اثر کاربرد گلایسین‌بتائین بر تحمل به شوری تنباکو تراریخت (*Nicotiana tabacum*) حاوی ژن *P5CS*

مرضیه وحید دستجردی و علی اکبر احسانپور

ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۳

چکیده

در این مطالعه اثر کاربرد خارجی گلایسین بتائین بر میزان پرولین و ایجاد مقاومت به تنش شوری، گیاهان تنباکوی تراریخت حاوی بیان افزوده ژن *P5CS*، به صورت تصادفی با سه تکرار در شرایط کشت در شیشه مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور گیاهان تراریخت و غیرتراریخت به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های صفر، ۱۰۰و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl انتقال داده شدند. گیاهچه های تنباکو در مرحله چهار و شش برگی توسط گلایسین‌بتائین با غلظت‌های صفر، ۲۰و ۴۰ میلی گرم در لیتر محلول پاشی شدند. پس از ۴ هفته نتایج نشان داد با افزایش میزان گلایسین‌بتائین در گیاهان در معرض شوری وزن تر و خشک، میزان پتاسیم، سطح برگ، گلایسین‌بتائین درونی و همچنین قند محلول در هر دو غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی گرم در لیتر گلایسین-بتائین افزایش معنی دار را نسبت به نمونه شاهد از خود نشان دادند. به علاوه میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین و همچنین میزان سدیم نسبت به تیمار عدم کاربرد به تدریج کاهش یافت. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد خارجی گلایسین بتائین در گیاه تنباکو در کاهش اثرات تنش شوری و بهبود شاخص های رشد در شرایط تنش موثر بود. همچنین به نظر می‌رسد که عملکرد توأم گلایسین‌بتائین و تجمع پرولین ناشی از بیان افزوده ژن *P5CS* در گیاهان تراریخت باعث القا تحمل بیشتری به تنش شوری در این گیاهان گردید. با توجه به نتایج این مطالعه، عملکرد توأم گلایسین‌بتائین و پرولین در ثبات غشا و کاهش اثرات منفی تنش شوری در گیاه تراریخت و غیر تراریخت تنباکو را می‌توان پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: گلایسین‌بتائین، پرولین، ژن *P5CS*، گیاه تنباکو، تنش شوری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۴۱۵۰، پست الکترونیکی: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

مقدمه

تنش شوری یکی از مهم ترین عوامل محدود کننده رشد گیاه می‌باشد. یکی از واکنش‌های معمول گیاه برای مقابله با تنش، تنظیم اسمزی (Osmotic adjustment) می‌باشد. تنظیم اسمزی در گیاهان از طریق تجمع انواع مختلفی از محلول‌های آلی سازگار (Compatible solutes) در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد. یک دسته از مواد آلی سازگار در گیاهان گلایسین‌بتائین می‌باشد. گلایسین‌بتائین در شرایط تنش می تواند از فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی، ساختار پروتئین‌ها و غشاهای سلولی محافظت نماید (۱۰). پرولین نیز یکی از آمینواسیدهای فعال در پدیده تنظیم اسمزی می‌باشد که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش مهمی دارد (۳۵). علاوه بر این پرولین در محافظت از ساختارهای سلولی در گیاهان در معرض تنش، پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین به عنوان مخزن انرژی جهت تنظیم پتانسیل ردوکس سلولی عمل مینماید (۱۵).

گلایسین‌بتائین در بسیاری از گیاهان زراعی مانند اسفناج، جو، گندم و سورگوم در واکنش به تنش‌ها افزایش می‌یابد

(۶). با این وجود همه گیاهان قادر به تولید این اسمولیت به مقدار کافی جهت مقابله با تنش نمی‌باشند. از این رو کاربرد خارجی گلایسین بتائین به عنوان راه حلی برای افزایش غلظت این ترکیب در گیاهان ممکن است بتواند گیاه را در مقابله با شرایط تنشی یاری نماید. علاوه بر این به دلیل اهمیت تنش شوری در گیاهان و تولید گیاهان تراریخته‌ای که در این شرایط به رشد مناسب خود ادامه دهند، مسئله انتقال ژن به گیاهان مورد توجه قرارگرفته است (۳۳). ازآنجاکه پرولین نیز یکی از اسمولیت‌های مهم در افزایش تحمل گیاه به تنش می‌باشد، دست‌ورزی ژنتیکی آنزیم‌های مسیر بیوسنتز آن به ویژه آنزیم ۱-پیرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (*P5CS*) در گیاهان می‌تواند افزایش تحمل به تنش را باعث شود. بطوریکه نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی نسبت به شرایط شوری در گیاهان مختلفی همچون تنباکو (*Nicotiana tabacum*) گزارش شده است (۱۱،۲۳). در بسیاری از موارد اثرات مثبت کاربرد خارجی گلایسین بتائین روی رشد و عملکرد گیاهان تحت تنش گزارش شده است. در گزارشی Makela و همکاران (۱۹۹۶) اظهار داشتند که با مصرف خارجی، گلایسین بتائین سریعاً به داخل برگ‌های گیاهی نفوذ کرده و به ریشه‌ها، مریستم‌ها و برگ‌های توسعه یافته منتقل می‌شود و اندام‌های گیاهی در حال نمو را از تنش حفظ می‌کند. علاوه بر این مشاهده شده است که گلایسین بتائین در بافت گیاهی برای چند هفته به حالت غیر متابولیزه باقی مانده و به محض وارد شدن تنش به اندام‌های گیاهی منتقل شده و به عنوان یک تعدیل کننده اسمزی در سلول‌ها فعالیت می‌کند (۲۱). علاوه بر این در گزارش منتشر شده توسط Hu در سال ۲۰۱۲ نشان داده شده که در بعضی از گیاهان افزایش میزان گلایسین بتائین موجب افزایش غلظت پرولین می‌شود در حالیکه در بعضی دیگر از گیاهان باعث کاهش میزان پرولین گردیده است (۱۸). به طوریکه کاربرد خارجی گلایسین بتائین در گیاه گوجه فرنگی سطوح بالایی از تجمع پرولین تحت تنش شوری را نشان می‌دهد (۱۲). در مقابل کاربرد خارجی گلایسین بتائین در دیسک های برگی Brassica باعث ممانعت از تجمع پرولین می‌شود.

