

بررسی نیمه کمی بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز در گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* cv. Agria) تحت تنش شوری

ژیلا محمدی^۱، علیرضا مطلبی آذر^۲، فریبرز زارع نهندی^۳، علیرضا تارینه‌جادی^۴ و غلامرضا گوهری^{*}

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد 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.

۴. استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۲/۲۳)

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

Zhila Mohammadi¹, Alireza Motallebi-Azar², Fariborz Zaree-Nahandi³,
Alireza Tarinejad², 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 the effect of nitric oxide on betaine aldehyde dehydrogenase gene expression and glycine betaine synthesis in *Solanum tuberosum* cv. Agria under salinity stress in vitro condition. The experiment treatments included four levels of sodium nitroprusside as a nitric oxide donor (0, 10⁻³, 10⁻⁴ and 10⁻⁵ mM) and two levels 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 glycine betaine 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 nitroprusside decreased its expression under salinity stress. Also sodium nitroprusside increased the glycine betaine content in grown plantlets which were grown under normal condition however under salinity stress this compound showed negative effect on glycine betaine content.

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

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی نقش نیتریک‌اکسید بر میزان بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز و سنتز گلیسین‌بتائین در سیب‌زمینی رقم آگریا تحت تنش شوری در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل چهار سطح سدیم‌نیتروپروساید به عنوان دهنده نیتریک‌اکسید (۰، ۱۰^{-۳}، ۱۰^{-۴} و ۱۰^{-۵} 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 سدیم‌نیتروپروساید جهت تیمار ریزنمونه‌ها به منظور افزایش احتمالی بیان ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز (ژن مسئول سنتز گلیسین‌بتائین) 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 حالی که تیمار سدیم‌نیتروپروساید در شرایط تنش شوری میزان بیان آن را کاهش داد. همچنین میزان گلیسین‌بتائین در بافت‌های نمونه‌های گیاهی رشد یافته در شرایط معمولی با به کار بردن سدیم‌نیتروپروساید افزایش نشان داد، در حالی که سدیم‌نیتروپروساید تأثیر منفی روی محتوای گلیسین‌بتائین گیاهچه‌ها تحت شرایط تنش شوری داشته است.

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

مقدمه

تنش شوری از تنش‌های مهم محیطی می‌باشد که بسیاری از فرایندهای 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 گلايسين‌بتائين و پرولين 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).

گلايسين‌بتائين 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 رویسکو، 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 فنوسنتزی در برابر تنش‌های غیرزیستی اثرگذار می‌باشد (Yamaguchi-Shinozaki & Wani *et al.*, 2013; Shinozaki, 2006). در لاین - های زیادی از گیاهان تراریخت افزایش میزان بیان ژن

بتائین آلدئید دهیدروژناز همراه با توانایی بالای انباشته‌سازی گلايسين‌بتائين بوده است که مقاومت قابل توجه این گیاهان در برابر انواع متفاوت تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است. فعالیت فزاینده BADH و انباشته سازی گلايسين‌بتائين 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 فنوسنتزی 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 (Liu *et al.*, 2010; 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)، یک ترکیب رهاکننده نیتریک‌اکسید (NO) 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

کلرید سدیم بود. این تیمارها به محیط کشت اضافه گردیدند. نمونه‌های کشت شده به ژرمیناتور تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت 25 ± 2 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 نمونه‌های گیاهی درون هاون توسط ازت مایع پودر گردید و داخل میکروتیوپ‌ها انتقال داده شدند. یک میلی‌لیتر محلول RNX-Plus بسیار خنک به میکروتیوپ‌ها اضافه و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند، سپس ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردیدند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به هر یک از میکروتیوپ‌ها اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شده و مجدداً 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 و میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. کیفیت RNA استخراج شده به کمک تکنیک‌های اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز از لحاظ کیفیت و کمیّت تأیید شد.

طراحی آغازگر

از دو آغازگر اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی و ژن

تغذیه ایفا می‌کند که در حال حاضر کاهش کمی و کیفی عملکرد سیب‌زمینی در شرایط تنش شوری به اثبات رسیده است (Zaman *et al.*, 2015; Bunding *et al.*, 2017). به نظر می‌رسد افزایش بیوسنتز گلیسین‌بتائین 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 گلیسین‌بتائین 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 پرآوری 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 نیکوتینیک اسید، تیامین و پیرودوکسین به ترتیب با غلظت ۵، ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت اضافه گردید. تیمارهای مورد بررسی شامل چهار سطح سدیم‌نیتروپروساید (۰، 10^{-3} ، 10^{-4} و 10^{-5} میلی‌مولار) و دو سطح شوری (۰ و ۷۰ میلی‌مولار) با استفاده از

