

بررسی الگوی بیان ژن‌های انتخابی ABC transporter شناسایی شده در مراحل مختلف نمو 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 B¹, Sorkkeh K^{*1}, Martinez-Gomez P²

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.sorkkeh@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. با توجه به این که 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 نمو مختلف استولون سیب‌زمینی در شرایط کنترل (دمای گلخانه)، تنش گرما (۲۹ درجه سانتی‌گراد)، تنش سرما (دمای ۴ 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 نمو 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 نمو مختلف دارای بیان کمتری نسبت به شرایط کنترل بودند. ژن‌های StABC-084 و StABC-138 در تیمار ABA ۵۰ میکرومولار در مرحله نمو اول و ژن‌های StABC-084، StABC-001 و StABC-124 در تیمار ۷۵ میکرومولار در مرحله نمو سوم و StABC-024 در تیمار ۱۰۰ میکرومولار در مرحله نمو سوم نسبت به سایر مراحل نمو دارای بیان بالایی بودند. همچنین، جهت اطمینان از اعمال اثر تنش‌های غیرزیستی به گیاه سیب‌زمینی، میزان پرولین و ABA در مراحل نمو مختلف استولون مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. با افزایش میزان تنش، میزان پرولین نیز در مراحل نمو مختلف نیز روند افزایشی داشت. در تنش گرما میزان پرولین مراحل نمو اول، دوم و سوم به ترتیب ۴۱/۲۴، ۶۷/۲ و ۲۱/۴۸ گرم در میلی‌گرم وزن تازه اختلاف معنی‌داری داشته است. همچنین، میزان پرولین در سطوح مختلف زمانی تنش سرما (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) افزایش معنی‌داری را نشان داده به‌طوری که در مرحله نمو اول در سطح تیماری ۴۸ ساعت (۷۶/۹۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) بیشترین و مرحله نمو سوم استولون در سطح تیماری ۴۸ ساعت (۴۴/۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) کمترین میزان پرولین را داشت. نتایج حاصل از سنجش ABA اختلاف معنی‌داری را با کنترل نشان می‌دهد؛ در غلظت ۵۰ میکرومولار، این هورمون بیشترین افزایش را در مرحله نمو سوم (۰/۰۰۷۷ppm) نشان داد. همچنین، با افزایش میزان غلظت هورمون به ۷۵ میکرومولار میزان ABA در مرحله نمو دوم 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 نمو استولون سیب‌زمینی در پاسخ به تنش‌های سرما، گرما و ABA می‌باشد. یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌تواند درک عملکرد خانواده ژنی ABC transporter را بهبود بخشد و مطالعات بیشتر در مورد جزئیات مفصل عملکرد مولکولی و بیولوژیکی سیب‌زمینی را تسهیل نماید.

واژه‌های کلیدی

استولون

بیان ژن

پرولین

تنش‌های غیرزیستی

سیب‌زمینی

ABC transporter

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) متعلق به خانواده Solanaceae، محصول فصل سرد و نیازمند آب و هوای خشک می‌باشد. این گیاه آتوتتراپلوئید بوده و به صورت یک‌ساله به‌منظور تولید غده کشت می‌شود. در مقیاس جهانی سیب‌زمینی یکی از با ارزش‌ترین مواد غذایی محسوب می‌شود و از مهم‌ترین محصولات 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 به ترتیب هند، روسیه، اوکراین و آمریکا قرار گرفته‌اند. ایران از نظر میزان تولید سیب‌زمینی در میان کشورهای جهان در رتبه دوازدهم و در میان کشورهای آسیایی پس از کشورهای چین و هند در رتبه سوم قرار دارد (FAO 2013). ABC transporter (ATP Binding Cassette)، یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های پروتئینی انتقال‌دهنده غشاست که در همه ارگانسیم‌ها 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 (GhasemiGolazani and 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 به‌طوری‌که 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 مسیر گلوتامات 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 آبسزیک (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 نمودی 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 نمودی هستند. مشاهدات مربوط به تحریک بیوستتزر ABA تحت تنش محیطی و آزاد شدن آن از محل سنتز به محل فعالیت، نقش اسید آبسزیک 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

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 ژرمیناتور 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 ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند 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 آبسزیک بر روی برگ‌ها (Etehadnia et al. 2008) انجام شد و پس از دو هفته از رشد غده‌ها از مراحل مختلف نموی استولون (مرحله ۲، ۳ و ۴؛ شکل ۱ الف، ب و ج) نمونه‌برداری شد. در شکل ۱ 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.

