants was extracted and semi quantitative RT-PCR was used for the analysis of expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene. The glycinbetaine content was measured with iodide potassium. The survey of betaine aldehyde dehydrogenase gene expression showed that the expression of this gene was increased under salinity stress however, the sodium nitroprusssid decreased its expression under salinity stress. Also sodium nitroprussid increased the glycine betaine content in grown plantlets which were grown under normal condition however under salinity stress this compound showed negative effect on glycinbetaine content.

Keywords: salinity stress, gene expression, betaine aldehyde dehydrogenase, sodium nitroprussideas, *Solanum tuberosum*.

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی نقش نیتریک‌اکسید بر میزان بیان ژن بتائین آلدئیددهیدروژناز و سنتز گلایسین‌بتائین در سیب‌زمینی رقم آگریا تحت تنش شوری در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل چهار سطح سدیم‌نیترو پروساید به عنوان دهنده نیتریک‌اکسید (۰، $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-٤}$ و $۱۰^{-٥}$ میلی‌مولار) و دو سطح سدیم‌کلرید (۰ و ۷۰ میلی‌مولار) بود. در این تحقیق از محیط کشت MS استفاده گردید و پس از اعمال تنش شوری از سدیم‌نیترو پروساید جهت تیمار ریزنمونه‌ها به منظور افزایش احتمالی بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز (ژن مسئول سنتز گلایسین‌بتائین) استفاده شد. چهار هفته بعد از اعمال تیمار، RNA کل از بافت‌های نمونه‌های تیمار شده استخراج شد و به منظور ارزیابی نسبی بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز از روش RT-PCR نیمه‌کمی استفاده گردید. بررسی بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز نشان داد که میزان بیان این ژن در گیاهچه‌های تحت تنش شوری افزایش داشته، در حالی‌که تیمار سدیم‌نیترو پروساید در شرایط تنش شوری میزان بیان آن را کاهش داد. همچنین میزان گلایسین‌بتائین در بافت‌های نمونه‌های گیاهی رشد یافته در شرایط معمولی با به کار بردن سدیم‌نیترو پروساید افزایش نشان داد، درحالی‌که سدیم‌نیتروپروساید تأثیر منفی روی محتوای گلایسین‌بتائین گیاهچه‌ها تحت شرایط تنش شوری داشته است.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، بیان ژن، بتائین آلدئید دهیدروژناز، سدیم‌نیتروپروساید، سیب‌زمینی.

* نویسنده مسئول: غلامرضا گوهری
E-mail: gholamreza.gohari@gmail.com

مقدمه

تنش شوری از تنش‌های مهم محیطی می‌باشد که بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با ایجاد تنش اکسیداتیو موجب کاهش شدید رشد می‌شود. توانایی گیاهان برای سازش به تنش-های محیطی به نوع تنش، شدت و مدت آن، گونه گیاهی و مرحله رشد گیاهی بستگی دارد (Yordanov *et al.*, 2000). ساز و کار تحمل به شوری هنوز به طور کامل شناخته نشده است و تلاش برای بهبود عملکرد در شرایط تنش شوری به دلیل منشاء چند ژنی پاسخ‌های سازگاری تا حد زیادی ناموفق بوده است. گیاهان مکانیزم‌های ویژه‌ای دارند تا بتوانند در محیط‌های شور نیز رشد نمایند. یکی از این مکانیزم‌ها تعدیل وضعیت اسموتیکی سلول از طریق سنتز ترکیبات اسمولیتی می‌باشد. این ترکیبات اثر بازدارنده بر واکنش‌های متابولیکی طبیعی سلول‌های گیاهی ندارند و شامل قندها و متابولیت‌هایی همانند گلایسین‌بتائین و پرولین می‌باشند. انباشت اسمولیت‌ها تعدیل اسموتیکی را تسهیل می‌کند و باعث پایین آمدن پتانسیل آب درون سلولی می‌شود و از هدر رفت آب درون سلولی ممانعت می‌کند (Sunkar *et al.*, 2007).

