

اثر تنش‌های شوری، خشکی و اسمزی بر بیان ژن کولین مونواکسیژناز (CMO) در آرابیدوپسیس

Effects of Salinity, Drought and Osmotic Stress on Expression Pattern of *Choline Monoxygenase (CMO)* in *Arabidopsis*

زهرا زنگیشه‌ای^۱، لیلا باقری^۱، هومن سالاری^{*۱}

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

Zangishei Z¹, Bagheri L¹, Salari H^{*1}

1- PhD Student, Graduated MSc Student, Assistant Professors, University College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hsalari@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

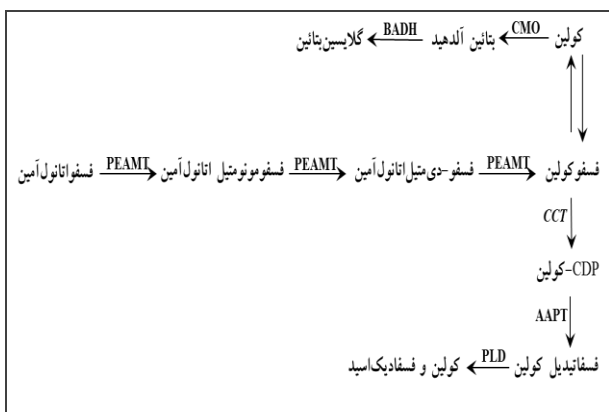
آنزیم کولین مونواکسیژناز یکی از اجزای کلیدی در مسیر بیوشیمیایی سنتز گلايسین بتائين است. این ماده نقش مهمی را در سازگاری تعداد قابل توجهی از موجودات به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند. در گیاهان ساخت گلايسین بتائين شامل اکسیداسیون دو مرحله‌ای کولین است که مرحله نخست آن به وسیله آنزیم کولین مونواکسیژناز کاتالیز می‌شود. براساس اطلاعات موجود در پایگاه داده ژنوم آرابیدوپسیس تالیانا (تارنمای TAIR) این گیاه واجد ژن *AtCMO-like* است که احتمالاً نقش آن رمز کردن آنزیم اکسید کننده کولین به گلايسین می‌باشد. در مطالعه حاضر با بهره‌گیری از روش تجزیه نسبی بیان ژن‌ها به کمک تکنیک *Quantitative Real Time PCR* (qRT-PCR) به ارزیابی تأثیر سطوح مختلف تنش‌های شوری، خشکی و اسمزی بر بروز این ژن در سه اندام گیاه آرابیدوپسیس تالیانا شامل برگ‌های درحال توسعه، برگ‌های توسعه یافته و ریشه پرداخته شد. براساس نتایج به‌دست آمده رفتار ژن *AtCMO-like* در پاسخ به بروز تنش‌های غیرزیستی در اندام‌های مورد بررسی متفاوت بود و عمدتاً الگوی عدم تغییر و یا کاهش بیان را نشان داد. افزایش چشمگیر بیان ژن *AtCMO-like* تنها در پاسخ به اولین سطح تنش شوری و در برگ‌های درحال توسعه و ریشه به‌ترتیب به میزان ۳ و ۱/۹ برابر شاهد مشاهده شد. به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد که ژن *AtCMO-like* نقش چندانی در پاسخ آرابیدوپسیس به سطوح تنش‌های غیرزیستی مورد مطالعه نداشته است.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس تالیانا
تنش‌های غیرزیستی
کولین مونواکسیژناز
گلايسین بتائين
qRT-PCR

مقدمه

آنزیم گزارش شد (Rathinasabapathi et al. 1997). ارزیابی تاثیر تنش‌های غیرزیستی بر القای بیان این ژن در برگ چغندرقد، افزایش سطح mRNA و فعالیت آنزیمی CMO به میزان ۳-۵ برابر در تنش رطوبتی و ۳-۷ برابر در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک و بازگشت به حالت معمول در شرایط حذف هر دو تنش را نشان داد. مشاهده همین وضعیت در برگ‌های تاج خروس نشانگر عدم اختصاص بیان ژن و فعالیت آنزیم CMO به تیره اسفناج بود که پیش‌تر گزارش شده بود (Russell et al. 1998). انتشار توالی کامل ژنوم آرآیدوپسیس در سال ۲۰۰۰ نشان داد که این گیاه واجد یک ژن احتمالی (*CMO-like* (AT4G29890) (شماره دسترسی NM_119135 و CAB43664) برای رمزگذاری آنزیم CMO است. این ژن به لحاظ توالی تشابه بالایی را با دیگر CMOهای گیاهی گزارش شده دارد. با این حال، مطالعات صورت گرفته نشان داده است که عملکرد فیزیولوژیکی پروتئین کدشده توسط این ژن می‌تواند متفاوت از اکسیداسیون کولین باشد (Hibino et al. 2002). ارزیابی عملکرد این ژن در اکسیداسیون کولین نشان داده است که به‌رغم رونویسی این ژن در آرآیدوپسیس، پروتئین متناظری که بتواند در بیوستز بتائین مداخله نماید، قابل شناسایی نیست. این مشاهده با توجه به غیرانباشت‌گر^۴ بودن آرآیدوپسیس قابل توجیه است (Hibino et al. 2002).



شکل ۱- مسیر متابولیکی بیوستز فسفوکولین، کولین، فسفاتیدیل‌کولین و گلایسین‌بتائین در گیاهان عالی (Salari 2008).