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 نیمه کمی

در این پژوهش از روش RT-PCR نیمه کمی به منظور ارزیابی نیمه کمی رونوشت برداری ژن BADH استفاده شد. واکنش PCR برای ژن‌های BADH و اکتین موجود در cDNA تیمارهای مختلف با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BADH و ژن کنترل داخلی اکتین 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، ۱۰ میکرولیتر Mix PCR Master، ۵ میکرولیتر cDNA و یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها اضافه شد. سپس با آب استریل حجم نهایی مخلوط به ۲۰ میکرولیتر رسید. میکروتیوب سریعاً در دستگاه ترمال سایکلر گذاشته شد. برنامه زمانی و چرخه دمایی شامل پنج دقیقه نگهداری در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه نگهداری در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۶ ثانیه نگهداری در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر (دمای اتصال برای ژن BADH 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.

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 به عنوان 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).

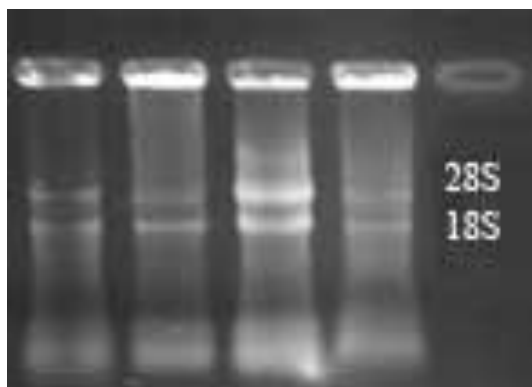
ساخت cDNA و واکنش رونویسی معکوس

واکنش رونویسی معکوس (RT) با استفاده از آنزیم M-MuLV 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 واسرشت شده ۴ میکرولیتر بافر آنزیم (۵X)، ۲ میکرولیتر dNTP (۹۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase^۳ 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

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

نام آغازگر	توالی ۵'-۳'	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

به RNA ریپوزومی ۲۸S و ۱۸S را نشان می‌دهد. نیمه کمی کردن نتایج به دست آمده از RT-PCR برای بررسی بیان ژن BADH در تیمارهای مختلف، جهت نیمه کمی 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 آغاز 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 (جدول ۲).



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

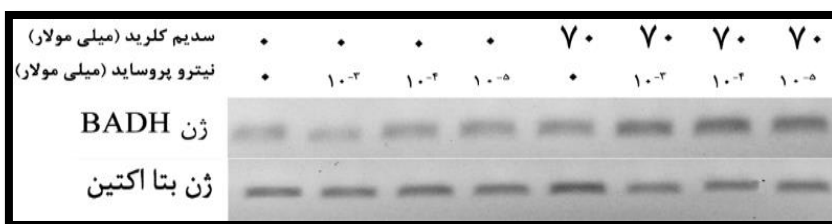
در مرحله نهایی محصول PCR در ژل آغاز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. پس از تأیید تکثیر قطعات ژنی توسط الکتروفورز، عکس‌های گرفته شده از ژل توسط دستگاه سیستم تصویربرداری ژل مدل E-BOX-CX5 ساخت کمپانی Vilber فرانسه، در نرم‌افزار Image J نسخه 1.46r مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. باندهای حاصل از ژن BADH و Actin، با 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 در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

استخراج RNA

نمونه‌های RNA استخراج شده به روش اسپکتروفوتومتری (۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) و الکتروفورز بر روی ژل آغاز 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



شکل ۲. الکتروفورز محصول RT-PCR ژن‌های BADH و اکتین گیاه سیب‌زمینی تحت تیمارهای مختلف سدیم کلرید و سدیم‌نیترو پروساید. ژن Actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شد که 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							
BADH/Actin	Mean	StdDev	Mode	Min	Max	سديم نيترو پروسايد (ميلي مولار)	سديم كلريد (ميلي مولار)
1.115	181.588	10.288	183	152	215	0	0
1.237	187.32	9.857	182	47	214	10 ⁻³	0
1.132	171.819	10.104	165	146	203	10 ⁻⁴	0
1.156	168.488	10.487	165	67	204	10 ⁻⁵	0
1.293	166.1	13.001	155	127	207	0	70
0.962	140.683	15.534	132	73	189	10 ⁻³	70
1.020	144.329	19.198	121	107	195	10 ⁻⁴	70
0.989	142.594	18.533	121	107	189	10 ⁻⁵	70
	162.8	27.488	133	111	212	0	0
	151.462	20.425	132	112	197	10 ⁻³	0
	151.755	26.103	125	98	201	10 ⁻⁴	0
	145.756	21.099	120	110	194	10 ⁻⁵	0
	128.482	25.186	99	85	190	0	70
	146.241	16.423	134	113	185	10 ⁻³	70
	141.484	18.249	120	107	187	10 ⁻⁴	70
	144.244	19.597	120	108	192	10 ⁻⁵	70