گلایسین‌بتائین یک ترکیب محافظت‌کننده اسمزی و آمینو اسید تعدیل‌کننده تنش‌های غیر زیستی می‌باشد. این ترکیب در گیاهانی که در معرض خاک‌های شور قرار گرفته‌اند، از طریق حفاظت سلول‌های گیاهی در برابر تنش شوری به‌وسیله تعدیل اسمزی، پایداری پروتئین آنزیم روبیسکو، حفظ ساختار پروتئین‌های موجود در دیواره سلولی، افزایش رونوشت‌برداری ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های از بین برنده گونه‌های بازفعال اکسیژن و جلوگیری از تجمع آن‌ها و در نتیجه حفاظت مکانیزم‌های فتوسنتزی در برابر تنش‌های غیرزیستی اثرگذار می‌باشد (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006; Wani *et al.*, 2013). در لاین-های زیادی از گیاهان تراریخت افزایش میزان بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز همراه با توانایی بالای انباشته‌سازی گلایسین‌بتائین بوده است که مقاومت قابل توجه این گیاهان در برابر انواع متفاوت تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است. فعالیت فزاینده BADH و انباشته سازی گلایسین‌بتائین در لاین‌های گیاهی تراریخت تحت شرایط عادی و تنش‌زا منجر به حفاظت گیاه در برابر خسارت اکسیداتیو از طریق نگهداری قابلیت انعطاف‌پذیری غشا، افزایش فعالیت فتوسنتزی و کاهش تولید گونه‌های بازفعال اکسیژن به‌وسیله افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌گردد (Rhodes & Hanson, 1993; Sakumoto & Murata, 2000; Chen & Murata, 2002). افزایش بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز در گیاهان تراریخته تنباکو (Hasthanasombut *et al.*, 2010)، یونجه (Liu *et al.*, 2011) و سیب‌زمینی شیرین (Fan *et al.*, 2012) گزارش شده است. این نتایج راهکارهای امیدبخشی را برای توسعه محصولات گیاهی مقاوم به شوری نوید می‌دهد. پیشرفت در این زمینه بسیار سریع بوده است، اما هنوز نیازمند انجام بررسی‌ها و ارزیابی‌های جدید می‌باشد.

در دهه‌های اخیر اثر تعدیل‌کننده‌های مهم از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای القای افزایش مقاومت و کاهش آسیب‌های ناشی از تنش شوری در گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است (Ghoulam *et al.*, 2002; Eqbal *et al.*, 2012). سدیم‌نیتروپروساید (SNP)[1]، یک ترکیب رهاکننده نیتریک‌اکسید (NO)[2] است که به عنوان تنظیم‌کننده رشد در گیاهان، در پژوهش‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. نیتریک‌اکسید به عنوان یک مولکول پیام‌رسان باعث تغییر در بیان برخی ژن‌های دفاعی از جمله افزایش ژن‌های مسئول سنتز آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدان در گیاه شده و مقاومت گیاه را افزایش می‌دهد (Lamattina *et al.*, 2003).

سیب‌زمینی به عنوان یک محصول بسیار مهم غذایی، نقش مهمی در حل بحران غذا و رفع سوء

1. Sodium nitroprusside (SNP)

2. Nitric oxide (NO)

تغذیه ایفا می‌کند که در حال حاضر کاهش کمّی و کیفی عملکرد سیب‌زمینی در شرایط تنش شوری به اثبات رسیده است (Zaman *et al.*, 2015; Bunding *et al.*, 2017). به نظر می‌رسد افزایش بیوسنتز گلایسین‌بتائین در سیب‌زمینی یک روش مؤثر برای بهبود مقاومت این گیاه به تنش‌های غیر زیستی از جمله شوری باشد (Chen & Murata, 2011). بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر سدیم‌نیتروپروساید بر میزان سنتز گلایسین‌بتائین و افزایش بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز تحت تنش شوری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه‌های کشت بافت گیاهی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. در این آزمایش از ریزنمونه‌های حاصل از کشت قطعات تک جوانه‌ای ساقه سیب‌زمینی رقم آگریا استفاده شد.