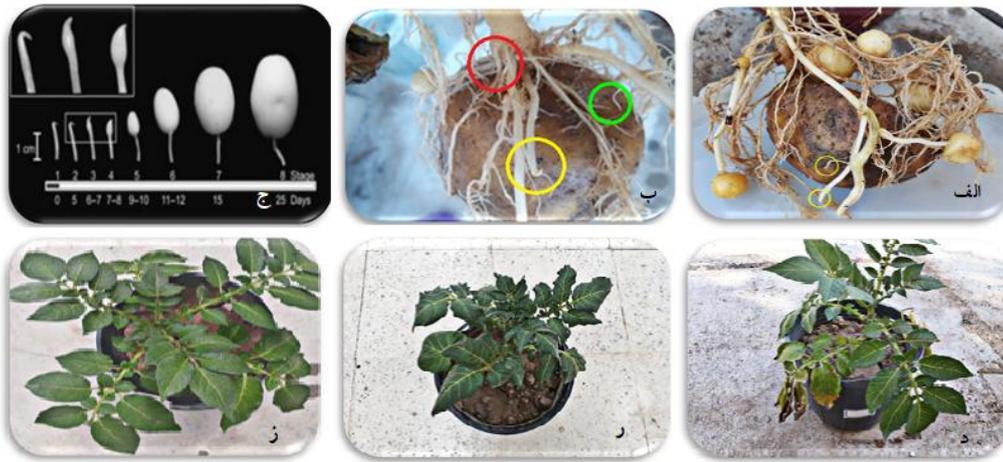
پرویلین آزاد به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی تمام تنش‌ها مطابق روش (Bates 1973) در مراحل نموی مختلف سیب‌زمینی به شرح زیر اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم از نمونه‌های سیب‌زمینی در مراحل مختلف در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۳٪ ساییده و مخلوط همگن به‌دست آمده توسط کاغذ صافی صاف شد.

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 پلازما در گیاهان تحت تنش‌های اسمزی ایفای نقش می‌کند (Mansour 1998; Mirza Masomzadeh et al. 2012).

پورفرید (2019) در ابتدا اقدام به شناسایی ABC transporter‌های سیب‌زمینی به روش بیوانفورماتیکی نموده است. علاوه بر آن، 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



شکل ۱- مراحل نمونه‌ی 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)

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 $pH=2/5$ تنظیم شد. با این عصاره می‌توان اسید آبسزیک آزاد در عصاره را با طول موج $263nm$ قرائت نمود.

RNA کل، با استفاده از کیت سنتز RNA بیویسیک (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 الیگونوکلوئیدهای 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 آنالین 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

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 ۴ 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 تنش ABA، 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 (هموزنیز شده) آن را درون فالكون ۵۰ml یا لوله آزمایش ریخته و ۲۵ml آب مقطر 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

توسط نرم افزار HemI-windiws-1-0-win64bit ترسیم شد (Wankun et al. 2014). همچنین، داده‌های مربوط به شاخص‌های فیزیولوژیکی توسط نرم افزار SAS آنالیز شدند.

نتایج و بحث

ارزیابی معیارهای فیزیولوژیکی پرولین و ABA میزان پرولین و ABA به عنوان معیاری جهت تأیید تنش‌های اعمال شده بر روی گیاهچه‌های سیب‌زمینی در مراحل نموی مختلف مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۲ 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.

