ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحه ۵۷ - ۴۷

بررسی الگوی بیان ژن‌های انتخابی ABC transporter شناسایی شده در مراحل مختلف نموی استولون سیب‌زمینی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

Evaluation of the expression pattern of selected genes ABC transporter identified in different stages of potatoes stolen development in response to abiotic stresses

بهاره پورفرید[۱]، کریم سرخه*[۱]، پدرو مارتینز گومز[۲]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه اسپانیا، موریکا، اسپانیا

Pourfarid B[1], Sorkheh K[*1], Martinez-Gomez P[2]

1- MSc Student, Assistant Professor, Department of Production engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Professor, Department of Plant Breeding, Espinardo, Murcia, Spain

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: k.sorkheh@scu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸)

چکیده

سیستم انتقال ABC transporter در سه قلمرو اصلی پروکاریوت‌ها، یوکاریوت‌ها و قارچ‌ها یافت می‌شود. بیشتر آن‌ها واسطه جذب فعال یا انتشار مولکول‌های خاص در غشاهای زیستی هستند. باتوجه به این‌که تاکنون مطالعه جامعی در رابطه با الگوی بیانی ژن‌های ABC transporter صورت نگرفته است، از این رو الگوی بیان نسبی این دسته از ژن‌ها مبتنی بر عملکرد بیولوژیکی آن‌ها در مراحل نموی مختلف استولون سیب‌زمینی در شرایط کنترل (دمای گلخانه)، تنش گرما (۲۹ درجه سانتی‌گراد)، تنش سرما (دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) و تنش ABA (سه سطح ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) مورد مطالعه قرار گرفت. به‌منظور بررسی میزان تغییرات نسبی بیان ژن‌های StABC transporter در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی گرما، سرما، و ABA، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Real-time PCR) جهت ارزیابی بیان نسبی ژن‌های انتخابی استفاده شد. اثر تنش سرما بر روی میزان تغییرات نسبی بیان ژن‌های StABC transporter در مراحل مختلف نموی سیب‌زمینی نشان داد که ژن‌های StABC-012 و StABC-002 دارای افزایش بیان و ژن‌های StABC-001، StABC-024، StABC-002، StABC-124، StABC-138 در تنش گرما دارای سطح بیان بالا و در پاسخ به تنش ABA، تمامی ژن‌های StABC transporter در مراحل نموی مختلف دارای بیان کمتری نسبت به شرایط کنترل بودند. ژن‌های StABC-084 و StABC-138 در تیمار ABA ۵۰ میکرومولار در مرحله نموی اوّل و ژن‌های StABC-084، StABC-001 و StABC-124 در تیمار ۷۵ میکرومولار در مرحله نموی سوّم و StABC-024 در تیمار ۱۰۰ میکرومولار در مرحله نموی سوّم نسبت به سایر مراحل نموی دارای بیان بالایی بودند. همچنین، جهت اطمینان از اعمال اثر تنش‌های غیرزیستی به گیاه سیب‌زمینی، میزان پرولین و ABA در مراحل نموی مختلف استولون مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. با افزایش میزان تنش، میزان پرولین نیز در مراحل نموی مختلف نیز روند افزایشی داشت. در تنش گرما میزان پرولین مراحل نموی اوّل، دوّم و سوّم به‌ترتیب ٤١/٢٤، ٦٧/٢ و ٢١/٤٨ گرم در میلی‌گرم وزن تازه اختلاف معنی‌داری داشته است. همچنین، میزان پرولین در سطوح مختلف زمانی تنش سرما (دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) افزایش معنی‌داری را نشان داده به‌طوری که در مرحله نموی اوّل در سطح تیماری ٤٨ ساعت (٧٦/٩٢ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) بیشترین و مرحله نموی سوّم استولون در سطح تیماری ٤٨ ساعت (٤٤/٥٨ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) کمترین میزان پرولین را داشت. نتایج حاصل از سنجش ABA اختلاف معنی‌داری را با کنترل نشان می‌دهد؛ در غلظت۵۰ میکرومولار، این هورمون بیشترین افزایش را در مرحله نموی سوّم (۰/۰۰۷۷ppm) نشان داد. همچنین، با افزایش میزان غلظت هورمون به ۷۵ میکرومولار میزان ABA در مرحله نموی دوّم نسبت به شرایط کنترل به میزان ۰/۰۰۷۳ ppm افزایش قابل قبولی را نشان می‌دهد. هدف از این تحقیق بررسی تغییرات نسبی الگوی بیان ژن‌های ABC transporter در مراحل مختلف نموی استولون سیب‌زمینی در پاسخ به تنش‌های سرما، گرما و ABA می‌باشد. یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌تواند درک عملکرد خانواده ژنی ABCtransporter را بهبود بخشد و مطالعات بیشتردر مورد جزئیات مفصل عملکرد مولکولی و بیولوژیکی سیب‌زمینی را تسهیل نماید.

واژه‌های کلیدی

استولون
بیان ژن
پرولین
تنش‌های غیرزیستی
سیب‌زمینی
ABC transporter

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) متعلق به خانواده Solanaceae، محصول فصل سرد و نیازمند آب و هوای خشک می‌باشد. این گیاه آتوتتراپلوئید بوده و به‌صورت یک‌ساله به‌منظور تولید غده کشت می‌شود. در مقیاس جهانی سیب‌زمینی یکی از با ارزش‌ترین مواد غذایی محسوب می‌شود و از مهم‌ترین محصولاتی است که قسمت عمده‌ای از نیازهای غذایی بشر را تأمین می‌کند (Hassanpana et al. 2019).