محلول‌های حفاظت‌کننده اسمزی^۱ به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های غیرسمی در سیتوپلاسم شناخته می‌شوند. گلایسین‌بتائین از جمله این محلول‌هاست که در بسیاری از گیاهان در پاسخ به اثرات سوء تنش‌های غیرزیستی سنتز شده و انباشت می‌یابد. در سال ۱۹۷۷ فرضیه‌ای مبنی بر تجمع بتائین به‌عنوان یک مکانیسم سازگاری بیوشیمیایی در پاسخ به شوری ارائه شد (Wyn Jones et al. 1997). این فرضیه در مطالعات بعدی و با روشن شدن نقش بتائین به‌عنوان تعدیل‌کننده اسمزی سیتوپلاسمی عمده در گیاهان، به شدت مورد حمایت قرار گرفت (Chen and Murata 2008; Chen and Murata 2011).

سنتز گلایسین‌بتائین شامل اکسیداسیون دو مرحله‌ای کولین است (شکل ۱) (Rathinasabapathi et al. 1997). در گیاهان مرحله نخست این واکنش به‌وسیله یک کولین‌مونواکسیژناز وابسته به فردوکسین^۲ (CMO) کاتالیز می‌شود که به استثنای موقعیت پروکسیزومی گزارش شده در جو، در سایر موارد در استرومای کلروپلاست رخ می‌دهد (Hanson et al. 1985; Mitsuya et al. 2011). از آنجایی‌که آنزیم‌های اکسید کننده کولین در دیگر موجودات به دسته اکسیدازها تعلق دارند، گفته می‌شود که این آنزیم یک اکسیژناز گیاهی غیرمعمول است. مشخصه دیگری که این آنزیم را از مونواکسیژنازهای رایج تیپ Cyt P-450 متمایز می‌سازد این است که یک آنزیم محلول و غیرحساس به کربن مونواکسید است. آنزیم CMO یک دایمر است که از دو زیرواحد یکسان تشکیل شده و در مقایسه با دیگر مونواکسیژنازهای انحلال‌پذیر حاوی آهن فاقد هم^۳، ساختار چهارم به مراتب ساده‌تری دارد. این پروتئین واجد دو موتیف حفاظت شده موسوم به کلاستر Rieseke-type [2Fe-2S] و mononuclear non-heme Fe می‌باشد (Rathinasabapathi et al. 1997).

اولین گزارش مبنی بر همسانه‌سازی و تعیین خصوصیت ژن CMO در اسفناج منتشر شد. در این مطالعه القای CMO در شرایط شوری در نتیجه افزایش بیان ژن و نه افزایش در فعالیت

¹ Osmoprotectants

² Ferredoxin-Dependent Choline Monooxygenase

³ Non-heme Iron

⁴ Non-accumulator

انجام گرفت. بذور ضدعفونی شده پس از ۴۸ ساعت سرمادهی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی کامل کشت شدند. گلدان‌های مورد استفاده از جنس پلی اتیلن شفاف، به قطر و ارتفاع ۹ سانتی‌متر و با گنجایش تقریبی ۱۷۰ گرم خاک بودند. بستر کشت تهیه شده شامل نسبت مساوی حجمی از ورمیکولایت سایز ۳-۰ (کاندیس- ایران) و پیت ماس (ای دی فری پیت- هلند) و ۲ گرم به‌ازای هر لیتر خاک، کود آماده آگرویت (آگلوکن- آلمان) بود. در هر گلدان پنج بذر کشت شد، که در دو نوبت (در مرحله ۴-۳ برگی) از طریق تنک‌کردن به یک گیاه در هر گلدان کاهش یافت. گلدان‌ها به تعداد مساوی در سینی‌هایی به ابعاد ۹۰×۲۵×۵۰ سانتی‌متر و در اتاقک رشدی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳۰ درصد، شدت نور ۱۲۰ میکروانشتین (لامپ فلوروسنت سفید) و طول روز ۱۰ ساعت که در اواخر مرحله رشد به تدریج به ۱۲ ساعت رسانیده شد، نگهداری شدند. آبیاری از کف و با آب شرب شهری انجام شد. بدین منظور هشت سوراخ با فاصله مساوی در لبه مماس بر ته هر گلدان تعبیه شد. آبیاری تا رسیدن به ظرفیت زراعی، هر چهار روز یکبار انجام گرفت.

اعمال هر یک از تنش‌های شوری، اسمزی و خشکی از هفته هفتم و در دو سطح صورت گرفت. تنش‌های شوری و اسمزی همراه با آب آبیاری و تنش خشکی به صورت قطع آبیاری اعمال شد. تنش شوری در دو سطح ۱۰۰ (شوری سطح ۱) و ۱۵۰ (شوری سطح ۲) میلی‌مولار، به مدت ۲۳ روز و با استفاده از NaCl اعمال شد. سطوح تنش اسمزی شامل ۲- بار (اسمزی سطح ۱) و ۴- بار (اسمزی سطح ۲) بود، که با استفاده از دی-مانیتول و در طی ۲۳ روز اعمال شد. تنش خشکی در دو سطح قطع کامل آبیاری به مدت ۱۲ روز (خشکی سطح ۱) و قطع کامل آبیاری به مدت ۱۶ روز (خشکی سطح ۲) اعمال شد. از همین رو، برای هر سطح از تنش خشکی یک تیمار شاهد متناظر در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری‌ها پس از اعمال دوره تنش‌ها انجام گرفت (شکل ۲). از تیمار شاهد متناظر با هر سطح خشکی همزمان با تیمار تنش مربوطه نمونه‌گیری به‌عمل آمد. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع منجمد و تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سه اندام مورد مطالعه شامل برگ‌های درحال