Nicotiana tabacum از خانواده بادنجانیان جز گیاهان غیر تجمع دهنده گلیسین‌بتائین می‌باشد (۳۲) و به دلیل استفاده وسیع در تحقیق و پژوهش‌های زیست‌شناسی و کشاورزی به‌عنوان یک گیاه الگو و مدل استفاده می‌شود.

همانطور که گفته شد اگرچه اثرات مثبت گلایسین‌بتائین و پرولین خارجی بر افزایش تحمل در برابر تنش شوری پیش از این گزارش شده است، با این وجود تلاقی این دو اسمولیت نیز با هم برای مقابله با تنش ناشناخته است. علاوه بر این اطلاعات در زمینه اثر این اسمولیت آلی در گیاهان تراریخت حاوی ژن *P5CS* محدود است. هدف از آزمایش حاضر بررسی اثر گلایسین‌بتائین بر تحمل به تنش شوری و میزان پرولین گیاهان تراریخت در شرایط کشت در شیشه است. داده‌های پژوهش حاضر می‌تواند به درک بهتر نحوه عملکرد گلایسین‌بتائین بر میزان پرولین و یا عملکرد توأم این دو اسمولیت مهم آلی در ایجاد تحمل به شوری گیاهان کمک نماید.

مواد و روشها

در این پژوهش از بذر گیاه تنباکو(*Nicotiana tabacum*) رقم Wisconsin تراریخت حاوی بیان افزوده ژن *P5CS*، تهیه شده در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی اصفهان در سال ۱۳۹۴ استفاده شد. در ادامه بذرهای تراریخت و غیر تراریخت (به عنوان کنترل منفی) به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۷۰٪، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ضد عفونی و در پایان با آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو داده شدند. در مرحله بعد بذرهای استریل روی محیط کشت MS کشت داده شدند. پس از ۲۰ روز گیاهچه‌ها به محیط کشت MS حاوی نمک NaCl در غلظت‌های ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار منتقل گردید و در

دو مرحله ۴ و ۶ برگی با محلول گلایسین بتائین در غلظت‌های ۲۰،۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر محلول پاشی شدند. کلیه کشت‌ها در اتاق کشت با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵°C – ۲۳ و نور حدود ۴۵ میکرو مول فوتون بر متر مربع بر ثانیه رشد داده شدند. پس از گذشت ۴ هفته پارامترهای مورد نظر اندازه گیری شد. پس از گذشت ۴ هفته پارامترهای مورد نظر اندازه گیری شد.

وزن تر و خشک گیاهان پس از اندازه گیری وزن جمع تمام گیاهان در یک شیشه بعنوان یک تکرار محاسبه و گزارش گردید. جهت بررسی تغییرات مقدار محتوای کلروفیل، استخراج کلروفیل برگ با استفاده از استون و اندازه گیری آن با کمک روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) به کمک اسپکتروفتومتر مدل AE-UV1600 انجام و در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (۲۰).

$$Chl_a = (12.25\ A663.2) - (2.79\ A646.8)$$

$$Chl_b = (21.21\ A646.8) - (5.1\ A663.2)$$

$$Chl_{a+b} = chla + chlb$$

$$Car = (1000A470 - 1.8\ chla - 85.02\ chlb) / 198$$

جهت اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم، از سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ به عنوان محلول استخراج از نمونه‌های آسیاب شده استفاده شد. سپس عصاره با استفاده از دستگاه شعله سنج مدل Halstead,Essex-corning410 قرائت گردید.مقدار پرولین به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تعیین شد (۷). جهت اندازه‌گیری مقدارگلایسین بتائین به روش Grieve و Grattan (۱۹۸۳) عمل شد. به این منظور ۲۵ میلی گرم بافت گیاهی با اسید سولفوریک ۲ نرمال رقیق گردید. و بعد از اضافه کردن ۰/۲ میلی لیتر معرف $KI-I_2$ سرد به نمونه ها در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس کریستال های ته نشین شده در ۳ میلی لیتر حلال ۱و۲ دی کلرواتان حل شده و جذب محلول در طول موج ۳۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل AE-UV1600 خوانده شد (۱۶). کربوهیدرات محلول نیز با روش فنل – اسیدسولفوریک غلیظ مورد اندازه گیری قرار گرفت (۱۴). کلیه آزمایشات با حداقل ۳ تکرار انجام شده و تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS، آزمون Two-Way ANOVA تحلیل و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون Dancan در سطح ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند و نمودارها به‌وسیله‌ی نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج

اثر گلایسین بتائین بر وزن‌تر و خشک گیاه: تنش شوری موجب کاهش وزن تر و خشک گیاه شد (جدول۱). در مقابل افزایش وزن تر وخشک بر اثر تیمار گلایسین‌بتائین در گیاه تحت تنش شوری مشاهده گردید. نتایج همچنین نشانگر عدم تفاوت معنی داری از نظر رشد تحت تنش شوری و تیمار گلایسین‌بتائین در دو نوع گیاه تراریخت و غیر تراریخت بود.

اثر گلایسین بتائین بر سطح برگ گیاه: با توجه به جدول ۱ نتایج نشان داد که سطح برگ در هر دوگیاه تراریخت و غیرتراریخت با افزایش تنش به طور معنی‌داری کاهش یافت. به طوریکه در گیاهان غیرتراریخت در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۴۷ و ۷۵ و در گیاهان تراریخت به ترتیب ۳۹ و ۷۶/۲ درصد کاهش نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد. در مقابل تیمار گلایسین‌بتائین مقدار سطح برگ گیاهان تحت تنش شوری را افزایش داد. نتایج همچنین نشان دهنده افزایش بیشتر سطح برگ گیاه تراریخت در اثر تیمار گلایسین بتائین نسبت به گیاه غیر تراریخت در شوری ۱۰۰ میلی مولار بود.