در حال حاضر، کشور چین بزرگ‌ترین تولیدکننده سیب‌زمینی در جهان است و پس از آن به‌ترتیب هند، روسیه، اوکراین و آمریکا قرار گرفته‌اند. ایران از نظر میزان تولید سیب‌زمینی در میان کشورهای جهان در رتبهٔ دوازدهم و در میان کشورهای آسیایی پس از کشورهای چین و هند در رتبهٔ سوم قرار دارد (FAO 2013). ABCtransporter (ATP Binding Cassette)ها، یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های پروتئینی انتقال‌دهنده غشاست که در همه ارگانیسم‌ها وجود دارند. این خانواده ناقل به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته و اعضای آن در بسیاری از فرآیندهای سلولی، نقش حیاتی دارند (Hyde et al. 1990). در سال‌های اخیر، وقوع تنش‌های غیرزیستی در اثر تغییر اقلیم به‌عنوان یک چالش برای رشد و نمو گیاهان مطرح شده است (Bellard et al. 2012). گیاهان توانایی جابه‌جایی به مناطق مساعدتر را در شرایط تنش ندارند؛ به‌همین دلیل فرآیندهای رشد و نمو آن‌ها تحت تأثیر محیط قرار گرفته و ناگزیر باید با تغییرات محیطی سازگار شوند (Bindi and Olesen 2011; Pereira 2016). دما به‌عنوان عامل محیطی مهم بر فرآیندهای ساختاری و فیزیولوژیکی سلول‌های گیاهی و همچنین توسعه سلول‌های گیاهی مؤثر است، به‌طوری‌که اثرهای منفی افزایش یا کاهش غیرطبیعی دما می‌تواند در کلیه فرآیندهای گیاهی از جمله ساختار سلول‌های گیاهی ظاهر شود (GhasemiGolazaniand Lotfi 2015). تنش گرما یکی از مشکلات کشاورزی در دنیا محسوب می‌شود (Jha et al. 2015) که باعث کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی به‌دلیل گستردگی پاسخ گیاهان به تغییرات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شود (Zandalinas et al. 2018). به‌عنوان مثال، تنش گرما، سرما و تغییرات ناشی از وقوع تنش، در سطح سلولی و اندام‌ها بروز می‌کند که بازتاب آن در سطوح بالاتر اندام‌های گیاهی مشاهده می‌شود. سرما به‌عنوان یک تنش اسمزی، جذب آب از ریشه گیاه را محدود کرده، باعث افت پتانسیل آب شده و در نتیجه کم‌آبی شدیدی را به دنبال خواهد داشت که با بسته شدن روزنه‌ها و کاهش تعرق همراه می‌باشد (Thomashow 1999). یکی از اثرات مهم تنش‌های غیرزیستی به‌ویژه تنش سرما تجمع بالای ترکیبات سازگار بوده به‌طوری که این ترکیبات بدون تغییر pH در غلظت‌های بالا موجب حفظ فشاراسمزی و همچنین تثبیت ساختار پروتئین و غشاء شده که نقش مهمی در سازگاری سلول به تنش‌های مختلف دارند. پرولین یکی از مهم‌ترین این نوع ترکیبات می‌باشد که از دو مسیرگلوتامات و اورنیتین سنتز می‌شود و تحت شرایط تنش به مقدار زیادی سنتز آن افزایش می‌یابد (Alia and Saradhi 1991; Naidu and Thusitha 2005; Ashraf and Foolad 2007).

اسید آبسیزیک (ABA) به‌عنوان یک هورمون تنش مورد توجه قرار دارد (Zeevaart et al. 1988). این هورمون با تحریک بسته شدن روزنه‌ها، افت آب را کاهش داده و جذب آب توسط ریشه‌ها را افزایش می‌دهد. استفاده از ABA، تغییرات نموی را بهبود می‌بخشد و به گیاه کمک می‌کند تا تعدادی از تنش‌های محیطی را تحمل نماید. رشد ساقه، کاهش سطح برگ، تحریک گسترش ریشه، رشد ریشه جانبی و نمو تارهای کشنده ریشه از جمله این تغییرات نموی هستند. مشاهدات مربوط به تحریک بیوسنتز ABA تحت تنش محیطی و آزاد شدن آن از محل سنتز به محل فعالیت، نقش اسید آبسیزیک را به‌عنوان هورمون تنش در گیاهان نمایان می‌سازد (Naqvi 1999).

امروزه چندین شاخص تنش برای ارزیابی وضعیت فیزیولوژی گیاهان از قبیل پروتئین محلول برگ، پرولین، رنگدانه‌های فتوسنتزی، گلیاسین بتایین و محصولات متابولیکی حاصل از اکسید شدن معرفی شده است (Parida and Das 2005). پرولین یک صفت مهم برای اندازه‌گیری ظرفیت تنش در گیاهان است. در بسیاری از گیاهان تجمع پرولین آزاد در پاسخ به تحمیل طیف وسیعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (Ozturk et al. 2012). پرولین با حفظ فشار اسمزی، محافظت از آنزیم‌های

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

سیتوپلاسمی و حذف رادیکال‌های آزاد، مانع از آسیب به غشاء سلولی می‌شود (Kavi kishor et al. 2015). همچنین به‌عنوان یک اسمولیت سازگار در گیاهان عالی شناخته شده است. گزارش شده است که این محلول در غلظت‌های نسبتاً بالا برای ساختار و عملکرد ماکرومولکول‌های سیتوپلاسمی غیرسمی می‌باشد (Rhodes et al. 1993). از طرفی به‌عنوان منبعی از ترکیبات کربن و نیتروژن، نقش بسزایی در تأمین انرژی دارد و نیز در حفاظت از یکپارچگی غشای پلاسما در گیاهان تحت تنش‌های اسمزی ایفای نقش می‌کند (Mansour 1998; Mirza Masomzadeh et al. 2012).

پورفرید (2019) در ابتدا اقدام به شناسایی ABCTransporterهای سیب‌زمینی به روش بیوانفورماتیکی نموده است. علاوه برآن، با جستجو در پایگاه اطلاعاتی NCBI و غربالگری ژن‌های شناسایی شده، در نهایت ۲۲۸ ژن ABC transporter شناسایی شد. در مطالعه حاضر، به‌منظور بررسی میزان تغییرات نسبی بیان ژن‌های StABC transporter در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، از Real-time PCR استفاده شد. هدف از این تحقیق بررسی میزان الگوی بیان ژن‌های ABC transporter در مراحل مختلف نموی استولون سیب‌زمینی در پاسخ به تنش سرما، گرما و ABA می‌باشد. یافته‌های حاصل از این مطالعه، درک عملکرد خانواده ژنی ABC transporter را بهبود می‌بخشد و مطالعات بیشتر در مورد جزئیات مفصل عملکرد مولکولی و بیولوژیکی سیب‌زمینی را تسهیل می‌نماید.