یکی از اهداف اولیه مهندسی متابولیک در گیاهان افزایش مقاومت آن‌ها به تنش‌هاست. سنتز و تجمع حفاظت‌کننده‌های اسمزی^۱ چون گلیسین‌بتائین یکی از راه‌کارهایی است که برخی از گونه‌های گیاهی، موسوم به انباشت‌گران طبیعی حفاظت‌کننده‌های اسمزی، جهت مقابله با انواع مختلفی از تنش‌ها اتخاذ می‌کنند. از همین رو، به‌نظر می‌رسد که مهندسی متابولیک با هدف ارتقا جمع گلیسین‌بتائین در گونه‌های زراعی غیرانباشتگر، روش امیدوارکننده‌ای به‌منظور افزایش تحمل به تنش در این گونه‌هاست. در گام نخست، درک پاسخ‌های گیاهی به شرایط محیط پیرامون به‌منظور شناسایی بهینه راه‌کارهای بهبود تحمل تنش‌های غیرزیستی ضروری است. براساس منابع در دسترس، تاکنون گزارش مستقیمی از چگونگی تغییر در بروز ژن *CMO-like* بر اثر تنش‌های غیرزیستی در گیاه آرابیدوپسیس، به‌عنوان مهم‌ترین گیاه مدل در بررسی‌های زیست‌شناسی، منتشر نشده است. در مطالعه حاضر تلاش شده‌است تا با بهره‌گیری از روش تجزیه نسبی بیان ژن‌ها به‌کمک تکنیک qRT-PCR، چگونگی تاثیر سطوح مختلف تنش‌های شوری، خشکی و اسمزی بر بروز این ژن در سه اندام گیاه آرابیدوپسیس تالیانا شامل برگ‌های درحال توسعه^۲، برگ‌های توسعه یافته^۳ و ریشه مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج این تحقیق و مقایسه آن با مطالعات پیشین این گروه پژوهشی می‌تواند تا حدودی نقش داشتن یا نداشتن این ژن در مسیر تولید گلیسین‌بتائین به‌منظور سازگاری با تنش‌های غیرزیستی را مشخص کند (Zangishei and Salari 2015a; Zangishei and Salari 2015b).

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد. آرابیدوپسیس تالیانا، اکوتیپ Col-0 مورد استفاده گرفت. بذور این اکوتیپ از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایران تهیه شد. ضدعفونی بذور مطابق روش (Weigel and Glazebrook 2002)

¹ Osmoprotectants

² Fast expanding leaves

³ Fully expanded leaves

در سایت NCBI^۱ طراحی شدند (جدول ۱). محل آغازگرها تا حد امکان نزدیک به انتهای ۳' انتخاب شد. به منظور جلوگیری از تکثیر غیراختصاصی ناشی از آلودگی‌های ژنومی، طراحی آغازگرها به نحوی انجام شد که حداقل یکی از دو آغازگر رفتی یا برگشتی در نواحی اگزون پیشین-اگزون پسین^۲ قرار داشته باشد. بازده تکثیر آغازگرها با استفاده از منحنی‌های استاندارد و نیز رگرسیون خطی منحنی تکثیر در نرم‌افزار LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) بررسی شد.

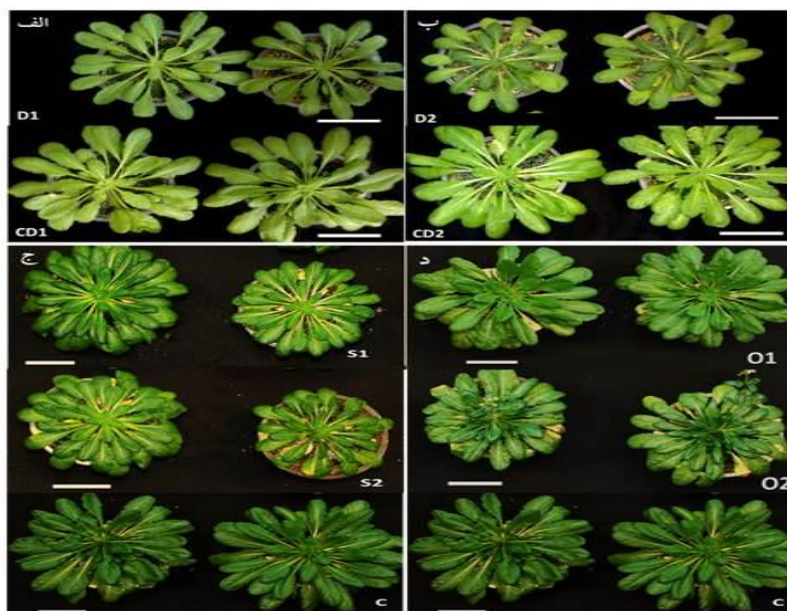
توسعه، برگ‌های توسعه یافته و ریشه بود. هر نمونه آزمایشی متشکل از مخلوط اندام مدنظر از دو گیاه مجزا (تکرار بیولوژیکی) بود. استخراج RNA کل براساس روش پیشنهادی (Botella (1992) et al. انجام گرفت. کیفیت RNA حاصل با بارگذاری در ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شد. مقدار کمی RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA) و بررسی جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. آغازگرهای مورد استفاده از طریق نمایه pick primers

^۱ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

^۲ Exon-exon border

جدول ۱- اسامی آغازگرها و اندازه مورد انتظار قطعات ژن‌های هدف و مرجع

نام آغازگر	ژن هدف	(3' → 5') توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)	اندازه قطعه مورد انتظار (bp)
AtCMO-like_qPCR-F01	<i>AtCMO-like-like</i>	CCTCAATTCTACAGTTTCGAGC	58.4	119
AtCMO-like_qPCR-R01		TCTACATCTCCAAGCCTCCC	59.4	
AtPDF2_Ref-F01	<i>AtPDF2</i>	AATCGGTAGGGAGTGATTTGAGT	53.5	231
AtPDF2_Ref-R01		AGCCAAAAGCACCTCATCGT	51.8	
AtUBC9_Ref-F01	<i>AtUBC9</i>	GGATTGGTTTTTCGATTGCAGAG	53	134
AtUBC9_Ref-R01		ACGGGTCCTGCGCTACA	51.9	
AtYLS8_Ref-F01	<i>AtYLS8</i>	GCAGATGGATGAGGTGCTTG	53.8	212
AtYLS8_Ref-R01		GCTTGTCTTGAGAGCCCAG	55.9	