اثر گلایسین بتائین بر رنگیزه های فتوسنتزی: نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که میزان رنگیزه های فتوسنتزی تفاوت معنی داری در دو سطح شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار در

دو نوع گیاه تراریخت و غیر تراریخت نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند، در مقابل میزان آنها در اثر تیمار گلایسین‌بتائین کاهش یافت. به طوریکه میزان کلروفیل کل در دو سطح ۲۰ و ۴۰ میلی گرم گلایسین‌بتائین کاهش یافت همچنین بین دو نوع گیاه تحت تنش شوری و تیمار گلایسین‌بتائین تفاوت معنی داری مشاهده نشد. همچنین میزان کاروتنوئید های گیاهان غیر تراریخت در شوری ۲۰۰ میلی مولار کاهش معنی داری نسبت به شوری ۱۰۰ میلی مولار داشته است (جدول ۲).

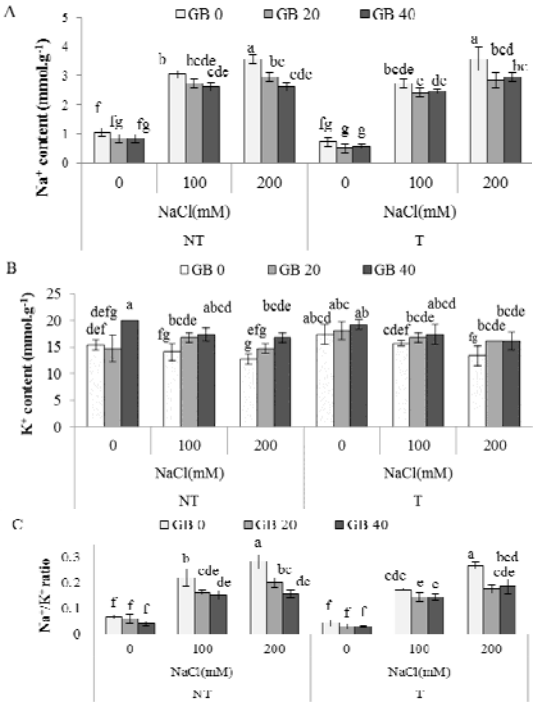
جدول ۱- **اثر تیمار گلایسین‌بتائین** بروزن تر و خشک (gr)، سطح برگ (mm^2) و کلروفیل کل ($mg.g^{-1}fw$) گیاهان غیر تراریخت (NT) و تراریخت (T) تنباکو تحت تنش شوری. . داده‌ها میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

پارامتر		۰GB NT	۲۰GB NT	۴۰GB NT	۰GB T	۲۰GB T	۴۰GB T
وزن تر	۰ salt	۰/۲۶±۰/۰۱cdefg	۰/۴۰±۰/۰۵b	۰/۴۱±۰/۰۳b	۰/۴۱±۰/۰۳b	۰/۵۴±۰/۰۱a	۰/۵۶±۰/۰۱a
	۱۰۰ salt	۰/۲۱±۰/۰۱ghi	۰/۳۰±۰/۰۴cde	۰/۲۳±۰/۰۱gh	۰/۲۳±۰/۰۱gh	۰/۳۰±۰/۰۱cdef	۰/۳۱±۰/۰۳cd
	۲۰۰ salt	۰/۱۲±۰/۰۱j	۰/۱۹±۰/۰۲hi	۰/۱۵±۰/۰۲ij	۰/۱۵±۰/۰۲ij	۰/۲۳±۰/۰۱gh	۰۲۵/±۰/۰۱efgh
وزن خشک	۰ salt	۰/۰۱±۰/۰۱ef	۰/۰۲±۰/۰۱bcd	۰/۰۲±۰/۰۱.cde	۰/۰۲±۰/۰۱.cde	۰/۰۲±۰/۰۱ab	۰/۰۲±۰/۰۱a
	۱۰۰ salt	۰/۰۱±۰/۰۱gh	۰/۰۲±۰/۰۱cde	۰/۰۱±۰/۰۱ef	۰/۰۱±۰/۰۱ef	۰/۰۲±۰/۰۱bcd	۰/۰۲±۰/۰۱bcd
	۲۰۰ salt	۰/۰۱±۱/۰۱i	۰/۰۱±۱/۰۱fg	۰/۰۱±۱/۰۱hi	۰/۰۱±۱/۰۱hi	۰/۰۱±۱/۰۱fg	۰/۰۱±۱/۰۱cdef
سطح برگ	۰ salt	۱۰/۳۳±۰/۴۷de	۱۳/۱۶±۰/۶۲bc	۱۰/۵±۱/۴۷de	۱۰/۵±۱/۴۷de	۱۴/۳۳±۱/۰۲b	۱۷/۱۶±۱/۲۴a
	۱۰۰ salt	۵/۵±۰/۸۱fg	۱۰±۰/۴۰e	۶/۵±۱/۰۸f	۶/۵±۱/۰۸f	۱۲/۱۶±۰/۶۲cd	۱۴/۱۶±۰/۸۴b
	۲۰۰ salt	۳/۶۶±۰/۲۳h	۲/۶۶±۰/۸۴gh	۲/۵±۰/۴۰h	۲/۵±۰/۴۰h	۴/۸±۰/۴۷fg	۶/۵±۰/۴۰h
کلروفیل کل	۰ salt	۲/۹۷±۰/۱۹a	۲/۶۳±۰/۰۱bc	۲/۳۵±۰/۰۵cd	۲/۷۸±۰/۱۱ab	۲/۲۵±۰/۰۷d	۱/۸۷±۰/۲۴e
	۱۰۰ salt	۳/۰۲±۰/۱۲a	۲/۹۱±۰/۱۲ab	۲/۶۰±۰/۱۶bc	۳/۰۴±۰/۰۲a	۲/۳۴±۰/۱۷cd	۲/۶۰±۰/۰۱bc
	۲۰۰ salt	۲/۸۱±۰/۰۷ab	۲/۲۲±۰/۱۳d	۲/۳۲±۰/۰۷cd	۲/۷۴±۰/۰۳ab	۲/۶۱±۰/۰۸bc	۲/۵۹±۰/۰۲bc