تهیه محیط کشت و اعمال تیمار

در این تحقیق از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) با نصف غلظت عناصر ماکرو و میکرو همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید جهت پر آوری ریزنمونه‌های سیب‌زمینی و اعمال تیمارهای مورد بررسی استفاده گردید. در تهیه محیط کشت از ۱ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۰/۱ گرم در لیتر آهن سکوسترون (FeEDDHA) استفاده شد، ویتامین‌های نیکوتنیک اسید، تیامین و پیرودوکسین به‌ترتیب با غلظت ۵، ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت اضافه گردید. تیمارهای مورد بررسی شامل چهار سطح سدیم‌نیتروپروساید (۰، $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۵}$ میلی‌مولار) و دو سطح شوری (۰ و ۷۰ میلی‌مولار) با استفاده از کلرید سدیم بود. این تیمارها به محیط کشت اضافه گردیدند. نمونه‌های کشت شده به ژرمیناتور تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند.

استخراج RNA

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

طراحی آغازگر

از دو آغازگر اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی و ژن

1. Complementary DNA

2. CinnaGen RNX-Plus Solution Cat. No. #RN7713C

اختصاصی BADH استفاده گردید. آغازگرهای مخصوص BADH مورد استفاده به کمک نرم‌افزار Gene Runner (Ver. 6.5.48) و بر اساس cDNA آنزیم BDAH سیب‌زمینی طراحی شدند. به این منظور توالی‌های مورد نیاز از پایگاه اطلاعاتی Genebank به دست آمد و با مقایسه دو انتهای '۳ و '۵ ژن، نواحی با بالاترین شباهت به‌عنوان آغازگرهای پیشرو و معکوس انتخاب شدند. آغازگرها طبق دستورالعمل شرکت سازنده با مقدار معینی آب دیونیزه استریل مخلوط شدند تا یک محلول ذخیره غلیظ با غلظت ۱۰۰ پیکومول به دست آید. برای انجام PCR، از محلول ذخیره، محلولی با غلظت ۲۰ پیکومول تهیه شد (جدول ۱).

ساخت cDNA و واکنش رونویسی معکوس

واکنش رونویسی معکوس (RT)[1]با استفاده از آنزیم M-MuLV[2]شرکت فرمنتاز آلمان و در یک میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتری استریل و عاری از RNase انجام شد. ۹ میکرولیتر از RNA استخراج شده به میکروتیوب منتقل و ۱ میکرولیتر آغازگر Oligo dT به آن اضافه شد و توسط آب استریل به حجم ۱۲ میکرولیتر رسید. پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه و ۷۵۰۰ دور، در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن بلافاصله میکروتیوب داخل ظرف حاوی یخ منتقل شد. این عمل مانع از تشکیل ساختارهای ثانویه در RNA می‌گردد. سپس به این RNA واسرشت‌شده ۴ میکرولیتر بافر آنزیم (۵X)، ۲ میکرولیتر dNTP (۹۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase[3]و یک میکرولیتر آنزیم M-MuLV اضافه شد تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر برسد. سپس میکروتیوب‌های حاصل ابتدا ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت میکروتیوب‌ها ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا آنزیم با حرارت دادن در این دما غیر فعال گردد.

بررسی RT-PCR نیمه‌کمی

در این پژوهش از روش RT-PCR نیمه‌کمی به منظور ارزیابی نیمه‌کمی رونوشت‌برداری ژن BADH استفاده شد. واکنش PCR برای ژن‌های BADH و اکتین موجود در cDNA تیمارهای مختلف با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BADH و ژن کنترل داخلی اکتین انجام شد.

تکثیر قطعات ژنی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در ترمال سایکلر PCR مدل T100 کمپانی بایورد (BIO-RAD) آمریکا صورت گرفت. برای انجام واکنش PCR به یک میکروتیوب استریل، ۱۰میکرولیتر Mix PCR Master، ۵ میکرولیتر cDNA و یک میکرولیتراز هر کدام از آغازگرها اضافه شد. سپس با آب استریل حجم نهایی مخلوط به ۲۰ میکرولیتر رسید. میکروتیوب سریعاً در دستگاه ترمال سایکلر گذاشته شد. برنامه زمانی و چرخه دمایی شامل پنج دقیقه نگهداری در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه نگهداری در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۶ ثانیه نگهداری در دمای اتصال مربوط به هرجفت آغازگر (دمای اتصال برای ژن BADH ۶۶ درجه سانتی‌گراد و برای ژن اکتین ۶۴ درجه سانتی‌گراد بود)، یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس پنج دقیقه نگهداری در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. این برنامه‌ها با تعداد ۳۰ چرخه راه‌اندازی شد.