شکل ۲- وضعیت نمونه‌های آرابیدوپسیس در روز نمونه‌گیری. شامل: الف) خشکی سطح ۱ (D₁) و کنترل خشکی سطح ۱ (CD₁)، ب) خشکی سطح ۲ (D₂) و کنترل خشکی سطح ۲ (CD₂)، ج) شوری سطح ۱ (S₁)، شوری سطح ۲ (S₂) و کنترل (C)، د) اسمزی سطح ۱ (O₁)، اسمزی سطح ۲ (O₂) و کنترل (C). کنترل تنش‌های شوری و اسمزی یکسان می‌باشد. مقیاس (اندازه خط افقی) = ۴/۵cm

al. 2005). دو روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001) با کمک نرم‌افزار آفیس ۲۰۱۰ در محیط اکسل و روش مبتنی بر تصحیح راندمان پافل در نرم‌افزار REST 2009 (Pfaffl et al. 2002) جهت تجزیه داده‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج

ارزیابی مقدار بیان نسبی ژن *AtCMO-like* در تنش‌های شوری، خشکی و اسمزی در مقایسه با شاهد (شرایط بدون تنش) در شکل ۳ نشان داده شده‌است. این نتایج به روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان $2^{-\Delta\Delta CT}$ به دست آمده‌اند.

تنش شوری با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک موجب شده است که بیان *AtCMO-like* در برگ‌های درحال توسعه و ریشه به صورت بسیار معنی‌دار در مقایسه با شاهد افزایش یابد. میزان این افزایش به ترتیب ۳ و ۱/۹ برابر بود. برخلاف این دو اندام، این غلظت نمک موجب کاهش معنی‌دار بیان *AtCMO-like* در برگ‌های توسعه یافته شد. میزان بروز این ژن در این اندام به نصف (۰/۵ برابر) در مقایسه با شاهد کاهش یافت (شکل ۳-الف).

تنش شوری به میزان ۱۵۰ میلی‌مولار رفتار این ژن را در اندام‌های مورد مطالعه در مقایسه با شدت کمتر بسیار تغییر داد. به طوری که برای این سطح شوری تفاوت معنی‌داری بین شاهد و تیمار در اندام‌های هوایی مشاهده نشد. اما در ریشه، این مقدار نمک به کاهش حدود ۸۰ درصدی (۰/۸ برابری) بیان *AtCMO-like* در مقایسه با شاهد منجر شد. کاهش بروز این ژن در ریشه به ویژه در مقایسه با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک که موجب افزایش ۱/۹ برابری بروز آن شده بود، بسیار چشمگیر است. مقایسه بروز *AtCMO-like* در دو سطح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک نشان می‌دهد که بروز این ژن رفتار متفاوتی را در برابر غلظت‌های مختلف نمک از خود نشان می‌دهد. (شکل ۳-الف).

نکته قابل توجه در بررسی حاضر آن بود که تنش خشکی بروز *AtCMO-like* را در هیچ سطحی و هیچ اندام بررسی شده‌ای افزایش نداد. دوره ۱۲ روزه تنش خشکی در مقایسه با شرایط

به این منظور جفت آغازگر مربوط به هر ژن در یک واکنش qRT-PCR که شامل یک سری رقت ۱۰ واحدی (۲۵ نانوگرم تا ۲۵ پیکوگرم) از یکی از نمونه‌های RNA بود، وارد شدند. سپس محاسبه راندمان هر پرایمر به کمک شیب خط منحنی استاندارد مربوطه و براساس رابطه $E = 10^{-(1/\text{slope})-1}$ صورت گرفت (Pfaffl et al. 2002). این روش همچنین جهت تعیین غلظت مطلوب RNA در تجزیه‌های qRT-PCR به کار رفت و غلظت ۲۵ نانوگرم به عنوان مقدار مطلوب RNA در واکنش‌های بعدی انتخاب شد. جهت ارزیابی راندمان آغازگرها در نرم‌افزار LinRegPCR مستقیماً از مقادیر چرخه آستانه^۱ (CT) حاصل از واکنش‌های qRT-PCR اصلی استفاده شد. اندازه‌گیری بیان کمی ژن‌ها به روش qRT-PCR با استفاده از کیت تک مرحله‌ای (SG (EURx, Poland) OneStep qRT-PCR و در دستگاه ترموسایکلر (Rotor-GeneQ, Corbett Research, Australia) صورت گرفت. براساس پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده در برنامه واکنش ابتدا یک مرحله ۳۰ دقیقه‌ای در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد جهت رونویسی معکوس^۲ در نظر گرفته شد. سپس qRT-PCR با یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه شروع و پس از آن ۴۰ سیکل شامل سه مرحله متوالی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. در پایان و به منظور دستیابی به منحنی ذوب، آغازگرها در محدوده دمایی ۶۰-۹۵ درجه سانتی‌گراد طی یک مرحله ذوب شدند. بررسی کیفیت آغازگرها و اختصاصی بودن تکثیر محصول هدف، بعد از هر دور qRT-PCR و به کمک تجزیه منحنی‌های ذوب انجام شد. مقادیر CT توسط نرم‌افزار دستگاه (rotor-gene_1_7_87) به روش Point Fit و براساس منحنی‌های استاندارد تولید شده، تعیین شد. در وارد کردن داده‌ها و انجام تجزیه‌های آماری، میانگین مقادیر CT حاصل از ۳ تکرار فنی برای هر نمونه به کار گرفته شد. جهت نرمال کردن داده‌ها از میانگین ژئومتریک مقادیر CT سه ژن مرجع *AtPDF2*^۳، *AtUBC9*^۴ و *AtYLS8*^۵ استفاده شد (Czechowski et al.