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

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های مربوط به الگوی بیان ژن با استفاده از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen and Livak 2008) تجزیه و تحلیل شدند. به منظور بررسی میزان تغییرات نسبی بیان ژنهای ABC transporter 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 (*Elf* و *Seq3*) با تعیین خط پایه معین و سپس با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ، تغییرات نسبی بیان ژن‌ها برای هر مرحله نموی سیب‌زمینی تحت تیمارهای مختلف تنش توسط نرم افزار Excel مورد سنجش قرار گرفت. نقشه حرارتی بیان ژنهای مورد مطالعه

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 (°C)	Locus Tag	Accession number
StABC-001-F	TGGGAGTGCTGTACTTGCTG	59.96		
StABC-001-R	TGGAGACTGTTTCGTCGTGG	59.97	StChr4	XP_006350179.1
StABC-012-F	TGGAATGACCGTGGATAGCG	59.9		
StABC-012-R	TGCAAGCATGGAGATGCGTA	60.11	StChr12	XP_006349962.1
StABC-024-F	AGTGTCCCTCAGAGTGCTGC	59.97		
StABC-024-R	AGGGCCAGTTACAAGAAGGC	59.96	StChr4	XP_015167802.1
StABC-050-F	CACCTGCCGTCTCCATCTAC	59.9		
StABC-050-R	ACTCCCTTGCCTAGCCTTTC	60.04	StChr9	XP_006355894.1
StABC-084-F	GCAGTTCAAGGAAACGTCGG	59.77		
StABC-084-R	AATTCACCCTCGGCAACCTT	59.89	StChr7	XP_015161484
StABC-002-F	CGGTGTATGAGTAGTCGGGC	59.97		
StABC-002-R	AGACCAGACGTTGGTTCGTC	59.97	StChr12	XP_015169911.1
StABC-138-F	AGGCTTGCCTGTGGTTAGAA	59.89		
StABC-138-R	TGTGCTTGACGGGCTAGTTT	59.89	StChr6	XP_006347199.1
StABC-124-F	ATTGGAAGGCTCGTGCAGAT	59.75		
StABC-124-R	GTTGCTGCGTGCTACTCTTG	59.84	StChr2	XP_015159734.1
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	۵۴/۳۴±۳۱/۲۰	۱۲/۶۱±۴۵/۳۱
تنش گرما	۲۹ درجه سانتی‌گراد ۶ ساعت	۵/۶۳±۴۱/۲۴	۳۴/۵۲±۶۷/۱۲	۴۱/۱۵±۲۱/۴۸
		۶/۵۶±۴۳/۳۱	۵۶/۷۸±۳۴/۸۲	۵۶/۶۱±۲۵/۷۲
تنش سرما	۲۴ ساعت ۴۸ ساعت	۴۵/۶۳±۶۲/۷۲	۲۹/۵۱±۴۷/۸۷	۴۵/۳۵±۹۸/۵۸
		۶/۴۵±۶۷/۹۲	۲۳/۶۱±۵۱/۵۸	۳۲/۸۳±۴۴/۵۸

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 نمو دوم استولون سیب‌زمینی حساسیت کمتری نسبت به تنش گرمایی داشته است زیرا بیان نسبی کمتری را در مقایسه با دیگر مراحل نمو در میان ژن‌های stABC انتخاب شده، نشان می‌دهد.

نتایج تغییرات بیان نسبی ژن‌های stABC در پاسخ به سطوح مختلف تنش سرما در شکل ۴ نشان داده شده است. به طوری که مراحل نمو سیب‌زمینی در پاسخ به سطوح ۶، ۲۴ و ۴۸ 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 اول و سوم نمو استولون نشان دادند که با نتایج حاصل از سنجش پرولین در این دو مرحله نمو استولون در پاسخ به سطوح تنش سرمایی ۶ و ۴۸ 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 نمو 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 نمو سوم استولون سیب‌زمینی دارد. به طوری که ژن‌های stABC001، stABC012، stABC050، stABC084، stABC124 و stABC138 افزایش بیان در مرحله نمو سوم 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.