جدول ۲- **اثر تیمار گلایسین‌بتائین** برکاروتنوئید ($mg.g^{-1}fw$) گیاهان غیر تراریخت (NT) و تراریخت (T) تنباکو تحت تنش شوری. . داده‌ها میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

پارامتر		۰GB NT	۲۰GB NT	۴۰GB NT	۰GB T	۲۰GB T	۴۰GB T
کاروتنوئید	۰ salt	۷/۲۸±۰/۵۱ab	۶/۴۶±۰/۰۵cde	۵/۸۳±۰/۲۶efg	۵/۲۴±۰/۲۹fghi	۴/۴۱±۰/۵۳j	۳/۶۸±۰/۴۶k
	۱۰۰ salt	۷/۴۲±۰/۴۶a	۶/۹۷±۰/۲۸abc	۶/۵۳±۰/۵۶cde	۵/۹۰±۰/۰۷def	۴/۵۳±۰/۳۲ij	۵/۰۴±۰/۰۳hij
	۲۰۰ salt	۶/۶۰±۰/۱۹bcd	۵/۱۳±۰/۲۲gij	۵/۵۵±۰/۰۷fgh	۵/۴۵±۰/۰۶fgh	۵/۰۷±۰/۱۹hij	۴/۸۸±۰/۲5hij

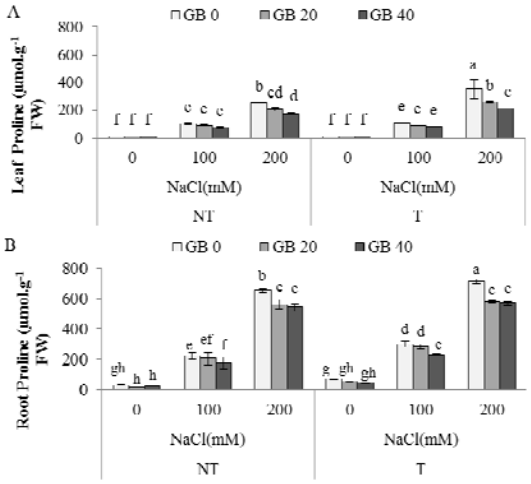
اثر گلایسین بتائین بر میزان سدیم و پتاسیم: باتوجه به شکل ۱ در تنش شوری، میزان سدیم به پتاسیم گیاه افزایش یافت و در شوری ۱۰۰ میلی مولار به همراه گلایسین‌بتائین در گیاهان غیر تراریخت کاهش معنی دار میزان سدیم و افزایش پتاسیم مشاهده شد. در مقابل کاهش میزان سدیم و افزایش پتاسیم توسط هر دو غلظت گلایسین‌بتائین (۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر) در شوری ۲۰۰ میلی مولار در هر دو نوع گیاه غیر تراریخت و تراریخت مشاهده گردید. بین دو نوع گیاه در نمونه های شاهد و شوری ۱۰۰ میلی مولار اختلاف معنی داری در نسبت سدیم به پتاسیم مشاهده شد.



شکل ۱- اثر تیمار گلایسین‌بتائین بر سدیم (A)، پتاسیم (B) و نسبت سدیم بر پتاسیم (C) گیاهان غیر تراریخت (NT) و تراریخت (T) تنباکو تحت تنش شوری. . داده‌ها میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

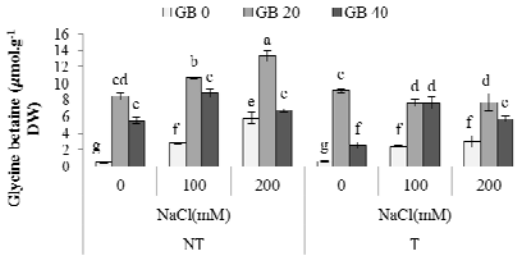
اثر گلایسین بتائین بر میزان پرولین: تنش شوری در هر دو سطح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار سبب افزایش پرولین برگ گردید (شکل ۲). در شوری ۲۰۰ میلی مولار در هر دو دو نوع گیاه تراریخت و غیرتراریخت ، گلایسین بتائین باعث کاهش میزان پرولین برگ شد. به طوریکه میزان پرولین بخش هوایی در گیاهان تراریخت درغلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر گلایسین بتائین به ترتیب ۱/۲۳ و ۱/۲۲ برابر بیشتر از گیاهان غیر تراریخت بود.

میزان پرولین در ریشه گیاهان نیز با افزایش شوری به طور معنی داری افزایش یافت. در مقابل تیمار گلایسین بتائین میزان پرولین را نسبت به گیاهان بدون تیمار کاهش داد. نتایج نشان داد پرولین در گیاهان غیر تراریخت نسبت به تراریخت کاهش معنی دار داشته است. در مجموع میزان پرولین ریشه در گیاهان تراریخت درغلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر گلایسین بتائین به ترتیب ۱/۳۸ و ۱/۳۲ برابر بیشتر از انواع غیر تراریخت در شوری ۱۰۰ میلی مولار بوده است.



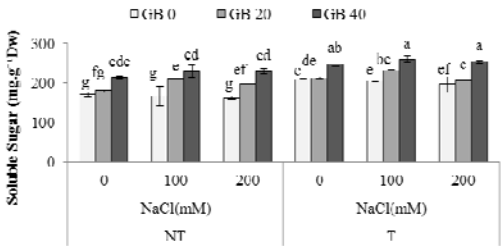
شکل ۲- اثر تیمار گلایسین‌بتائین بر میزان پرولین برگ (A)، ریشه (B) گیاهان غیر تراریخت (NT) و تراریخت (T) تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

اثر گلایسین بتائین بر میزان گلایسین بتائین درونی: بررسی مقدار گلایسین بتائین (شکل ۳) گیاه نشان داد که تیمار های تنش شوری و گلایسین بتائین میزان گلایسین بتائین درونی گیاه را افزایش داده است. علاوه بر این نتایج نشان داد که گیاهان غیر تراریخت در مجموع از میزان گلایسین بتائین درونی بالاتری نسبت به گیاهان تراریخت برخوردار بودند.