¹ Threshold cycle

² Reverse transcription

³ Protodermal factor 2

⁴ Ubiquitin conjugating enzyme 9

⁵ Yellow-leaf-specific gene 8

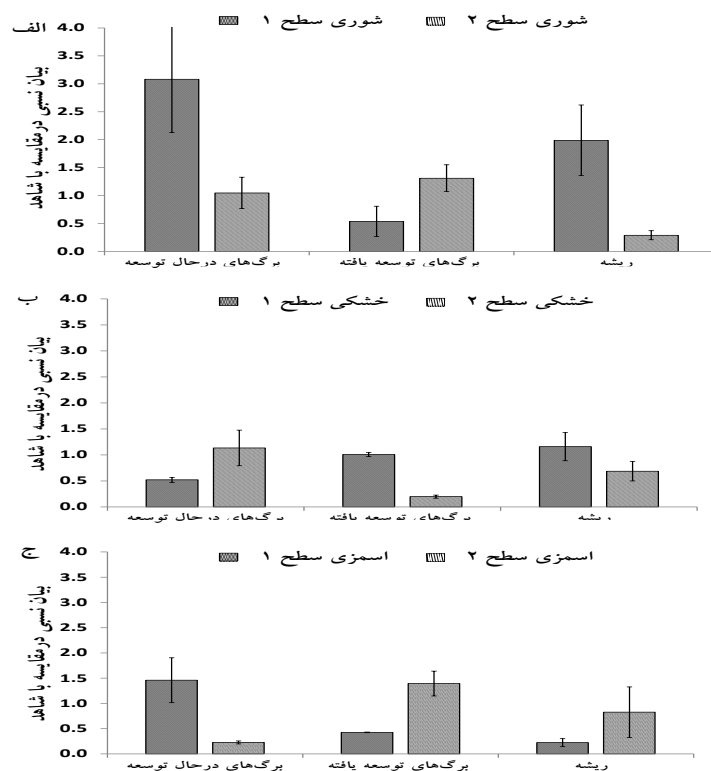
⁶ $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\Delta\Delta CT = CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{normal}}$

اسمزی بیش‌تر (۴- بار) کاملاً متفاوت بود. بیان این ژن در برگ‌های درحال توسعه و ریشه به‌ترتیب به ۲۰ درصد (۰/۲ برابر) و ۸۰ درصد (۰/۸ برابر) درمقایسه با شاهد کاهش یافت. اما این مقدار تنش اسمزی بیان ژن *AtCMO-like* در برگ‌های توسعه یافته را در مقایسه با شرایط بدون تنش تا حدود ۱/۴ برابر افزایش داد (شکل ۳-ج).

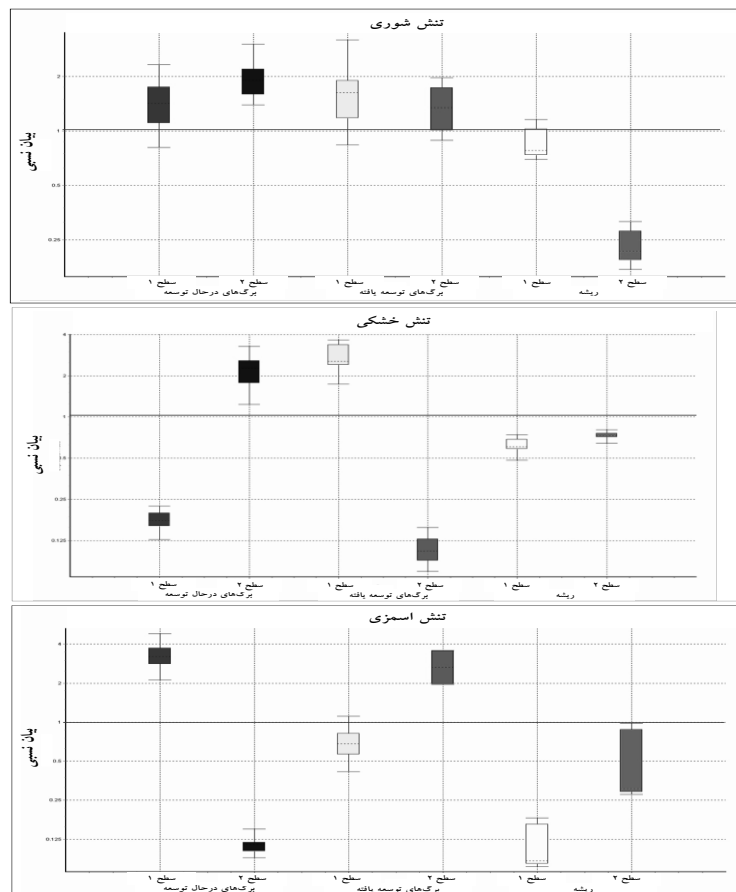
به‌طور کلی، می‌توان گفت که ژن *AtCMO-like* در گیاه آرابیدوپسیس بسته به نوع تنش غیرزیستی، شدت تنش و نوع اندام مورد بررسی متفاوت رفتار می‌کند. با این حال عمدتاً رفتار مشاهده شده به شکل عدم تغییر و یا کاهش بیان می‌باشد. تنها افزایش قابل توجه مشاهده شده در بروز ژن *AtCMO-like* مربوط به تنش شوری با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک و برای برگ‌های درحال توسعه و ریشه بود (شکل ۳).