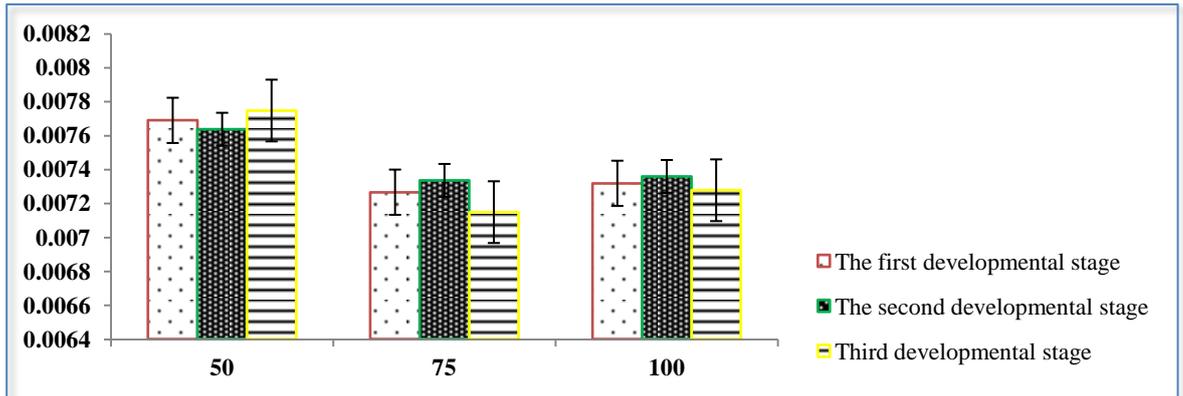
هنگامی که گیاهان از تنش خشکی رنج می‌برند، ATABCG40 باعث افزایش تولید اسید آبسزیک می‌شود تا به طور دقیق سبب بسته شدن روزنه‌ها شود (Pighin et al. 2004). در عین حال به عنوان بزرگ‌ترین زیرمجموعه، ABCG نیز نقش مهمی در تنش‌های غیرزنده ایفا می‌کند (Zhang et al. 2020).

سنجش میزان ABA در نمونه‌های سیب‌زمینی در مراحل نمو مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که در غلظت ۵۰ میکرومولار، این هورمون بیشترین افزایش را در مرحله نمو سوم (۰/۰۰۷۷ ppm) نشان می‌دهد؛ از طرفی با افزایش میزان غلظت هورمون (۷۵ میکرومولار) این میزان در مرحله دوم نمو نسبت به شرایط کنترل (۰/۰۰۷۳ ppm) افزایش قابل قبولی را نشان می‌دهد. در حالی که با افزایش غلظت ABA این روند در مرحله نمو سوم 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 نتیجه 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.

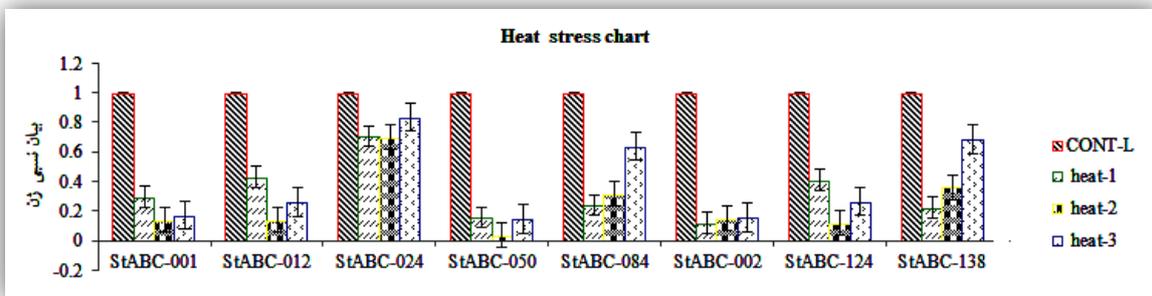
تغییرات نسبی بیان ژن‌های StABC transporter در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

تحقیقات نشان داده است که ناقلین ABC transporter گیاهی، به ویژه زیرخانواده ABCG و زیرخانواده ABCB نقش عمده‌ای در هورمون‌های گیاهی از قبیل اکسین، حمل و نقل فلزات سنگین و تنش غیرزنده دارند (Martin et al. 2000). تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که هر یک از stABC، به طور مشابه به مجموعه‌ای از تنش‌های غیرزنده پاسخ می‌دهند. از این رو نتایج به دست آمده از مطالعه ژن‌های stABC در پاسخ به تنش گرما در مقایسه با کنترل نشان داد که مرحله نمو سوم 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 به طور معنی‌داری بیشترین بیان ژنی را در پاسخ به تنش گرما در مرحله نمو سوم استولون از خود نشان دادند.