مواد و روش‌ها

غده‌های سیب‌زمینی رقم مارفونا از مرکز تحقیقات همدان تهیه شد. پس از گذراندن یک‌ماه دوره خواب و آغاز جوانه‌زنی و ضدعفونی توسط قارچکش پنتاکلروبنزن، در گلخانه دانشگاه شهید چمران اهواز در دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد درون گلدان‌هایی با حجم مشخص (۵ کیلویی) کشت و تیمار شدند. در ابتدا کف گلدان‌ها را جهت ایجاد زهکش مناسب سوراخ نموده و در هر کدام مقدار کمی سنگ‌ریزه ریخته و سپس توسط مخلوطی از خاک گلدان و خاک مزرعه، گلدان‌های آزمایشی پر شدند. رشد غده‌ها در شرایط طبیعی و بدون تنش در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از رشد غده‌ها و استقرار گیاهچه‌های سیب‌زمینی در مراحل نموی مختلف (Kloosterman et al. 2005)، تنش‌های غیرزیستی سرما، گرما و ABA در سطوح مختلف تیماری مورد آزمایش اعمال شدند. سپس از مراحل نموی مختلف غده‌های سیب‌زمینی در شرایط کنترل و نیز بعد از اعمال تنش‌های مربوطه، نمونه‌برداری انجام پذیرفت. نمونه‌های مورد نظر درون نیتروژن مایع فریز شدند تا در مراحل بعدی مورد بررسی قرار گیرند. قبل از استخراج RNA خاک اطراف ریشه به‌خوبی به‌وسیله آب مقطر شسته شد و در نهایت توسط آب DEPC تیمار شدند تا در روند استخراج خللی وارد نشود (Pourfarid et al. 2021).

جهت اعمال تنش گرما، گلدان‌های مورد نظر تحت دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد (Lafta et al. 1995) در دستگاه ژرميناتور انتقال داده شدند و پس از دو هفته از رشد گیاهچه‌های سیب‌زمینی از مراحل نموی استولون طبق روش Kloosterman et al. (2005) نمونه‌برداری صورت پذیرفت. تنش سرما نیز، نمونه‌ها به مدت ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند و در انتهای تنش، نمونه‌برداری انجام گرفت (Bournay et al. 1996). جهت اعمال تنش ABA سطوح تیماری ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار با اسپری نمودن محلول اسید آبسیزیک بر روی برگ‌ها (Etehadnia et al. 2008) انجام شد و پس از دو هفته از رشد غده‌ها از مراحل مختلف نموی استولون (مرحله۲، ۳ و ٤؛ شکل ۱ الف، ب و ج) نمونه‌برداری شد. در شکل۱ نمونه‌هایی از اثر تنش‌های مورد مطالعه بر روی گیاه سیب‌زمینی نشان داده شده است. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار پیاده‌سازی شد.

پرولین آزاد به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی تمام تنش‌ها مطابق روش Bates (1973) در مراحل نموی مختلف سیب‌زمینی به شرح زیر اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم از نمونه‌های سیب‌زمینی در مراحل مختلف در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۳٪ ساییده و مخلوط همگن به‌دست آمده توسط کاغذ صافی صاف شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

شکل ۱- مراحل نموی مختلف استولون سیب‌زمینی الف و ب) (Pourfarid 2019)، ج) (Kloosterman et al. 2005) د) اثر تنش ABA بر روی گیاه سیب‌زمینی ر) اثر تنش گرما بر روی برگ‌های سیب‌زمینی ز) گیاه در حالت کنترل (Pourfarid 2019)

دو میلی‌لیتر از عصاره صاف شده با دو میلی‌گرم معرف ناین هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک گلایسال مخلوط و به مدت یک ساعت در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ٤ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط حاصل اضافه و لوله‌های آزمایش به‌خوبی تکان داده شدند. پس از ۲۰-۱۵ دقیقه دو لایه کاملاً مجزا در لوله‌های آزمایش تشکیل شد. جذب مقدار مشخصی از ماده رنگی تشکیل شده در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مورد سنجش قرار گرفت. نهایتاً، مقدار پرولین در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد تعیین و نتایج به‌دست آمده بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ محاسبه شد.

جهت حصول اطمینان از اعمال تنشABA، سنجش این هورمون در آزمایشگاه طبق روش Hubick et al. (1980) با اندک تغییرات، مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ۰/۵ گرم از بافت گیاهی را توزین کرده، درون هاون چینی ریخته و به‌خوبی ساییده می‌شود. سپس ۲۰ml از محلول (کلروفرم+متانول+آمونیاک) روی آن ریخته و مجدداً ساییده می‌شود. پس از تشکیل عصاره‌ای یکنواخت (هموژنیز شده) آن را درون فالکون ۵۰ml یا لوله آزمایش ریخته و ۲۵ml آب‌مقطر به نمونه‌ها اضافه شد. فاز کلروفرمی را توسط یک بورت و با قیف جداکننده از فاز آبی جدا نموده و به فاز آبی باقی‌مانده ۲۵ml اتیل استات اضافه شد (اتیل استات از آب سبک‌تر است و روی آب قرار می‌گیرد). قسمت‌های سبزرنگ نمونه که در زیر قرار گرفته بود توسط شیر بورت خارج شد و قسمت‌های بالایی که بیرنگ و حاوی اتیل استات است نگهداری شد (ممکن است ۲ یا ۳ مرتبه نیاز به ریختن اتیل استات و جداسازی باشد تا نمونه رنگ روشن‌تری پیدا کند). فاز اتیل استات توسط سود (NaOH) (۱ نرمال) و یا اسیدکلریدریک روی pH= ۲/۵ تنظیم شد. با این عصاره می‌توان اسید آبسزیک آزاد در عصاره را با طول موج ۲٦۳nm قرائت نمود.

RNA کل، با استفاده از کیت سنتز RNA بیوبیسیک (کانادا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سنتز cDNA از مولکول‌های RNA با استفاده از کیت Primescript RT reagent تاکارا محصول کشور ژاپن و با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای dT طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت.

از میان ۲۲۸ ژن شناسایی شده براساس الگوهای سه بعدی و عملکردهای بیولوژیکی آن‌ها در ارتباط با تنش‌های غیرزیستی Pourfarid et al. (2021)، ۱۰ ژن شامل ۸ جفت آغازگر اختصاصی ژن‌های ABC Transporter و دو جفت ژن به‌عنوان کنترل داخلی (*Elf* و*Seq3*) (جدول ۱) انتخاب و با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 طراحی و توسط شرکت بیوتکنولوژی پیشگام تهران سنتز شدند.