شکل ۳- اثر تیمار گلایسین‌بتائین بر میزان گلایسین‌بتائین درونی گیاهان غیر تراریخت (NT) و تراریخت (T) تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

اثر گلایسین بتائین بر قند محلول: با توجه به شکل ۴، با افزایش غلظت نمک، میزان قند های محلول در گیاهان بدون تغییر باقی ماند.کاربرد گلایسین بتائین در شرایط تنش میزان قند محلول را افزایش داد. همچنین افزایش مقدار قند های محلول در گیاهان تراریخت تیمار شده با گلایسین‌بتائین بیشتر از گیاهان غیر تراریخت بود به‌طوریکه در هر دو غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی گرم در لیتر گلایسین‌بتائین با گیاهان تراریخت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.



شکل ۴- اثر تیمار گلایسین‌بتائین بر میزان قند محلول گیاهان غیر تراریخت (NT) و تراریخت (T) تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف غیرمشترک بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد($P<0.05$) .

بحث

نتایج پژوهش حاضر در زمینه بررسی اثر گلایسین بتائین خارجی بر میزان پرولین و همچنین مشارکت این دو ماده در مقابله با تنش نشان داد که تیمار گلایسین‌بتائین در گیاه تراریخت *Nicotiana tabacum* حاوی بیان افزوده ژن *P5CS*، پاسخ این گیاه در مقابل تنش شوری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نتایج نشان داد که تنش شوری وزن تر و خشک گیاه را کاهش می‌دهد. شوری از طریق افزایش غلظت نمک های محلول سبب منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی محیط و در نهایت کاهش جذب آب شده و منجر به کاهش تقسیم و طویل شدن سلول‌ها در منطقه رشد می-گردد(۳). مشابه با نتایج حاضر، Dogan (۲۰۱۳) نیز کاهش وزن تر و خشک گیاه سویا تحت تنش را نشان داد (۱۲). بررسی‌ها نشان می‌دهد که گلایسین‌بتائین با تجمع در سلول‌های گیاه و با حفظ فشار آماس سلول‌ها به توسعه سلولی و رشد گیاه در شرایط تنش کمک می‌کند. علاوه بر این رشد بهتر گیاهان تراریخت در طول تنش شوری را می‌توان به علت فعالیت پرولین بعنوان یک آنتی اکسیدان در حفظ ساختار غشا و در نتیجه کاهش تولید رادیکال های آزاد تحت تنش شوری دانست (۹). یکی از راه کارها دیگر گیاه در زمان وقوع تنش، کاهش سطح برگ می باشد. گلایسین‌بتائین در جهت افزایش آب مورد نیاز سلول و در نهایت تولید انرژی زمینه رشد ، تقسیم سلولی و افزایش سطح برگ در طی تنش شوری را فراهم می‌کند (۹). با این وجود، سازوکار دقیقی که گلایسین‌بتائین از طریق آن تحمل به تنش را القا می‌کند هنوز به خوبی درک نشده است. عدم تفاوت معنی داردر میزان سطح برگ در بین دو گیاه تراریخت و غیر تراریخت را می‌توان مربوط به غلظت های نمک بکار رفته در این مطالعه دانست. بر این اساس شاید بتوان چنین استنباط نمود که این سطوح شوری تأثیری در ایجاد تفاوت بین دو نوع گیاه مذکور نداشته است. نتایج نشان دهنده عدم تغییر میزان کلروفیل گیاه در طی شوری است. این نتیجه در راستای مطالعات پیشین در این زمینه بوده و احتمالاً به شدت و مدت تنش بستگی دارد (۴). در مقابل در مطالعه حاضر، تیمار گیاه با گلایسین بتائین منجر به کاهش معنی دار میزان رنگیزه های فتوسنتزی در گیاهان شد. احتمالاً کاهش میزان رنگیزه های فتوسنتزی توسط گلایسین بتائین خارجی رابطه عکس با افزایش سطح برگ گیاهان داشته است. بنابراین علت این کاهش شاید افزایش حجم و تعداد سلول در اثر تیمار گلایسین بتائین و در نتیجه عدم تناسب سنتز کلروفیل برگ و حجم و تعداد سلول باشد . به عبارت دیگر ممکن است بتوان رقیق شدن میزان رنگدانه ای برگ به دنبال تیمار گلایسین‌بتائین را پیشنهاد نمود (۸). از طرف دیگر کاهش سطح برگ در اثر تنش شوری پدیده شناخته شده است که در بسیاری از گیاهان گلیکوفیت اتفاق می افتد. بنابراین در

تنش شوری شاید بتوان اینطور استنباط نمود که کاهش سطح برگ منجر به تغلیظ کلروفیل می گردد (۱).

تنش شوری می‌تواند با خسارت به غشا و رها سازی یون ها از سلول به فضای بین سلولی بر هموستازی یون پتاسیم و بقا گیاهان اثر گذارد. در این راستا به منظور آزمودن اثر تیمار گلایسین‌بتائین بر القا تحمل گونه *Nicotiana tabacum* میزان یونهای سدیم و پتاسیم پس از تیمار با گلایسین‌بتائین تحت تنش شوری بررسی شد. نتایج نشان داد که تنش شوری میزان سدیم را افزایش و پتاسیم را کاهش داد،که با نتایج گزارش شده توسط Dogan (۲۰۱۳) هماهنگی دارد (۱۳). در پژوهش حاضر گلایسین‌بتائین در تنش شوری باعث کاهش سدیم و افزایش پتاسیم نسبت به گیاه شاهد گردید. اثرات مثبت بکارگیری گلایسین‌بتائین در تنش شوری به اثرات حفاظتی آن بر پراکسیداسیون لیپید غشا و سمیت زدایی رادیکال های آزاد اکسیژن مربوط می-باشد که موجب حفظ هموستازی پتاسیم سیتوزول و کاهش جریان آپویلاستی سدیم می‌شود (۳۰). کم تر بودن میزان نسبت Na^+/K^+ در گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیر تراریخت را می‌توان به عملکرد مستقیم پرولین در پاکسازی ROS تولیدی در تنش و کاهش تخریب غشا ناشی از آن دانست (۳۱). نتایج مشابه در گیاهان تراریخت برنج، گندم و کتان حاوی ژن *P5CS* مشاهده شده است (۳۵).