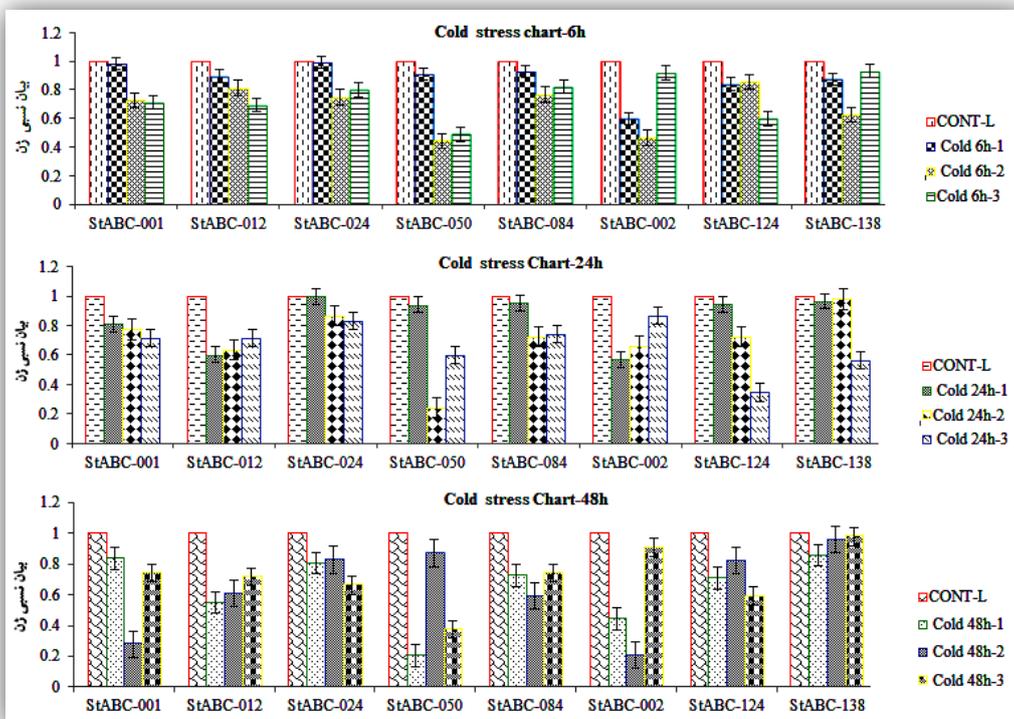
مطالعات قبلی نشان داده است که زیرخانواده ABCB ممکن است با تنش‌های غیرزنده در گیاهان ارتباط تنگاتنگی داشته باشد (Shen et al. 2010; Pang et al. 2013; Chai et al. 2016). به عنوان مثال، AtABCB25 مربوط به مقاومت به فلزات سنگین در *Arabidopsis* است و بیان بیش از حد AtABCB25 می‌تواند