با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، رنگ سایبرگرین (SYBER Green I) و مسترمیکس شرکت تاکارا الگوی بیان ژن‌های ABC Transporter در پاسخ به تنش‌های گرما، سرما و

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

ABA طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده قرار گرفت. ژن *Elf* و *Sec3* به‌عنوان کنترل داخلی و جهت نرمال‌سازی داده‌های بیانی استفاده شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های مربوط به الگوی بیان ژن با استفاده از روش مقایسه‌ای $۲^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen and Livak 2008) تجزیه و تحلیل شدند. به‌منظور بررسی میزان تغییرات نسبی بیان ژن‌های ABC transporterst در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی از واکنش Real-time PCR جهت ارزیابی بیان نسبی ژن‌های انتخابی استفاده شد. بدین ترتیب، برای هر نمونه، میزان CT با استفاده از دو ژن اصلی مرجع (*Seq3* و *Elf*) با تعیین خط پایه معین و سپس با استفاده از روش $۲^{-\Delta\Delta CT}$، تغییرات نسبی بیان ژن‌ها برای هر مرحله نموی سیب‌زمینی تحت تیمارهای مختلف تنش توسط نرم‌افزار Excel مورد سنجش قرار گرفت. نقشه حرارتی بیان ژن‌های مورد مطالعه توسط نرم‌افزار HemI-windiws-1-0-win64bit ترسیم شد (Wankun et al. 2014). همچنین، داده‌های مربوط به شاخص‌های فیزیولوژیکی توسط نرم‌افزار SAS آنالیز شدند.

نتایج و بحث

ارزیابی معیارهای فیزیولوژیکی پرولین و ABA

میزان پرولین و ABA به‌عنوان معیاری جهت تأیید تنش‌های اعمال شده بر روی گیاهچه‌های سیب‌زمینی در مراحل نموی مختلف مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول۲ نشان داده شده است، میزان پرولین در تنش گرما و سرما در مراحل نموی مختلف نسبت به شرایط کنترل دارای افزایش نسبی بوده و این مهم نشان از حساسیت بالای این مراحل در پاسخ به تنش‌های نامبرده می‌باشد.

جدول ۱- نام آغازگر، توالی، دمای ذوب، مکان کروموزومی و شماره دسترسی ژن‌های ABC transporter مورد استفاده در qRT-PCR

Name	Sequence(5'- 3')	Tm (ºc)	Locus Tag	Accession number
StABC-001-F	TGGGAGTGCTGTACTTGCTG	59.96	StChr4	XP_006350179.1
StABC-001-R	TGGAGACTGTTTCGTCGTGG	59.97		
StABC-012-F	TGGAATGACCGTGGATAGCG	59.9	StChr12	XP_006349962.1
StABC-012-R	TGCAAGCATGGAGATGCGTA	60.11		
StABC-024-F	AGTGTCCTTCAGAGTGCTGC	59.97	StChr4	XP_015167802.1
StABC-024-R	AGGGCCAGTTACAAGAAGGC	59.96		
StABC-050-F	CACCTGCCGTCTCCATCTAC	59.9	StChr9	XP_006355894.1
StABC-050-R	ACTCCCTTGCGTAGCCTTTC	60.04		
StABC-084-F	GCAGTTCAAGGAAACGTCGG	59.77	StChr7	XP_015161484
StABC-084-R	AATTCACCCTCGGCAACCTT	59.89		
StABC-002-F	CGGTGTATGAGTAGTCGGGC	59.97	StChr12	XP_015169911.1
StABC-002-R	AGACCAGACGTTGGTTCGTC	59.97		
StABC-138-F	AGGCTTGCGTGTGGTTAGAA	59.89	StChr6	XP_006347199.1
StABC-138-R	TGTGCTTGACGGGCTAGTTT	59.89		
StABC-124-F	ATTGGAAGGCTCGTGCAGAT	59.75	StChr2	XP_015159734.1
StABC-124-R	GTTGCTGCGTGCTACTCTTG	59.84		
Elf-F	GTCACACTTCCCACATTGCT	60	-	Loc10259287
Elf-R	CCAGCATCACCGTTCTTCAA	60		
Sec3-F	CGAGCAACTCCCTCTCTTCA	60.1	-	Loc102599118
Sec3-R	GCAAGCGTGGCAAATCTACA	60		

جدول ۲- مقایسه میانگین محتوای پرولین آزاد در مراحل نموی مختلف سیب‌زمینی در شرایط تنش و کنترل برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر

نمونه آزمایشی	سطوح تنش	مرحله نموی اول	مرحله نموی دوم	مرحله نموی سوم
کنترل	شرایط گلخانه‌ای	۵/۲۲±۱۳/۱۱	۵٤/۳٤±۳۱/۲۰	۱۲/٦۱±٤٥/۳۱
تنش گرما	۲۹ درجه سانتی‌گراد	٥٦/۳۰±٤۱/۲٤	۳٤/٥۲±٦۷/۱۲	٤۱/۱٥±۲۱/٤۸
تنش سرما	٦ ساعت	٦۷/٥٦±٤۳/۳۱	٥٦/۷۸±۳٤/۸۲	٥٦/٦۱±۲٥/۷۲
	۲٤ ساعت	٤٥/٦۳±٦۲/۷۲	۲۹/٤۱±٤۷/۸۷	٤٥/۳٥±۹۸/٥۸
	٤۸ ساعت	٦۷/٤٥±۷٦/۹۲	۲۳/٦۱±٥۱/٥۸	۳۲/۸۳±٤٤/٥۸

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

سنجش میزان ABA در نمونه‌های سیب‌زمینی در مراحل نموی مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که در غلظت ۵۰ میکرومولار، این هورمون بیشترین افزایش را در مرحله نموی سوّم (۰/۰۰۷۷ ppm) نشان می‌دهد؛ از طرفی با افزایش میزان غلظت هورمون (۷۵ میکرومولار) این میزان در مرحله دوّم نموی نسبت به شرایط کنترل (۰/۰۰۷۳ ppm) افزایش قابل قبولی را نشان می‌دهد. درحالی که با افزایش غلظت ABA این روند در مرحله نموی سوّم برعکس بوده و کاهش را نشان می‌دهد. این موضوع نشان دهنده این است که با افزایش تنش وارده هر قدر که میزان غلظت ABA بیشتر باشد در نتیجهٔ کار تغییری حاصل نمی‌شود؛ زیرا این تنش تا حدودی مکانیسم‌های دفاعی را در گیاه فعال می‌کند و بعد از اندکی مقاومت، در همان مقدار ثابت می‌ماند.