با افزایش غلظت سدیم کلرید بر مقدار پرولین اضافه گردید، پرولین ترکیبی است که در پاسخ به تنش شوری تمایل به افزایش دارد.البته این مسئله برای تنظیم و تعدیل فشار اسمزی در گیاهان تحت تنش بسیار مهم است(۲). نتایج این آزمایش در هماهنگی با نتایج مطالعات قبلی نشان دهنده افزایش میزان پرولین در برگ و ریشه گیاهان تحت تنش شوری است (۱۳). در این مطالعه کاربرد گلایسین‌بتائین موجب جلوگیری از افزایش بیشتر پرولین در گیاهان گردید. مشابه با نتایج بدست آمده در آزمایشی بر روی گیاهان کلزا نشان داده شد که گلایسین‌بتائین خارجی در شرایط شوری باعث کاهش میزان پرولین می-گردد (۶). در این رابطه گمان می‌رود که جذب گلایسین-بتائین و تجمع آن در گیاه برای مقابله با تنش شوری کافی است. بنابراین نیاز به افزایش بیشتر پرولین را کم می‌کند. چنین عملکردی در مطالعات قبلی به گلایسین‌بتائین در گیاه تنباکو نسبت داده شده است (۱۲). همچنین ممکن است که افزایش میزان پرولین در طول تنش شوری بیشتر به عنوان یک شاخص عکس العملی به شوری، نه تحمل به تنش شوری عمل کند بنابراین کاهش میزان پرولین در اثر کاربرد گلایسین‌بتائین می‌تواند نشان دهنده کاهش اثرات تنش شوری توسط تیمار گلایسین‌بتائین باشد (۵). نتایج مطالعات Rajaeian و Ehsanpour در سال (۲۰۱۷) در بررسی اثر گلایسین‌بتائین بر فعالیت دو ژن *P5CS* و *PDH* در گیاه تنباکو تحت تنش شوری تأیید کننده این فرض می‌باشد. در آن مطالعه گزارش شده است تیمار اتانول امین (پیش ساز بیو سنتز گلایسین‌بتائین) موجب افزایش گلایسین‌بتائین و کاهش فعالیت آنزیم P5CS و افزایش فعالیت PDH (پرولین دهیدروژناز) می‌گردد (۲۶). با استناد به این یافته، احتمالاً کاهش میزان پرولین توسط تیمار گلایسین‌بتائین در هماهنگی با فعالیت آنزیم های مذکور می‌باشد. مسلم است که این فرضیه به آزمایشات دقیق تری نیاز دارد تا نحوه عملکرد دقیق گلایسین‌بتائین روی این دو آنزیم روشن شود. همچنین نتایج نشان دهنده تجمع بیشتر پرولین در ریشه‌های در معرض شوری نسبت به بخش های هوایی می‌باشد. افزایش میزان پرولین ریشه نسبت به برگ ها در گیاه *Prosopis alba* گزارش شده است (۲۲). این امر احتمالاً می‌تواند مربوط به غلظت های Na^+ در محیط باشد. بنابراین در اثر قرار گرفتن ریشه در محیط حاوی غلظت های بالای نمک نسبت به بخش های هوایی از میزان بالاتری از پرولین در ریشه مشاهده می‌شود. البته هنوز این سؤال اساسی بدون پاسخ قطعی باقی مانده است که آیا شوری بیشتر در محیط ریشه منجر به سنتز پرولین