کلی بیشترین میزان بیان ژن BADH، در تیمار ۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید بدون کاربرد سدیم‌نیتروپروساید بوده است و کمترین میزان بیان ژن BADH در غلظت ۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید همراه با غلظت ۱۰^{-۳} 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 گلايسين بتائين است. گلايسين بتائين در گیاهان از طریق دو مرحله

بررسی چشمی تصاویر حاصل از الکتروفورز محصول RT-PCR ژن‌های BADH و اکتین گیاه سیب‌زمینی نشان داد که میزان بیان ژن BADH در تیمارهای ۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید نسبت به میزان بیان ژن BADH در تیمارهای فاقد سدیم کلرید 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 ۷۰ میلی‌مولار سدیم‌نیترو پروساید بود. تحت تنش شوری (۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید) بیشترین میزان بیان ژن BADH به ترتیب در تیمارهای صفر، ۱۰^{-۴}، ۱۰^{-۳} و ۱۰^{-۵} میلی‌مولار سدیم‌نیترو پروساید بود. به‌طور

گیاهان ذرت تحت تنش خشکی توسط Zahang *et al.* (2012) گزارش شده است ولی تاکنون نتیجه قطعی از ارتباط بین سدیم نیتروپروساید و سنتز گلیسین بتائین به دست نیامده است. تأثیر منفی تیمار سدیم نیتروپروساید روی بیان ژن PIP که یک ژن تعدیل کننده تنش می باشد در سه گونه از مرکبات توسط Gholivandan *et al.* (2015) گزارش شده است. بر اساس نتایج حاصله می توان چنین استنباط کرد که با اعمال تیمار سدیم نیترو پروساید گیاهان سیب زمینی تحت تنش شوری تا حدودی از شرایط تنش خارج شده و تظاهر ژن BADH را کاهش یافته است.

به طور کلی بیشترین میزان بیان ژن BADH در تیمار ۷۰ میلی مولار سدیم کلرید بدون کاربرد سدیم نیترو پروساید بوده است و کمترین میزان بیان ژن BADH در غلظت ۷۰ میلی مولار سدیم کلرید همراه با غلظت ۳- ۱۰ میلی مولار سدیم نیترو پروساید مشاهده شد. در پژوهش حاضر تیمار سدیم نیترو پروساید باعث افزایش بیان ژن BADH در بافت های گیاهی تحت شرایط بدون تنش گردید ولی کاربرد سدیم نیترو پروساید اثر منفی بر میزان بیان ژن BADH تحت شرایط تنش داشت. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، سدیم نیترو پروساید باعث کاهش اثرات منفی تنش شوری در رقم آگریا سیب زمینی شد لذا چنین به نظر می رسد که کاربرد این ماده در مناطقی که شوری عامل تهدید کننده است می تواند با کاهش اثرات زیان بار شوری به افزایش تولید و بهره وری اقتصادی کشاورزان کمک نماید.

اکسیداسیون کولین سنتز می شود: در مرحله اول آنزیم کولین مونو اکسیژناز آن را به بتائین آلدئید تبدیل می کند و در مرحله دوم بتائین آلدئید توسط آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز، فرآورده نهایی را که همان گلیسین بتائین است، تولید می کند. اخیراً محققان زیادی تجمع گلیسین بتائین و بیان ژن BADH را در واکنش به شوری، خشکی و سرما را گزارش کرده اند (Zhang *et al.*, 2012). کاربرد خارجی ترکیبات آزادکننده نیتریک اکسید مانند سدیم نیترو پروساید دارای پتانسیل القاء مقاومت در گیاهان در برابر تنش های مختلف را دارد. نیتریک اکسید تنها دارای خاصیت آنتی اکسیدانی که به عنوان یک ویژگی حیاتی محسوب می شود نیست بلکه تحت شرایط تنش در متابولیسم برخی از اسمولایت ها از جمله پرولین به عنوان یک مولکول علامت رسان عمل می کند (Santisree *et al.*, 2015). تجمع گلیسین بتائین به عنوان یک اسمولایت آلی مهم در انواع متفاوت گونه های گیاهی در واکنش به تنش های مختلف گزارش شده است، همچنین افزایش فعالیت آنزیم های سنتز کننده گلیسین بتائین 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 سدیم نیترو پروساید باعث افزایش بیان ژن BADH در بافت های گیاهی تحت شرایط بدون تنش گردید ولی کاربرد سدیم نیترو پروساید اثر منفی بر میزان بیان ژن BADH تحت شرایط تنش داشت. اثر مثبت تیمار سدیم نیترو پروساید در افزایش میزان گلیسین بتائین

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 trifoliata*). *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.
- Hashtanasombut 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.