تغییرات نسبی بیان ژن‌هایStABC transporter در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

تحقیقات نشان داده است که ناقلین ABC transporter گیاهی، به‌ویژه زیرخانواده ABCG و زیرخانواده ABCB نقش عمده‌ای درهورمون‌های گیاهی از قبیل اکسین، حمل و نقل فلزات سنگین و تنش غیرزنده دارند (Martin et al. 2000). تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که هریک از stABC، به‌طور مشابه به مجموعه‌ای از تنش‌های غیرزنده پاسخ می‌دهند. از این رو نتایج به‌دست آمده از مطالعه ژن‌های stABC در پاسخ به تنش گرما در مقایسه با کنترل نشان داد که مرحله نموی سوّم استولون سیب‌زمینی بیشترین پاسخ بیانی را در ارتباط با تنش گرما نشان داد. این موضوع از نظر استقرار غده‌های سیب‌زمینی و تشکیل غده بسیار حائز اهمیت می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود میزان بیان نسبی ژن‌های stABC024، stABC084 و stABC138 به‌طور معنی‌داری بیشترین بیان ژنی را در پاسخ به تنش گرما در مرحله نموی سوّم استولون از خود نشان دادند.

مطالعات قبلی نشان داده است که زیرخانواده ABCB ممکن است با تنش‌های غیرزنده در گیاهان ارتباط تنگاتنگی داشته باشد (Shen et al. 2010; Pang et al. 2013; Chai et al. 2016). به‌عنوان مثال، AtABCB25 مربوط به مقاومت به فلزات سنگین در *Arabidopsis* است و بیان بیش ازحدAtABCB25 می‌تواند مقاومت *Arabidopsis* را در برابر Cd و سرب بهبود بخشد (Kim et al. 2006). در ادامه، از نتایج حاصل از پژوهش مشخص شد که مرحله نموی دوّم استولون سیب‌زمینی حساسیت کمتری نسبت به تنش گرمایی داشته است زیرا بیان نسبی کمتری را در مقایسه با دیگر مراحل نموی در میان ژن‌های stABC انتخاب شده، نشان می‌دهد.

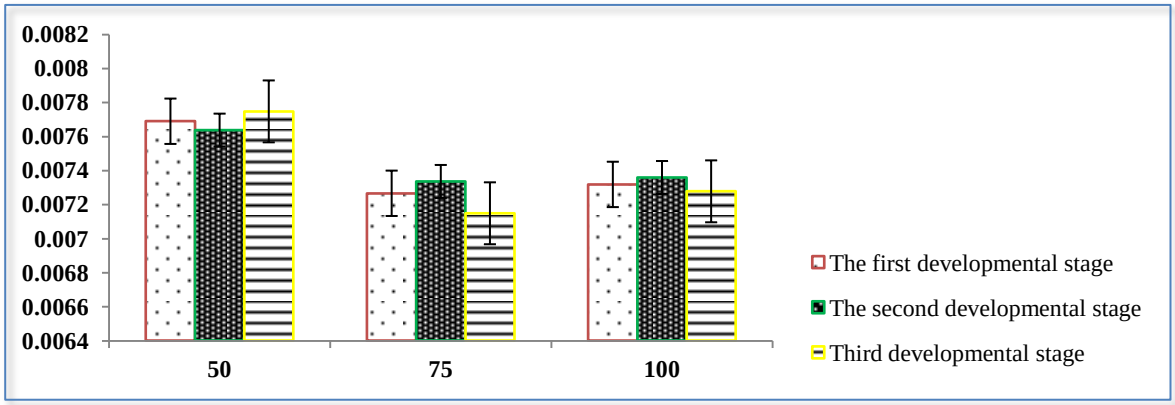
نتایج تغییرات بیان نسبی ژن‌های stABC در پاسخ به سطوح مختلف تنش سرما در شکل ٤ نشان داده شده است. به‌طوری که مراحل نموی سیب‌زمینی در پاسخ به سطوح ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت تنش سرمایی اختلاف معنی‌داری را با کنترل نشان دادند. بیان ژن‌های stABC01، stABC012، stABC002، stABC084 و stABC138 در سطوح مختلف تنش سرمایی افزایش بیان معنی‌داری را برای مرحله اوّل و سوّم نموی استولون نشان دادند که با نتایج حاصل از سنجش پرولین در این دو مرحله نموی استولون در پاسخ به سطوح تنش سرمایی ٦ و ٤٨ ساعت منطبق بوده و افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهند.

از طرفی این دو مرحله هم در استقرار گیاهچه و رشد غده سیب‌زمینی بسیار حائز اهمیت می‌باشند.

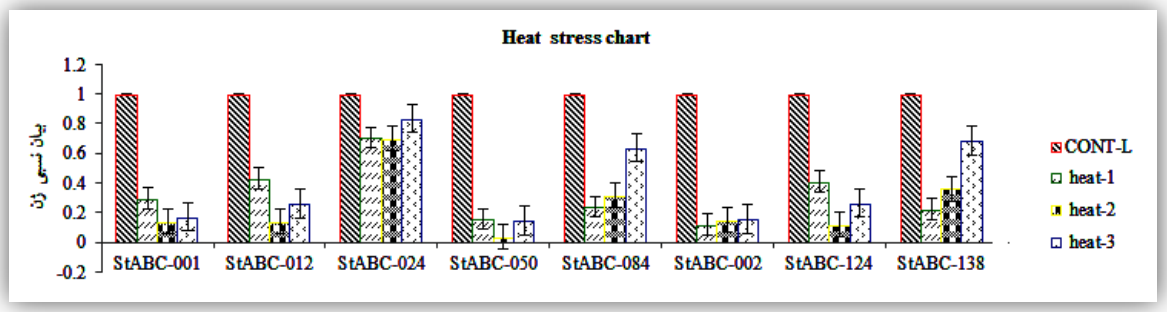
در شکل ۵ تغییرات نسبی بیان ژن‌های stABC مراحل نموی سیب‌زمینی در پاسخ به سطوح مختلف ABA به نمایش درآمده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که سطح تیماری ۷۵ میکرومولار اثرات افزایشی معنی‌داری را بر روی مرحله نموی سوم استولون سیب‌زمینی دارد. به‌طوری‌که ژن‌های stABC001، stABC012، stABC050، stABC084، stABC124 و stABC138 افزایش بیان در مرحله نموی سوّم استولون در سطح تیماری ۷۵ میکرومولار دارند. در مقابل، در سطح تیماری ۱۰۰ میکرومولار، ABA دارای اثرات کمتری بر روی تغییرات بیانی ژن‌های مورد مطالعه stABC می‌باشد.

هنگامی که گیاهان از تنش خشکی رنج می‌برند، ATABCG40 باعث افزایش تولید اسید آبسیزیک می‌شود تا به‌طور دقیق سبب بسته شدن روزنه‌ها شود (Pighin et al. 2004). درعین حال به‌عنوان بزرگ‌ترین زیرمجموعه، ABCG نیز نقش مهمی در تنش‌های غیرزنده ایفا می‌کند (Zhang et al. 2020).