1. Reverse Transcriptase (RT)
2. Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase enzyme (M-MuLV RT)
3. Fermentas RiboLock TMRNase Inhibitor Cat. No. #E00381

جدول ۱. توالی آغازگرهای BADH و اکتین مورد استفاده در تکثیر قطعات

نام آغازگر	توالی ´۳-´۵	دمای ذوب (Tm)	طول نوکلئوتیدی
BADH Forward	ATGGCAATTCCTAATATAC	42.5	19
BADH Reverse	TCACAGCTTTGAAGGAGA	45.7	18
Actin Forward	GAGGACAGGATGCTCCTCAG	62.5	20
Actin Reverse	AGACGCCTATGTGGGAGATG	60.5	20

در مرحله نهایی محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. پس از تأیید تکثیر قطعات ژنی توسط الکتروفورز، عکس‌های گرفته شده از ژل توسط دستگاه سیستم تصویربرداری ژل مدل E-BOX-CX5 ساخت کمپانی Vilber فرانسه، در نرم‌افزار Image J نسخه 1.46r مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. باندهای حاصل از ژن BADH و Actin، با استفاده از میزان Gray value در نرم‌افزار Image J امتیازدهی شدند. تمامی لکه‌ها بر اساس میزان Gray value موجود در باند ژن Actin توسط نرم‌افزار استاندارد شد. به این صورت که نسبت میزان Gray value موجود در باند ژن BADH به میزان Gray value موجود در باند ژن Actin به دست آمد و نمودار اعداد حاصل در نرم‌افزار اکسل رسم گردید.

این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار با چهار ریز نمونه اجرا شد. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمال ۵ درصدتوسط نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

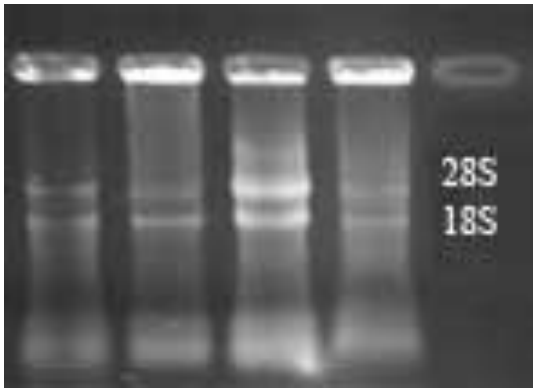
استخراج RNA

نمونه‌های RNA استخراج‌شده به روش اسپکتروفتومتری (۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد تا کیفیت و آلودگی RNA مشخص گردد. نتایج حاکی از آن بود که RNA استخراجی می‌تواند با اطمینان بالا در مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گیرد. شکل ۱ باندهای مربوط به RNA ریبوزومی ۲۸S و ۱۸S را نشان می‌دهد.

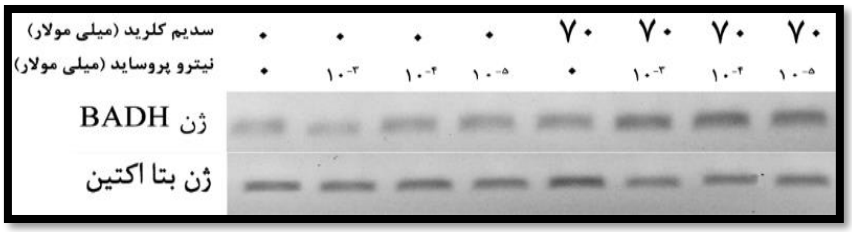
نیمه‌کمی کردن نتایج به دست آمده از RT-PCR

برای بررسی بیان ژن BADH در تیمارهای مختلف، جهت نیمه‌کمی کردن نتایج، از ژن Actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. به این ترتیب هم‌زمان با انجام واکنش PCR برای ژن BADH موجود در cDNA تیمارهای مختلف، واکنش PCR برای ژن Actin موجود در cDNA این تیمارها نیز انجام شد و در ژل آگارز بارگذاری گردید. شکل ۲ باندهای مربوط به بیان ژن BADH و Actin را نشان می‌دهد.