آنالیز داده‌ها به روش مبتنی بر تصحیح راندمان پافل نتایج حاصل از روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان $2^{\Delta\Delta CT}$ را نسبتاً تایید می‌کند (شکل ۴).

بدون تنش (شاهد) تنها موجب کاهش ۵۰ درصدی (۰/۵ برابری) بیان این ژن در برگ‌های درحال توسعه شد. این سطح خشکی هیچ تغییری در بروز *AtCMO-like* در مقایسه با شاهد در سایر اندام‌ها ایجاد نکرد. تنش خشکی ۱۶ روزه تاثیری در بروز این ژن در برگ‌های در حال توسعه نداشت، اما موجب کاهش بروز ۸۰ درصدی (۰/۸ برابری) در برگ‌های توسعه یافته و ۲۰ درصدی (۰/۲ برابری) در ریشه شد. کاهش ۰/۸ برابری بسیار معنی‌دار و کاهش ۰/۲ برابری معنی‌دار بود. به‌نظر می‌رسد که افزایش مدت خشکی رابطه نسبی بیان این ژن بین برگ‌های درحال توسعه و ریشه را معکوس می‌نماید (شکل ۳-ب). بیان ژن *AtCMO-like* در پاسخ به تنش اسمزی نشان داد که، ۲- بار و ۴- بار پتانسیل اسمزی نتوانسته در مقایسه با شرایط بدون تنش افزایش بسیار معنی‌داری در بیان این ژن در اندام‌های مورد بررسی ایجاد کند. تنش اسمزی ۲- بار موجب افزایش ۱/۵ برابری بیان ژن *AtCMO-like* در برگ‌های درحال توسعه شد. این درحالیست که بیان آن در برگ‌های توسعه یافته و ریشه به ترتیب تا ۶۰ درصد (۰/۶ برابر) و ۸۰ درصد (۰/۸ برابر) در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد. رفتار این ژن در اندام‌های مورد مطالعه در شدت تنش



شکل ۳- الگوی تغییر بیان کمی ژن *AtCMO-like* در پاسخ به سطوح تنش‌های شوری، خشکی و اسمزی. الف: تنش شوری. ب: تنش خشکی. ج: تنش اسمزی.



شکل ۴- بیان کمی ژن *AtCMO-like* در برگ‌های درحال توسعه، برگ‌های توسعه یافته و ریشه، در پاسخ به سطوح تنش‌های شوری، خشکی و اسمزی، به روش مبتنی بر تصحیح راندمان پافل. باکس‌ها نشان‌دهنده ۵۰ درصد مشاهدات، خطوط نقطه‌چین نشان‌دهنده میانه بیان ژن، و خطوط دنباله نشان‌دهنده ۲۵ درصد بیشینه و ۲۵ درصد کمینه مشاهدات هستند. بیان ژن‌ها در کالیبراتور (شاهد) معادل ۱ در نظر گرفته می‌شود، که به وسیله خط مبنا مشخص شده‌است.

prostrata تیمار شده با NaCl دو درصد نیز گزارش شده‌است؛ به‌طوری که به رغم افزایش ۵ برابری در بخش‌های جوان اندام‌های هوایی، بیان ژن در ریشه تنها ۲ برابر افزایش داشته است (Wang and Showalter 2004). علاوه بر ژن *CMO*، تفاوت معنی‌دار در مقدار نسبی بیان در مقایسه اندام‌های هوایی و ریشه آرابیدوپسیس برای شمار دیگری از ژن‌ها هم چون *DREB2A* و *RD29A* و به هنگام اعمال تنش‌های غیرزیستی گزارش شده‌است (Ma et al. 2006). از این رو، تنوع مشاهده شده برای رفتار ژن *AtCMO-like* در مواجهه با تنش‌ها و اندام‌های مورد بررسی در این پژوهش توجیه پذیر است.

نکته قابل توجه دیگر در نتایج این آزمایش، عدم مشاهده الگوی افزایشی در القای بیان ژن *AtCMO-like* در برگ‌های توسعه یافته به هنگام مواجهه با سه تنش غیرزیستی مورد بررسی است. این مشاهده در چگونگی القای بافتی بیان ژن *AtCMO-like* با ارزیابی

بحث

داده‌های این پژوهش نشان می‌دهد تغییر نسبی بروز ژن *AtCMO-like* در اثر تنش‌های بررسی شده در اندام‌های مورد مطالعه متفاوت است. چنین رفتاری برای ژن *CMO* در گیاهان دیگر نیز مشاهده شده‌است. به‌عنوان مثال بررسی‌های صورت گرفته در ریشه و اندام هوایی علف شور دوست *Kochia scoparia* افزایش بسیار شدید بیان ژن *KsCMO* را در پاسخ به تنش شوری نشان می‌دهد. این افزایش تا ۱۰ برابر پس از ۳ ساعت اعمال تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار بوده است. نکته قابل توجه آنست که الگوی افزایش نسبی بیان این ژن در اندام‌های مورد بررسی یکسان نبوده و مقدار آن در ریشه در مقایسه با اندام هوایی به مراتب کمتر بوده است. همین رفتار با شدت کمتر در پاسخ به تنش‌های اسمزی و خشکی هم تکرار شده‌است (Kalinina et al. 2012). این الگو در بیان ژن *CMO* در گیاهچه‌های *Atriplex*

برای آن محتمل باشد. شایان گفتن است غیرانباشتگر بودن آرابیدوپسیس برای محلول سازگاری گلايسين‌بتائين (Hibino et al. 2002) می‌تواند این فرضیه را تقویت نماید.