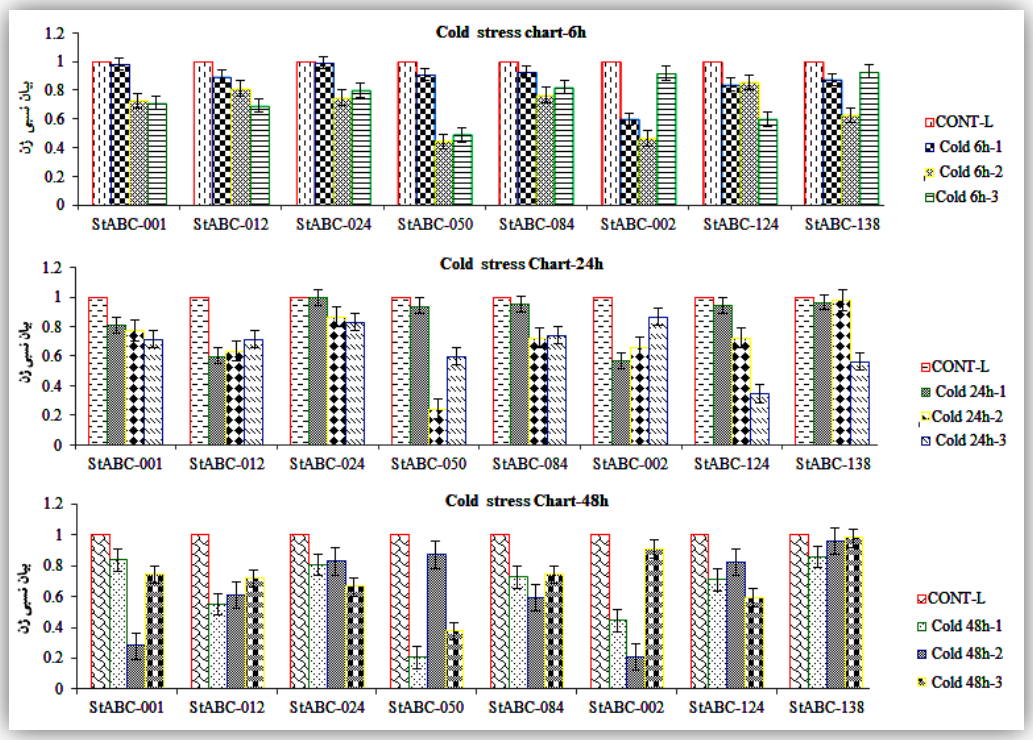
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]



شکل ۲- بررسی میزان غلظت اسید آبسیزیک (برحسب ppm) تحت تیمارهای متفاوت ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار ABA در مراحل نموی مختلف سیب‌زمینی

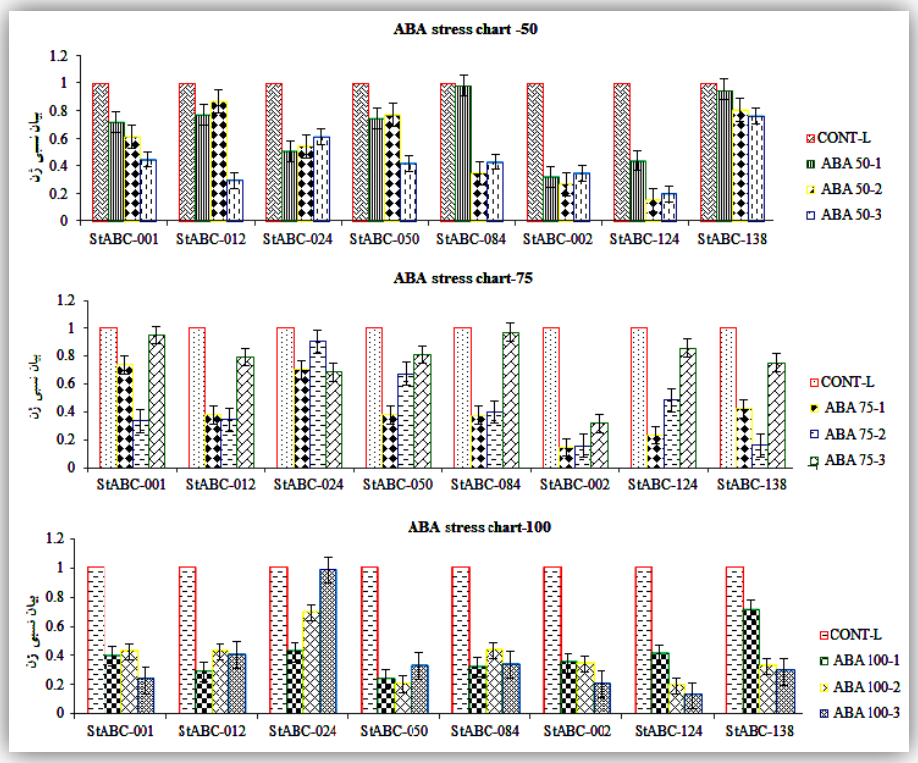


شکل ۳- تغییرات نسبی بیان ژن StABC transporter در مراحل نموی مختلف سیب‌زمینی در پاسخ به تنش گرما



شکل ٤- تغییرات نسبی بیان ژن StABC transporter در مراحل نموی مختلف سیب‌زمینی در پاسخ به تنش سرما