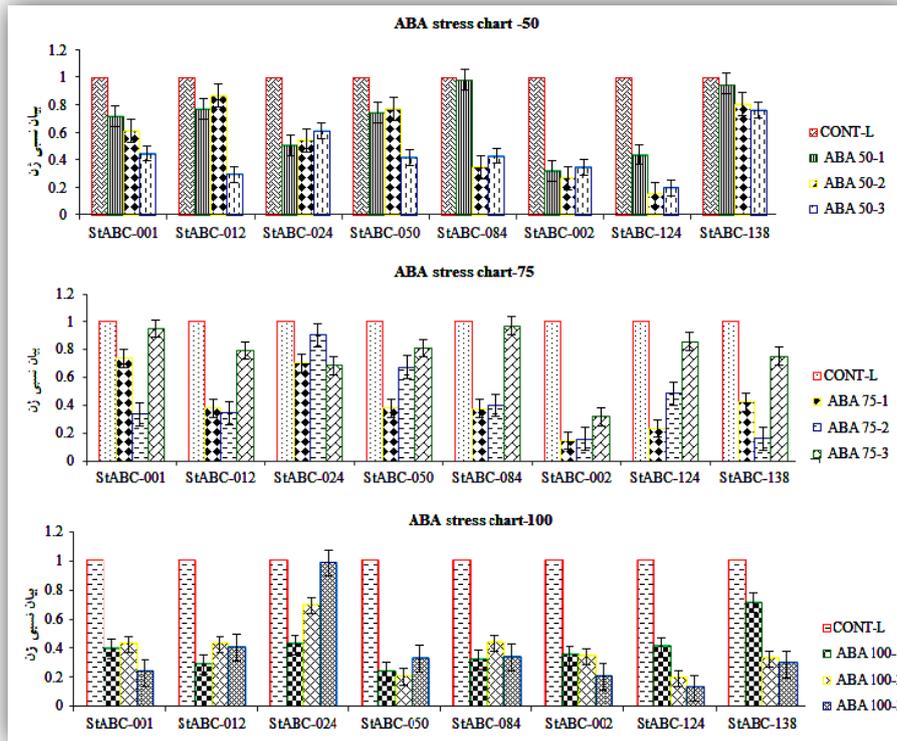
شکل ۲- بررسی میزان غلظت اسید آبسزیک (برحسب ppm) تحت تیمارهای متفاوت ۷۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ABA در مراحل نمو مختلف سیب‌زمینی



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



شکل ۴- تغییرات نسبی بیان ژن StABC transporter در مراحل نمو مختلف سیب‌زمینی در پاسخ به تنش سرما