همانطور که پیش‌تر اشاره شد، در مطالعه حاضر بیان ژن *AtCMO-like* در پاسخ به تنش خشکی و اسمزی تغییر زیادی نکرد. این تنش‌ها نه تنها افزایش بسیار معنی‌داری را در سطح بیان این ژن در اندام‌های مورد بررسی ایجاد نمودند، بلکه در مواردی موجب کاهش سطح بیان در مقایسه با شرایط بدون تنش نیز شدند. به‌عنوان مثال، افزایش مدت تنش خشکی بیان ژن *AtCMO-like* را در ریشه کاهش داد. آگاهی از رفتار ژن بالا دستی (*AtNMT1*) و ژن پائین دستی (*AtALDH9*) برای ژن *AtCMO-like* در مسیر سنتز گلايسين‌بتائين به‌هنگام مواجهه با تنش خشکی در توجیه این رفتار راهگشاست. پژوهشگران این مطالعه پیش‌تر نشان داده‌اند که بروز ژن‌های *AtNMT1* و *AtALDH9* در اثر تنش خشکی در ریشه کاهش نسبی می‌یابد (Zangishei and Salari 2015a; Zangishei and Salari 2015b). کاهش بیان ژن بالادستی *AtNMT1* به‌هنگام افزایش زمان خشکی در ریشه موجب محدودیت سنتز کولین و فسفوکولین می‌شود که پیش‌ماده‌های مورد نیاز ژن *AtCMO-like* در مسیر بیوسنتز گلايسين‌بتائين هستند (شکل ۱). بنابراین کاهش سنتز این ترکیبات منجر به بی‌نیازی به فعالیت آنزیم‌ها و بیان ژن‌های پائین دستی یعنی *AtCMO-like* و *AtALDH9* می‌شود.

مقدار بیان *AtCMO-like* برای برگ‌های درحال توسعه در تنش ۱۶ روزه خشکی اگر چه در مقایسه با شاهد متناظر افزایشی نمی‌یابد، اما در مقایسه با زمان کمتر تنش خشکی اندکی افزایش نشان می‌دهد. این رفتار با رفتار ژن‌های *AtNMT1* و *AtALDH9* مشابه است، ولی نکته قابل توجه آنست که مقدار نسبی این افزایش برای *AtCMO-like* در مقایسه با این دو ژن دیگر بسیار کمتر است. پیشنهاد شده‌است که عدم تجمع گلايسين‌بتائين در گیاهان غیرانباشتگر با فقدان CMO عملکردی در آن‌ها مرتبط است (Nuccio et al. 1998; Hibino et al. 2002; Luo et al. 2007; Yu et al. 2014). برخی مطالعات آرابیدوپسیس را گیاهی غیرانباشتگر گلايسين‌بتائين گزارش کرده‌اند. لذا افزایش ناچیز بروز ژن *AtCMO-like* در برگ‌های در حال توسعه می‌تواند با این

الگوی بیان ژن‌های بالادستی (*AtNMT1*) و پائین دستی آن (*AtALDH9*) در مسیر بیوسنتز فسفوکولین و گلايسين‌بتائين قابل تفسیر است. پیش‌تر نشان داده شده‌است که بیان این ژن‌ها در تنش خشکی و در برگ‌های توسعه یافته کاهش نسبی می‌یابد. لذا این فرضیه مطرح شده‌است که احتمالاً مسیر بیوسنتز فسفوکولین و گلايسين‌بتائين در برگ‌های توسعه یافته از مکانیسم‌های اصلی مواجهه با تنش نباشد (Zangishei and Salari 2015a; Zangishei and Salari 2015b). با این حال شواهد ژنتیکی که بتواند مستقیماً این فرضیه را تأیید کند در دست نیست؛ اگرچه اشاره شده‌است که تنها برگ‌های جوان و ریشه اندام‌های هدف برای سنتز گلايسين‌بتائين در برخی گیاهان هستند (Yamada et al. 2015). سنتز گلايسين‌بتائين در اندام دیگر یعنی برگ‌های درحال توسعه و انتقال آن به برگ‌های توسعه‌یافته، فرضیه دیگری است که می‌تواند عدم القای بیان ژن‌های فوق به‌هنگام مواجهه با تنش‌های غیرزیستی مورد مطالعه در برگ‌های توسعه یافته را توجیه کند؛ اما اثبات این موضوع نیازمند تجزیه بیان ژن‌های گلايسين‌بتائين ترانسپورتر و پروتئین‌های رمزگذاری شده این ژن‌ها در آرابیدوپسیس است. این فرضیه پیش‌تر در گیاهان انباشتگر و مقاوم به شوری یا خشکی مانند *Atriplex gmelin* به اثبات رسیده است (Tsumumi et al. 2015).

سوال دیگری که نتایج این پژوهش ایجاد می‌نماید آنست که چرا با وجود القای نسبتاً چشمگیر بیان ژن *AtCMO-like* در پاسخ به برخی غلظت‌های تنش شوری و در برخی اندام‌ها، همین روند در پاسخ به دو تنش دیگر تکرار نشده‌است و رفتار این ژن در پاسخ به این تنش‌ها عمدتاً منفعلانه و غیرافزایشی است؟ به‌نظر می‌رسد این تفاوت ممکن است ناشی از سمیت سدیم باشد که در تنش شوری رخ می‌دهد و ماهیت آن با دو تنش خشکی و اسمزی متفاوت است. با این حال براساس شواهد پیش‌تر منتشر شده، ژن *CMO* در مسیر تولید گلايسين‌بتائين نقش داشته و گزارشی مبنی بر نقش آن در پاسخ به سمیت‌های شیمیایی در دسترس نیست. مشاهدات ما این فرضیه را محتمل می‌نماید که ژن *AtCMO-like* ممکن است رفتار اکسیداسیونی نداشته و در تولید گلايسين‌بتائين حداقل در برخی اندام‌ها نقشی ایفا نماید و یا علاوه بر نقش احتمالی آن در مسیر بیوسنتز گلايسين‌بتائين نقش‌های دیگری هم