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

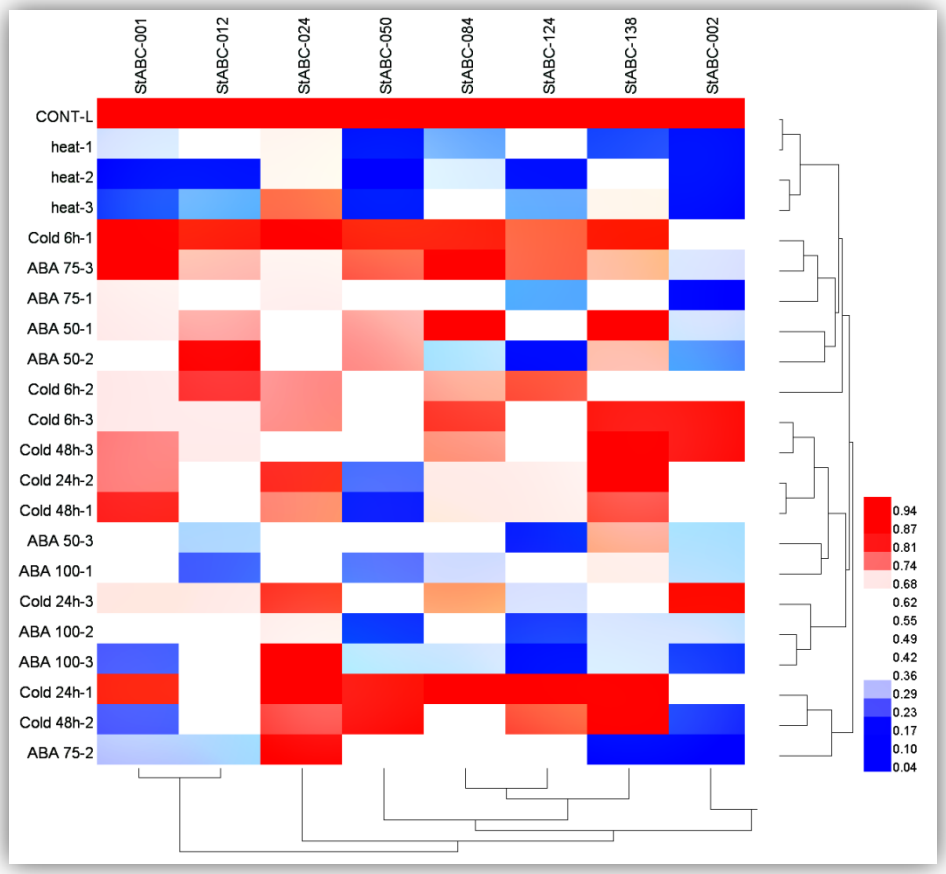


شکل ۵- تغییرات نسبی بیان ژن StABC transporter در مراحل نموی مختلف سیب‌زمینی در پاسخ به تنش ABA

هورمون اسید آبسیزیک (ABA) در جنبه‌های مختلف رشد و نمو گیاه از جمله بلوغ رویان و دانه، رشد پس از ترمیم و پاسخ‌های تنش به تغییرات محیطی نقش محوری دارد (Higgins 1992; Finkelstein et al. 2002). غلظت ABA بافت برگ در گیاهانی مثل گندم زمستانه، سیب‌زمینی و یونجه طی دوره انطباق سرمایی و سخت‌شدن به‌شدت افزایش می‌یابد و ABA معمولاً در واریته‌های مقاوم به سرما نسبت به واریته‌های حساس بیشتر است (Lee et al. 1993; Gupta 1997; Davies and Mansfield 1983; Alsher and Cumming 1990).

در گزارشی که توسط Etehadnia (2008) ارائه شد، تیمار ABA از طریق یک یا چند دوز ABA که به آرامی افزایش می‌یابد، پاسخ‌های کاملاً متفاوتی را در ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی در معرض تنش شوری ایجاد می‌کند. پاسخ‌ها به تیمار ABA و ژنوتیپ سیب‌زمینی بستگی داشت. روش اعمال تیمار ABA برای این تحقیق نیز طبق روش Etehadnia (2008) برای غلظت ۵۰ میکرومولار این گونه بود که هر سه روز یک بار ۱۰ میکرومولار ABA به گلدان‌های مربوطه اضافه شد. بدین ترتیب در تیمار ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار نیز به‌ترتیب به ازای هر سه روز یک بار میزان ۱۵ و ۲۰ دوز ABA به‌صورت تدریجی به مدت ۱٤ روز اضافه شد. طبق یافته‌های ما با افزایش میزان ABA، میزان واکنش این هورمون نسبت به تنش وارده در نتیجه کار تغییری ایجاد نکرد. خانواده ABC transporter یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های بزرگ پروتئینی است که در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها شناخته شده است و می‌توان آن را از سایر خانواده‌های پروتئینی متصل به ATP مانند کینازها تشخیص داد (Higgins et al. 1986). در یوکاریوت‌ها، ژن‌های ABC transporter به‌طورمعمول چهار دُمین متشکل از دو بخش متصل به ATP و دو قطعه نیمه‌غشایی (TM) نیمه مولکول حاوی یک ATP و یک دُمین TM را نیز رمزگذاری می‌کنند (Hyde et al. 1990). این واقعیت که پروکاریوت‌ها حاوی تعداد زیادی از ژن‌های ABC هستند، نشان می‌دهد که بسیاری از اعضای پستانداران این خانواده ژنی غیرمشخص باقی‌مانده‌اند (Boguski et al. 1993; Adams et al. 1993). بزرگ‌ترین زیرخانواده در آرابیدوپسیس شامل ژن‌های ناقل ABC نیمه اندازه است که توسط یک خوشه ۲۸ ژنی در زیرخانواده AtABCG، قرار دارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]



شکل ٦- نقشه حرارتی ژن‌های ABC transporter گیاه سیب‌زمینی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی سرما، گرما و ABA

الگوهای بیان اختصاصی ژن‌ها در بافت می‌توانند به شناسایی عملکرد آن‌ها درگونه‌های گیاهی کمک نموده و نقش آن‌ها را در رشد و نمو پیش‌بینی کنند. الگوی بیانی ترسیم شده ژن‌های stABC توسط نقشه حرارتی (شکل ٦) نشان داد که این دسته از ژن‌های مورد مطالعه درون چهار دسته طبقه‌بندی قرار گرفته و بیان ژن‌های stABC دارای اختلاف معنی‌داری هستند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه شهید چمران اهواز و مرکز پردازش سریع دانشگاه بابت حمایت در انجام پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Abbas M, Lafta AM, Lorenzen JH (1995) Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. Plant Physiology 109:637-643.

AdamsMD, KerlavageAR, FieldsC, VenterJC (1993) 3400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. Nature Genetics 4:256-267.

Alia P, Saradhi P(1991) Proline accumulation under heavy metal stress. Journal Plant Physiology 138:554-558.

Alscher RG, Cumming JR (1990) Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. John Wiley and Sons, INC Publication.

Ashraf M, Foolad MR(2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany59:206-216.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39:205-207.