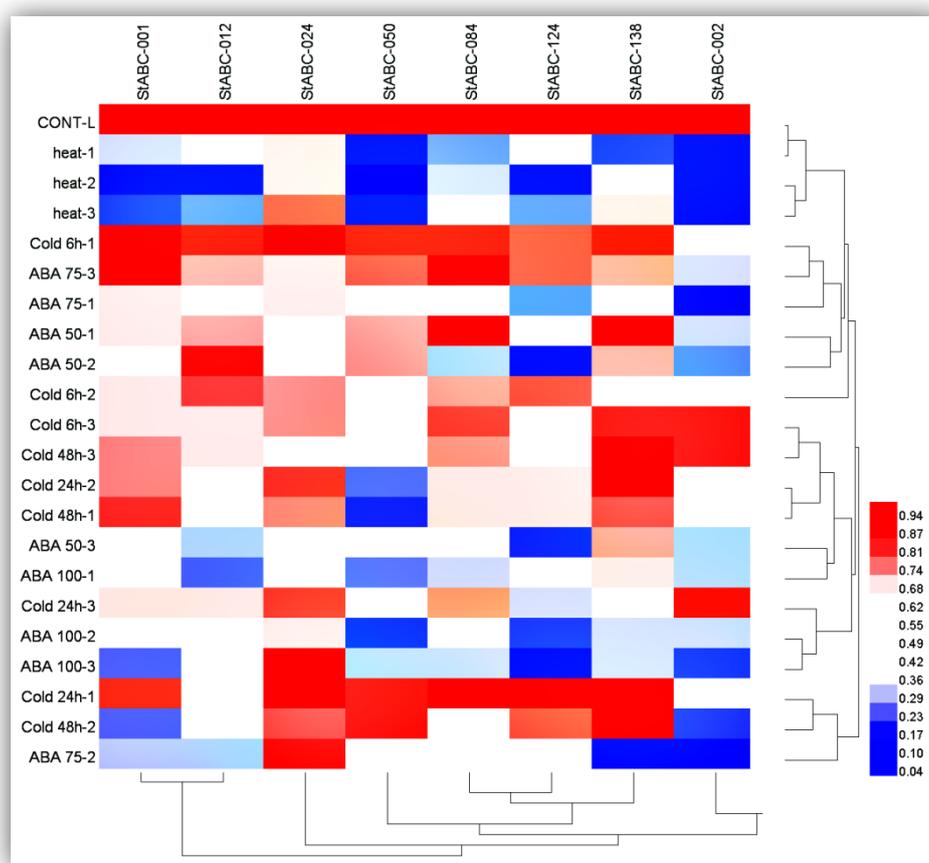


شکل ۵- تغییرات نسبی بیان ژن StABC transporter در مراحل نمو مختلف سیب‌زمینی در پاسخ به تنش ABA

۱۵ و ۲۰ دوز ABA به صورت تدریجی به مدت ۱۴ روز اضافه شد. طبق یافته‌های ما با افزایش میزان ABA، میزان واکنش این هورمون نسبت به تنش وارده در نتیجه کار تغییراتی 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 به‌طور معمول 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 آرکیدوپسیس شامل ژن‌های ناقل ABC نیمه اندازه است که توسط یک خوشه ۲۸ ژنی در زیرخانواده AtABCG قرار دارد.

هورمون اسید آبسزیک (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 به شدت افزایش می‌یابد و ABA معمولاً در وارته‌های مقاوم به سرما نسبت به وارته‌های 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 به ترتیب به ازای هر سه روز یک بار میزان



شکل ۶- نقشه حرارتی ژنهای ABC transporter گیاه سیبزمینی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی سرما، گرما و ABA

سپاسگزاری

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

الگوهای بیان اختصاصی ژن‌ها در بافت می‌توانند به شناسایی عملکرد آن‌ها در گونه‌های گیاهی کمک نموده و نقش آن‌ها را در رشد و نمو پیش‌بینی کنند. الگوی بیانی ترسیم شده ژنهای stABC توسط نقشه حرارتی (شکل ۶) نشان داد که این دسته از ژن‌های مورد مطالعه درون چهار دسته طبقه‌بندی قرار گرفته و بیان ژنهای stABC دارای اختلاف معنی‌داری هستند.

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.
 Adams MD, Kerlavage AR, Fields C, Venter JC (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 Botany* 59:206-216.
 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. *Ecology Letter*. 15:365-377.

- Bindi M, Olesen JE (2011) The responses of agriculture in Europe to climate change. *Regional Environmental Change* 11:151-158.
- Boguski MS, Lowe TM, Tolstoshev CM (1993) The EST express gathers speed. *Nature Genetics* 4:331-332.
- Bournay A-S, Hedley PE., Maddison A, Waugh R, Machray GC (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.
- Ghasemi Golazani K, Lotfi R (2015) Cold stress in plants. Tabriz University Press. (In Farsi with English abstract).
- Gupta US (1997) Crop Improvement: Vol II. Stress Tolerance. 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).
- Hellebust Johan A, Ming SL (1976) Regulation of proline metabolism in the marine centric diatom *Cyclotella cryptica*. *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, Salmond GPC, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland B, Gray L, Buckel SD, Bell AW, Hermodson MA (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 Biology* 44:357-384.
- Stephen CH, 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.
- 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 kumara P, Sunida MSL, Sreenivasulu 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-glycoprotein are 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, Maali Amiri 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.

- 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. *Frontiers in Plant Science* 7: 1123.
- Pighin JA, Zheng H, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels AL (2004) Plant cuticular 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 of PIN, AUX/LAX and PGP auxin transporter gene families in *Sorghum bicolor* under phytohormone and abiotic stress. *FEBS Journal* 277:2954-2969.
- Thomashow MF (1999) Plant Cold Acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:517-599.
- Wankun Deng, Yongbo Wang, Zexian Llu, Hun Cheng, Yu Xue. Published: November 5, 2014. *HemI : 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 genes and their expression in response to abiotic stress treatment. *Plants* 9:1281.
- Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:439-473.
- Zandalinas SI, Mittler R, Balfagón D, Arbona V, Gómez-Cadenas A (2018). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* 2-12.