بیشتر در آن شده و یا موجب انتقال بیشتر پرولین از برگ به ریشه شده است. علاوه بر این گمان می‌رود که غلظت های بالای پرولین در ریشه به عنوان ذخیره کربن و نیتروژن عمل کرده (۱۷) و باعث افزایش رشد ریشه در پاسخ به پتانسیل آبی پایین می‌شود. گیاهان تنباکوی تراریخت حاوی ژن *P5CS* در آزمایش ما از میزان پرولین بالاتری نسبت به گیاهان غیر تراریخت برخوردارند و مقاومت بهتری را در تنش شوری نشان می‌دهند. نتایج مشابه دیگر در گیاهان تراریخت سیب زمینی (۱۹)، اطلسی (۳۳) و تنباکو (۲۹) نشان دهنده نقش مهم بیوسنتز پرولین در گیاهان تراریخت در برابر تنش های غیر زیستی می-باشد. نتایج ما نشان می‌دهد که علاوه بر پرولین مقدار گلایسین‌بتائین در طی تنش افزایش می‌یابد و تأییدی بر سمیت زدایی ROS تولید شده از تنش اکسیداتیو توسط گلایسین‌بتائین و حفاظت بسیاری از آنزیم های سیتوپلاسمی و دیگر ماکرومولکول ها در سلول های در معرض تنش است. افزایش غلظت گلایسین‌بتائین درونی در اثر تیمار گلایسین‌بتائین در بسیاری از گیاهان در معرض تنش شوری نیز مشاهده شده است (۲۸). بر اساس نتایج Weretilnyk و همکاران (۱۹۸۹)، *Nicotiana tabacum* جز گیاهان غیر تجمع دهنده گلایسین‌بتائین می-باشند (۳۲). لازم بذکر است که در مطالعه حاضر شناسایی گلایسین بتایین در گیاه تنباکوی مورد مطالعه خلاف این ادعا را اثبات نمود. به هر حال اظهار نظر قطعی در این خصوص نیاز به بررسی های دقیق تری دارد. بنابراین کاربرد برگی گلایسین‌بتائین باعث افزایش تحمل به تنش شوری در این گیاه می‌شود. افزایش غلظت گلایسین‌بتائین درونی در اثر تیمارگلایسین‌بتائین می‌تواند به چند دلیل باشد. به عنوان مثال تنش شوری می‌تواند نقش محرک در بیوسنتز گلایسین‌بتائین درونی داشته باشد، دلیل دیگر جذب و سرعت انتقال اسپری برگی گلایسین‌بتائین است (۲۱) و اینکه عدم متابولیزه شدن این اسمولیت و پایداری آن بعد از کاربرد می‌تواند در افزایش میزان گلایسین‌بتائین درونی گیاه مؤثر باشد (۲۳). میزان گلایسین‌بتائین درونی در تیمار ۴۰ میلی گرم بر لیتر گلایسین‌بتائین نسبت به ۲۰ میلی گرم بر لیتر آن کمتر بود. کاهش غلظت گلایسین-بتائین درونی در این غلظت شاید به این دلیل است که گلایسین‌بتائین در این غلظت بیشتر در مسیر های تولید پروتئین و یا متابولیسم نیتروژن شرکت نموده است (۲۵). بر اساس نتایج بدست آمده، گلایسین‌بتائین در بین گیاهان تراریخت و غیر تراریخت بدون تیمار گلایسین‌بتائین بجز شوری ۲۰۰ میلی مولار تفاوت معنی داری نشان نداد. این نتایج در هماهنگی با نتایج حاصل از میزان پرولین در این زمینه می‌باشد. همچنین غلظت گلایسین‌بتائین درونی در گیاهان تراریخت افزایش کمتری نشان داد. با توجه به اینکه پرولین یکی از مهم ترین مواد اسمولیت سازگار در تنش های محیطی می‌باشد و گیاهان تراریخت حاوی ژن *P5CS* دارای تولید افزوده پرولین می‌باشند بنابراین به نظر می‌رسد گلایسین‌بتائین در این گیاهان به عنوان یک اسمولیت ثانویه بعد از پرولین عمل می‌نماید (۴) به طوریکه میزان گلایسین‌بتائین درونی در این گیاهان نسبت به گیاهان غیر تراریخت کمتر می‌باشد. با وجود اینکه افزایش میزان کربوهیدرات ها به عنوان استراتژی دفاعی در مقابل تنش شوری در گزارشات زیادی عنوان شده است، نتایج ما حاکی از عدم تغییر قند در تنش شوری بدون تیمار گلایسین‌بتائین بود که مشابه با نتایج Morgan در گیاه گندم است (۲۴). علاوه بر این با توجه به اینکه در گیاهان تحت تنش شوری نسبت به نمونه های کنترل کاهش سطح برگ اتفاق افتاده، شاید بتوان بخشی از عدم تغییر میزان کربوهیدارت ها در برگ را به تغلیظ کربوهیدرات ها و احتمالا بخش دیگری را به کاهش فرایند تثبیت کربن و فرایند فتوسنتز نسبت داد. به هر حال اظهار نظر قطعی در این خصوص زمانی میسر است که میزان فتوسنتز گیاه را در این شرایط اندازه گیری نمود. در مقابل وقتی گیاهان تحت تنش شوری با گلایسین‌بتائین تیمار شدند نتایج ما نشانگر تأثیر گلایسین‌بتائین در افزایش میزان کربوهیدرات

های محلول بود که احتمال می‌رود گلایسین‌بتائین با حفاظت از دستگاه فتوسنتزی و رنگدانه های فتوسنتزی در شرایط شوری منجر به افزایش تثبیت CO_2 و در نتیجه افزایش میزان کربوهیدرات های محلول گردیده باشد. در مطالعه حاضر مقدار کربوهیدرات‌های محلول در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت بیشتر بود. در این گیاهان به دلیل وجود تولید افزوده پرولین و عملکرد مشابه با گلایسین‌بتائین در تثبیت CO_2 و بالاتر بودن محتوای کلروفیلی آنها نسبت به گیاهان غیر تراریخت احتمالاً تجمع کربوهیدارت‌ها در آنها بیشتر گردیده است.

نتیجه گیری

در مجموع با توجه به داده‌های این پژوهش، اگرچه کاربرد گلایسین بتائین موجب کاهش میزان پرولین شده است، اما گیاهان تراریخت در مقایسه با انواع غیر تراریخت از کاهش پرولین کمتری برخوردار بوده و اینکه که عملکرد توأم گلایسین‌بتائین و پرولین مرتبط با تجمع پرولین ناشی از بیان افزوده (over expression) ژن *P5CS* در گیاهان تراریخت باعث القا تحمل بیشتری به تنش شوری در این گیاهان گردیده است. با این وجود، بررسی‌های بیشتر و جامع تری به منظور آشکار شدن اثر متقابل این دو اسمولیت بر هم لازم به نظر می‌رسد.

منابع

۱- نجفی ن.، سرهنگ زاده الف.، ۱۳۹۱. اثر شوری کلرید سدیم و غرقاب شدن خاک بر ویژگی‌های رشد ذرت علوفه‌ای در شرایط گلخانه‌ای. مجله علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای، ۱۰ (۳): ۱۵-۱.

۲- جهانبازی گوجانی، ح. حسینی نصر، م. ثاقب طالبی، خ. حجتی، م. ۱۳۹۳. تأثیر تنش شوری بر فاکتورهای رویشی، پرولین، رنگیزه های گیاهی و جذب عناصر در اندام هوایی چهار گونه بادام وحشی. مجله زیست شناسی ایران جلد۲۷، شماره ۵، صفحات ۷۷۷-۷۸۷

۳- عموآقایی، ر. قربان نژاد نی ریزی، ه. مستاجران، ا. ۱۳۹۳. بررسی اثر شوری بر رشد گیاهچه، میزان کلروفیل، محتوای نسبی آب و پایداری غشا در دو رقم کلزا. مجله زیست شناسی ایران جلد ۲۷، شماره ۲، صفحات ۲۶۸-۲۵۶

4- Al Hassan, M., FUERTES, M.M., SÁNCHEZ, F., Vicente, O., Boscaiu, M., 2015. Effects of salt and water stress on plant growth and on accumulation of osmolytes and antioxidant compounds in cherry tomato. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 43:1.

5- Ashraf, M., 1989. The effect of NaCl on water relations, chlorophyll, and protein and proline cont ents of two cultivars of blackgram (Vigna mungo L.). Plant and Soil, 119:205-10.

6- Ashraf, M., Foolad, M., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59: 206-216.

7- Bates, L., Waldren, R., Teare, I., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.