ژن اکتین به عنوان یکی از ژن‌های خانه‌دار در هر شرایطی بیان می‌گردد. لذا نتایج حاصل از بیان ژن مورد نظر می‌تواند با نتایج حاصل از بیان ژن خانه‌دار مورد مقایسه قرار گیرد و در این حالت خطاهای ناشی از اپراتور و محیط کاهش می‌یابد. از تجزیه و تحلیل تصاویر باندهای حاصل با استفاده از نرم‌افزار Image J، نسبت تراکم باند ژن BADH به میزان تراکم باند ژن Actin محاسبه گردید (جدول۲).



شکل ۱. اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی ۲۸S و ۱۸ S استخراج شده از گیاه سیب‌زمینی



شکل ۲. الکتروفورز محصول RT-PCR ژن‌های BADH و اکتین گیاه سیب‌زمینی تحت تیمارهای مختلف سدیم‌کلرید و سدیم‌نیترو پروساید. ژن Actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شدکه جهت مقایسه با میزان بیان ژن BADH استفاده گردید.

جدول ۲. تجزیه و تحلیل تصاویر باندهای حاصل از بیان ژن‌های BADH و Actin گیاه سیب‌زمینی توسط نرم‌افزار Image J

	نام تیمار							
	سدیم‌کلرید (میلی‌مولار)	سدیم‌نیترو پروساید (میلی‌مولار)	Max	Min	Mode	StdDev	Mean	BADH/Actin
ژن BADH	0	0	215	152	183	10.288	181.588	1.115
	0	10^{-3}	214	47	182	9.857	187.32	1.237
	0	10^{-4}	203	146	165	10.104	171.819	1.132
	0	10^{-5}	204	67	165	10.487	168.488	1.156
	70	0	207	127	155	13.001	166.1	1.293
	70	10^{-3}	189	73	132	15.534	140.683	0.962
	70	10^{-4}	195	107	121	19.198	144.329	1.020
	70	10^{-5}	189	107	121	18.533	142.594	0.989
ژن Actin	0	0	212	111	133	27.488	162.8	
	0	10^{-3}	197	112	132	20.425	151.462	
	0	10^{-4}	201	98	125	26.103	151.755	
	0	10^{-5}	194	110	120	21.099	145.756	
	70	0	190	85	99	25.186	128.482	
	70	10^{-3}	185	113	134	16.423	146.241	
	70	10^{-4}	187	107	120	18.249	141.484	
	70	10^{-5}	192	108	120	19.597	144.244	

بررسی چشمی تصاویر حاصل از الکتروفورز محصول RT-PCR ژن هایBADH و اکتین گیاه سیب‌زمینی نشان داد که میزان بیان ژن BADH در تیمارهای ۷۰ میلی‌مولار سدیم‌کلرید نسبت به میزان بیان ژن BADH در تیمارهای فاقد سدیم‌کلرید بیشتر بود و سطح بیان ژن اکتین به میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در نمونه‌های گیاهی شاهد مشاهده شد. در شرایط بدون تنش شوری بیشترین میزان بیان ژن BADH به‌ترتیب در تیمارهای $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$ و صفر میلی‌مولار سدیم‌نیترو پروساید بود. تحت تنش شوری (۷۰ میلی‌مولار سدیم‌کلرید) بیشترین میزان بیان ژن BADH به ترتیب در تیمارهای صفر، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۳}$ میلی‌مولار سدیم‌نیترو پروساید بود. به‌طور کلی بیشترین میزان بیان ژن BADH، در تیمار ۷۰ میلی‌مولار سدیم‌کلرید بدون کاربرد سدیم‌نیتروپروساید بوده است و کمترین میزان بیان ژن BADH در غلظت ۷۰ میلی‌مولار سدیم‌کلرید همراه با غلظت $۱۰^{-۳}$ میلی مولار سدیم‌نیترو پروساید مشاهده شد. چنین به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت سدیم‌نیترو پروساید میزان تحمل گیاهچه‌های سیب‌زمینی به تنش شوری بیشتر می‌شود.