Bellard C, Bertelsmeier C, Leadley P, Thuiller W, Courchamp F(2012) Impacts of climate change on the future of biodiversity. Ecolology Letter. 15:365-377.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

Bindi M, Olesen JE(2011)The responses of agriculture in Europe to climate change. Regional Environmental Change 11:151-158.
BoguskiMS, LoweTMJ, TolstoshevCM (1993) The EST express gathers speed. Nature Genetics 4:331-332.
Bournay A-S, Hedley PE., Maddison A, WaughR, MachrayGC (1996) Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. Nucleic Acids Research 24:2347-2351.
Chai C, Subudhi PK (2016) Comprehensive analysis and expression profiling of the OsLAX and OsABCB auxin transporter gene families in Rice (*Oryza sativa*) under phytohormone stimuli and abiotic stresses. Frontier Plant Science 3:593.
Davies PJ, Mansfield TA (1983) The role of abscisic acid in drought avoidance, In: Abscisic acid (ed. by F.T. Adicott). Praeger, New York. 237-268.
Etehadnia M, Waterer DG, Tanino KK (2008) The Method of ABA Application Affects Salt Stress Responses in Resistant and Sensitive Potato Lines. Journal of Plant Growth Regulation 27:331-341.
FAO (2013) Agriculture statistics. Retrived on 14 November 2015 from URL: faostat, fao.org/faostat.
Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. Plant Cell 14 (Suppl):S15-S45.
GhasemiGolazani K, Lotfi R (2015) Cold stress in plants. Tabriz University Press. (In Farsi with English abstract).
Gupta US (1997) Crop Improvement: Vol II. Stress Toleronce. Oxford and IBH Publishing CO. Hartung W. 1983: The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Valerianella locusta*. Plant Cell Environmental 6:427-428.
Hassanpanah D, Kazemi M, Musapourgorji A, Jalali A H (2019) Comprehensive guide to modern potato farming. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) 5-13. (In Farsi with English abstract).
HellebustJohan A, Ming SL (1976) Regulation of proline metabolism in the marine centric diatom Cyclotellacryptica. Canadian Journal of Botany 54:949-959.
Higgins CF (1992). ABC transporters: From microorganisms to man. Annual Review Cell Biology 8:67-113.
Higgins CF, Hiles ID, SalmondGPC, GillDR, DownieJA, EvansIJ, HollandB, GrayL, Buckel SD, BellAW,HermodsonMA(1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. Nature 323:448-450.
Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport, Nature 346:362-365.
Hubick KT, Reid DM (1980) A rapid method for the extraction and analysis of abscisic acid from plant tissue. Plant Physiology 65:523-525
Rhodes D, Hanson AD (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants, Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biolofy 44:357-384.
Stephen CH, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearcet SR, Gallaghert MP, Gill DR, HubbarRE, Higgins CF(1990) Structural model of ATP binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature 346:362-365.
Jha UC, Bohra A, Singh NP(2014) Heat stress in crop plants: its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance. Plant Breeding 133:679-701.
Kavikishor BP, Hima kumaraP, Sunida MSL, Sreenvasulu N (2015) Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. Frontiers in Plant Science.6:455.
Kim DY, Bovet L, Kushnir S, Noh EW, Martinoia E, Lee Y (2006) AtATM3 is involved in heavy metal resistance in Arabidopsis. Physiologia Plantarum. 140:922-932.
Kloosterman B, Vorst O, Hall RD, Visser RGF, Bachem CW (2005) Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development. Plant Biotechnology Journal 3:505-519.
Lafta AM, Lorenzen JH (1995): Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. Plant Physiology 109:637-643.
Lee TM, Lur HS, Chu C (1993) Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedling I. Endogenous ABA levels. Plant Cell Environment. 16:481-490.
Mansour MMF (1998) Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycine betaine and proline against NaCl stress. Plant Physiology and Biochemistry 36:767-772.
Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R (2000) Drug binding sites on P-glycoproteinare altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. Biochemistry 39:11901-11906.
Masoumzadeh MB, Imani AA, Khayamaim S (2012) Salinity stress effect on proline and chlorophyll rate in four beet cultivars.Scholars Research Library. 3:5453-5456.
Naidu B, Thusitha G(2005) Increasing cold tolerance in rice by selecting for high polyamine and gibberellic acid content. Australian Journal of Plant Physiology 25:793-800.
Naqvi SSM (1999) Plant hormones and stress phenomena. In: m. Pessarakil (ed.). Hand book of plant and Crop Stress. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp. 709-730.
Nazari MR, MaaliAmiri R, Ramezanpour SS (2011).Quantitative assessment of gene expression pattern of sucrose synthase under cold stress condition in chickpea. Modern Genetics Journal 2:59-69. (In Farsi with English abstract).
Ohno S (1970) Evolution by gene duplication, Springer-Verlag, New York.
Ozturk L, Demir Y, Unlukara A, Karatas I, Kurunc A, Duzdemir O (2012) Effects of long-term salt stress on antioxidant system, chlorophyll and proline contents in pea leaves. Romanian Biotechnology Letter. 17:7227-7236.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

Pang K, Li Y, Liu M, Meng Z, Yu Y (2013) Inventory and general analysis of the ATP-binding cassette (ABC)gene superfamily in maize (*Zea mays* L.). Gene 526:411-428.
Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology Environmental Safety 60:324–349.
Pereira A(2016) Plant abiotic stress challenges from the changing environment. Frontierin Plant Science 7: 1123.
Pighin JA, Zheng H, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels AL (2004) Plantcuticular lipid export requires an ABC transporter. Science 306:702-704.
Pourfarid B (2019) Identification of ABC-Transporter gene family and analysis of gene co-expression network pattern in different stages of potato stolone development in response to abiotic stresses, Master Thesis, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz. (In Farsi with English abstract).
Pourfarid B, Sorkheh K, Martinez-Gomez P (2021) Identification of ABC-Transporter gene family and analysis of gene co-expression network pattern in different stages of potato stolone development in response to drought and salinity stress. Genetic Engineering and Biosafety Journal.10:21-30.
Livak KJ, Schmitgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantification PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.Methods 25:402-8.
Shen CJ, Bai YH, Wang BJ, Zhang SN, Wu YR, Chen M, Jiang DA, Qi YH (2010) Expression profile ofPIN, AUX/LAX and PGP auxin transporter gene families in *Sorghum bicolor* under phytohormone and abioticstress. FEBS Journal 277:2954-2969.
Thomashow MF (1999) Plant Cold Acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual Review PlantPhysiology andPlantMolecular Biology 50:517-599.
Wankun Deng, Yongbo Wang, Zexian Llu, Hun Cheng, Yu Xue.Published: November 5, 2014HemI : A Toolkit for Illustrating Heatmaps. DOI: 10.1371/journal.pone.0111988. Source: PubMed
Zhang Z, Tong T, Fang Y, Zhang X, Niu C, Li J, Zhang X, Xue D (2020) Genome-Wide identification of Barley ABC genesand their expression in response to abioticstress treatment. Plants 9:1281.
Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiologhy of abscisic acid. Annual Review Plant PhysiologyandPlant Molecular Biology 39:439-473.
Zandalinas SI, Mittler R, Balfagón D, Arbona V, GómezCadenas A (2018). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. Physiologia Plantarum 2-12.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]