8- Chaum, S., Kirdmanee, C., 2010. Effect of glycinebetaine on proline, water use, and photosynthetic efficiencies, and growth of rice seedlings under salt stress. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 34, 517-527.

9- Chen, T.H., Murata, N., 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Current Opinion in Plant Biology, 5: 250-257.

10- Chen, Z., Cuin, T.A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B.P., Shabala, S., 2007. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects inbarley genotypes contrasting in their salt tolerance. Journal of Experimental Botany 58, 4245-4255.

11- Cherian, S., Reddy, M., Ferreira, R., 2006. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects. Biologia Plantarum, 50, 481-495.

12- Demiral, T., Türkan, I., 2006. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. Environmental and Experimental Botany, 56: 72-79.

13- Doğan, M., 2013. Antioxidative and proline potentials as a protective mechanism in soybean plants under salinity stress.

14- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28:350-356.

15- Ehsanpour, A.A., Fatahian, N., 2003 Effect of salt and proline on Medicago sativa callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 73: 53-56.

16- Grieve, C., Grattan, S., 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant and Soil, 70: 303-307.

17- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments: a review. Plant Signaling & Behavior, 7: 1456-1466.

18- Hu, L., Hu, T., Zhang, X., Pang, H., Fu, J., 2012. Exogenous glycine betaine ameliorates the adverse effect of salt stress on perennial ryegrass. Journal of the American Society for Horticultural Science, 137, 38-46.

19- Khan, M.S., Ahmad, D., Khan, M.A., 2015. Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced abiotic stress tolerance. Electronic Journal of Biotechnology, 18: 257-266.

20- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.

21- Mäkelä, P., Peltonen-Sainio, P., Jokinen, K., Pehu, E., Setälä, H., Hinkkanen, R., Somersalo, S., 1996. Uptake and translocation of foliar-applied glycinebetaine in crop plants. Plant Science, 121: 221-230.

22- Meloni, D.A., Gulotta, M.R., Martínez, C.A., Oliva, M.A., 2004. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in Prosopis alba. Brazilian Journal of Plant Physiology. 46: 39-16

23- Mickelbart, M.V., Chapman, P., Collier-Christian ,L., 2006. Endogenous levels and exogenous application of glycinebetaine to grapevines. Scientia Horticulturae, 111: 7-16.

24- Morgan, J., 1992. Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. Functional Plant Biology, 19: 67-76.

25- Neto, C.O., Lobato, A., Costa, R., Maia, W., Filho, B.S., Alves, G., Brinez, B., Neves, H., Lopes, M.S., Cruz, F., 2009. Nitrogen compounds and enzyme activities in sorghum induced to water deficit during three stages. Plant Soil Environ, 55: 238-244.

26- Rajaeian, S., Ehsanpour, A.A., Javadi, M., Shojaee, B., 2017. Ethanolamine induced modification in glycine betaine and proline metabolism in Nicotiana rustica under salt stress. Biological Plantarum,1-5.

27- Razavizadeh, R., Ehsanpour, A.A., 2009. Effects of salt stress on proline content, expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, and activities of catalase and ascorbate peroxidase in transgenic tobacco plants. Biological Letters, 46: 9–21

28- Rezaei, M.A., Jokar, I., Ghorbanli, M., Kaviani, B., Kharabian-Masouleh, A., 2012. Morpho-physiological improving effects of exogenous glycine betaine on tomato (Lycopersicum esculentum Mill.) cv. PS under drought stress conditions. Plant Omics, 5: 79.

29- Riahi, M., Ehsanpour, A.A., 2013. Responses of transgenic tobacco (Nicotiana plambaginifolia) over-expressing P5CS gene underin vitrosalt stress. Progress in Biological Sciences, 2: 76-84.

30- Sobahan, M.A., Arias, C.R., Okuma, E., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., Hirai, Y., Mori, I.C., Murata, Y., 2009. Exogenous proline and glycinebetaine suppress apoplastic flow to reduce Na+ uptake in rice seedlings. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 73, 2037-2042.

31- Szabados, L., Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science, 15: 89-97.

32- Weretilnyk, E.A., Bednarek, S., McCue, K.F., Rhodes, D., Hanson, A.D., 1989. Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons. Planta, 178: 342-352.

33- Yamada, M., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Yoshiba, Y., 2005. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. Journal of Experimental Botany, 56: 1975-1981.

34- Yang, W.-J., Rich, P.J., Axtell, J.D., Wood, K.V., Bonham, C.C., Ejeta, G., Mickelbart, M.V., Rhodes, D., 2003. Genotypic variation for glycinebetaine in sorghum. Crop Science, 43: 162-169.

35- Zhu, B., Su, J., Chang, M., Verma, D.P.S., Fan, Y.-L., Wu, R., 1998. Overexpression of a Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water-and salt-stress in transgenic rice. Plant Science, 139: 41-48.

The effect of exogenous glycinebetaine on proline and salt tolerance of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plant under *in vitro* culture

Vahid Dastgerdi M. and Ehsanpour A.A.

Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

In the present study, Were evaluated the effects of exogenous glycine betaine on the proline and increasing salt tolerance in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) containing P5CS gen under in vitro salt stress condition with a completely randomized design with three replications. Tobacco plants transferred to MS medium containing 100 and 200 mM NaCl, then foliar application of two glycine betaine concentrations, including 20 and 40 mg L^{-1} were applied on the surface of the plants with four to six leaves. After 4 weeks post treatment results showed that, exogenous glycine betaine under salt stress increased fresh and dry weight, content of K+, leaf area, endogenous glycine betaine and soluble sugar. In contrast, the amount of photosynthetic pigments, proline, content, Na^+ content, and Na^+/K^+ ratio were decreased. The results of this study showed that, exogenous application of glycine betaine in tobacco plants was effective in reducing the negative effects of salt stress and improved growth parameters. It also looks like, communion cooperation of these osmolytes to cope with stress conditions has possibly been occurred. According to the results of this study, that cooperative roles of glycine betaine and proline in membrane stability and reducing the negative effects of salinity in both transgenic and non-transgenic plants it can be suggested.

Key words: Glycine betaine, Proline, *P5CS* gene, Tobacco plants, Salt tolerance