یکی از انواع مکانیسم‌ها که به‌طور گسترده در گیاهان در مواجهه با تنش‌های غیرزیستی روی می‌دهد تجمع مولکول‌های پیام‌رسان مانند نیتریک‌اکسید و اسمولیت‌هایی مانند گلایسین‌بتائین است. گلایسین‌بتائین در گیاهان از طریق دو مرحله

اکسیداسیون کولین سنتز می‌شود: در مرحله اول آنزیم کولین مونو اکسیژناز آن را به بتائین آلدئید تبدیل می‌کند و در مرحله دوم بتائین آلدئید توسط آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز، فرآورده نهایی را که همان گلایسین‌بتائین است، تولید می‌کند. اخیراً محققان زیادی تجمع گلایسین‌بتائین و بیان ژن BADH را در واکنش به شوری، خشکی و سرما را گزارش کرده‌اند (Zhang *et al.*, 2012). کاربرد خارجی ترکیبات آزادکننده نیتریک‌اکسید مانند سدیم‌نیترو پروساید دارای پتانسیل القاء مقاومت در گیاهان در برابر تنش‌های مختلف را دارد. نیتریک‌اکسید تنها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی که به عنوان یک ویژگی حیاتی محسوب می‌شود نیست بلکه تحت شرایط تنش در متابولیسم برخی از اسمولایت‌ها از جمله پرولین به عنوان یک مولکول علامت‌رسان عمل می‌کند (Santisree *et al.*, 2015). تجمع گلایسین‌بتائین به‌عنوان یک اسمولایت آلی مهم در انواع متفاوت گونه‌های گیاهی در واکنش به تنش‌های مختلف گزارش شده است، همچنینافزایش فعالیت آنزیم‌های سنتزکننده گلایسین‌بتائین در گیاهان مختلف از جمله بتائین آلدئید دهیدروژناز تحت شرایط تنش شوری گزارش شده است (Wang *et al.*, 2003; Wimberg *et al.*, 1984). در پژوهش حاضر تیمار سدیم‌نیترو پروساید باعث افزایش بیان ژن BADH در بافت‌های گیاهی تحت شرایط بدون تنش گردید ولی کاربرد سدیم‌نیتروپروساید اثر منفی بر میزان بیان ژن BADH تحت شرایط تنش داشت. اثر مثبت تیمار سدیم‌نیترو پروساید در افزایش میزان گلایسین‌بتائین گیاهان ذرت تحت تنش خشکی توسط Zahang *et al.* (2012) گزارش شده است ولی تاکنون نتیجه قطعی از ارتباط بین سدیم‌نیتروپروساید و سنتز گلایسین‌بتائین به‌دست نیامده است. تأثیر منفی تیمار سدیم‌نیتروپروساید روی بیان ژن PIP که یک ژن تعدیل کننده تنش می‌باشد در سه گونه از مرکبات توسط Gholivandan *et al.* (2015) گزارش شده است. بر اساس نتایج حاصله می‌توان چنین استنباط کرد که با اعمال تیمار سدیم‌نیترو پروساید گیاهان سیب‌زمینی تحت تنش شوری تا حدودی از شرایط تنش خارج شده و تظاهر ژن BADH را کاهش یافته است.

به‌طور کلی بیشترین میزان بیان ژن BADH، در تیمار ۷۰ میلی‌مولار سدیم‌کلرید بدون کاربرد سدیم‌نیترو پروساید بوده است و کمترین میزان بیان ژن BADH در غلظت ۷۰ میلی‌مولار سدیم‌کلرید همراه با غلظت $^{-3}$ ۱۰ میلی مولار سدیم‌نیترو پروساید مشاهده شد. در پژوهش حاضر تیمار سدیم‌نیترو پروساید باعث افزایش بیان ژن BADH در بافت‌های گیاهی تحت شرایط بدون تنش گردید ولی کاربرد سدیم‌نیترو پروساید اثر منفی بر میزان بیان ژن BADH تحت شرایط تنش داشت. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، سدیم‌نیترو پروساید باعث کاهش اثرات منفی تنش شوری در رقم آگریا سیب‌زمینی شد لذا چنین به نظر می‌رسد که کاربرد این ماده در مناطقی که شوری عامل تهدید کننده است می‌تواند با کاهش اثرات زیان‌بار شوری به افزایش تولید و بهره‌وری اقتصادی کشاورزان کمک نماید.

REFERENCES

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

Chen TH, Murata N (2011) Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. Plant. Cell. Environ. 34: 1-20.

Chen THH, Murata N (2002)

Enhancement of tolerance to abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Curr. Opin. Plant. Biol. 5: 250-257.

Cromwell BT, Rennie SD (1953) The biosynthesis and metabolism of betaines in plants. The estimation and distribution of glycinebetaine (betaine) in *Beta vulgaris* L. and other plants. Biochem. J. 55: 189-192.

Fan W, Zhang M, Zhang H, Zhang P (2012) Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase. Plos One. 7: 37344.

Gholivandan E, Dadpoorm MR, Movafeghi A, Zaree Nahandi F, Zare Haghi D, Kosari-Nasab M (2015) Identification and cloning of PIP1 gene in carrizo citrange (*Citrus sinensis* × *Citrus trifoliate*). J. Biodivers. Environ. Sci.7: 16-22.

Ghoulam C, Foursy A, Fares K (2002) Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. Environ. Exp. Bot. 47: 39-50.

Grieve CM, Grattan SR (1983) Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant. Soil. 70: 303-307.

Hanson AD, May A, Grumet, MR, Bode J, Jamieson GC, Rhods D (2007) Betaine synthesis in chenopods: Localization in chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3678-3682.

Hasthanasombut S, Valentine N, Supaibulwatana K, Mii M, Nakamura I (2010) Expression of Indica rice OsBADH1 gene under salinity stress in transgenic tobacco. Plant. Biotechnol. Rep. 4: 75-83.

Iqbal N, Masood A, Khan NA (2012) Phytohormones in salinity tolerance: ethylene and gibberellins cross talk. In: Khan NA, Nazar R, Iqbal N, Anjum NA (eds.) Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants. Berlin, Germany, Springer.

Jamali B, Eshghi S, Kholdebarin B (2014) Response of strawberry ‘Selva’ plants on foliar application of sodium nitroprusside (nitric oxide donor) under saline conditions. J. Hort. Res. 22(2): 139-150.

Khan MA, Ungar IA, Showalters AM (2000) The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.). Forssk. J. Arid Environ. 45: 73-84.

Lamattina L, Garcia-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. Ann. Rev. Plant. Biol. 54: 109-136.

Lei Y, Yin C, Ren J, Li C (2007) Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. Biol. Plant. 51(2): 386-390.

Liu ZH, Zhang HM, Li GL, Guo XL, Chen SY, Liu GB, Zhang, YM (2011) Enhancement of salt tolerance in alfalfa transformed with the gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase. Euphytica. 178: 363-372.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bios assay with tobacco tissue culture. Plant. Physiol. 15: 473-497.

Rhodes D, Hanson AD (1993) Quaternary ammonium and tertiary *sulfonium* Compounds in higher-plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 44: 357-384.

Sakamoto A, Murata N (2000) Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. J. Exp. Bot. 51: 81-88.

Santisree P, Bhatnagar-Mathur P, Sharma KK (2015) NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: Do we have all the answers? Plant. Sci. 239: 44-55.

Storey R, Ahmad N, Wyn Jones RG (1977) Taxonomic and ecological aspects of the distribution of glycinebetaine and related compounds in plants. Oecologia. 27: 319-332.

Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. Trends. Plant. Sci. 12: 301-309.

Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta. 218: 1-14.

Wani SH, Sing NB, Haribhushan A, Mir JI (2013) Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance-role of glyssinebetaine. Curr. Genom. 14(3): 157-165.

Weimberg R, Lerner HR, Poljakoff-Mayber A (1984) Changes in growth and water soluble solute concentrations in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium. Plant. Physiol. 62: 472-480.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory network in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annu. Rev. Plant. Biol. 57: 781-803.

Yang X, Lu C (2005) Photosynthesis is improved by exogenous glycine betaine in salt-stressed maize plants. Plant. Physiol. 124: 343-352.

Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. Photosynthetica. 38: 171-186.

Zaman MS, Ali GM, Muhammad A, Farooq K, Hussain I (2015) In vitro screening of salt tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties Sarhad. J. Agric. 31 (2): 106-113.

Zhang LX, Zhao YN, Zhai YY, Zho M, Zhang XF, Wang K, Nan W, Lio J (2012) Effects exogenous nitric oxide on glycinebetain metabolism in maize (*Zea mays* L.) seedlings under drought stress. Pak. J. 44(6): 1837-1844.