گزارشات پیشین که حاکی از القای نسبتاً بالای بیان این ژن در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی در سایر گیاهان می‌باشد، مطابقت ندارد. این دوگانگی با توجه به ماهیت احتمالی غیرانباشتگر بودن گیاه آرابیدوپسیس (Hibino et al. 2002). و در نظر گرفتن تفاوت این گیاه به لحاظ قابلیت پاسخ‌گویی به تنش‌ها با دیگر گیاهان بررسی شده که عمدتاً مقاوم به خشکی و شوری و همچنین انباشتگر گلاسیسین‌بتائین هستند، دور از ذهن نیست. با این حال کلیه نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نیازمند بررسی‌های بیشتر در قالب آزمایشات افزایش و کاهش بیان ژن *AtCMO-like* از طریق دست‌کاری‌های ژنتیکی می‌باشد که این گروه تحقیقاتی آن را مورد توجه قرار داده است. ارزیابی فعالیت آنزیم *AtCMO-like* و محتوای درونی گلاسیسین‌بتائین نیز می‌تواند در تایید و حصول اطمینان از صحت نتایج حاصل از این آزمایش موثر باشد. حضور عناصر مرتبط با پاسخ به تنش^۱ در نواحی تنظیمی بالادست ژن *AtCMO-like* نیز که در گونه‌های مقاوم به تنش‌های غیرزیستی شایع است، جای بررسی در آرابیدوپسیس دارد.

¹ Stress response-related elements

منابع

Botella J, Schlagnhauser A, Phillips A (1992) Identification and characterization of a full-length cDNA encoding for an auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylated synthase from etiolated bean hypocotyl segments and expression of its mRNA in response to indole-3-acetic acid. *Plant Molecular Biology* 20:425-436.

Chen THH, Murata N (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science* 13: 499-505.

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

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WF (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139:5-17.

Hanson AD, May AM, Grumet R, Bode J, Jamiesont GC, Rhodest D (1985) Betaine synthesis in chenopods: Localization in chloroplasts. *Botany* 82:3678-3682.

Hibino T, Waditee R, Araki E, Ishikawa H, Aoki K, Tanaka Y, Takabe T (2002) Functional characterization of

گزارش‌ها همسو باشد و نقش کلیدی ژن یا آنزیم *AtCMO-like* در تنظیم سنتز گلاسیسین‌بتائین در گیاهان انباشتگر یا غیر انباشتگر گلاسیسین‌بتائین را نشان دهد. مشاهدات پژوهش ما نیز می‌تواند به استدلال برای غیرانباشتگر بودن گیاه آرابیدوپسیس کمک کند.

آزمایشات ما نشان داد بیان ژن *AtCMO-like* تنها در پاسخ به تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار و در برگ‌های در حال توسعه و ریشه افزایش بسیار معنی‌دار می‌یابد. برخلاف انتظار، افزایش بیان نسبتاً زیاد این ژن در این اندام‌ها در سطح شوری شدیدتر (۱۵۰ میلی‌مولار) کاهش یافت، تا آنجا که در ریشه به کمتر از شاهد رسید. قابل توجه است که چنین رفتاری برای این ژن در برخی گیاهان دیگر نیز مشاهده شده است. به‌عنوان مثال در کشت سوسپانسیون علف شور دوست *Kochia scoparia* نیز کاهش بیان ژن در پاسخ به افزایش شدت تنش شوری گزارش شده است (Kalinina et al. 2012). شاید دلیل این امر این باشد که در تنش‌های شدید عملکرد متابولیکی گیاه مختل می‌شود.

براساس نتایج این پژوهش به‌طور کلی می‌توان گفت ژن *AtCMO-like* تغییر زیادی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و سطوح آن نشان نداد. این نتایج اگرچه توجیه‌پذیر است اما با اکثر

choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* 277:41352-41360.

Kalinina EB, Keith BK, Kern AJ, Dyer WE (2012) Salt- and osmotic stress-induced choline monooxygenase expression in *Kochia scoparia* is ABA-independent. *Biologia Plantarum* 56:699-704.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25:402-408.

Luo D, Niu X, Wang Y, Zheng W, Chang L, Wang Q, Wei X, Yu G, Lu BR, Liu Y (2007) Functional defect at the rice choline monooxygenase locus from an unusual post-transcriptional processing is associated with the sequence elements of shortdirect repeats. *New Phytology* 175:439-447.

Ma S, Gong Q, Bohnert HJ (2006) Dissecting salt stress pathways. *Journal of Experimental Botany* 57:1097-1107.

Mitsuya S, Kuwahara J, Ozaki K, Saeki E, Fujiwara T, Takabe T (2011) Isolation and characterization of a novel

- peroxisomal choline monooxygenase in barley. *Planta* 234:1215-1226.
- Nuccio ML, Russell BL, Nolte KD, Rathinasabapathi B, Gage DA, Hanson AD (1998) The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *The Plant Journal* 16:487-496.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 36.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* 339:62-66.
- Rathinasabapathi B, Burnet M, Russell BL, Gage DA, Liao P, Nye GJ, Scott P, Golbeck JA, Hanson AD (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Plant Biology* 94:3454-3458.
- Russell BL, Rathinasabapathi B, Hanson AD (1998) Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiology* 116:859-865.
- Tsutsumi K, Yamada N, Cha-um S, Tanaka Y, Takabe T (2015) Differential accumulation of glycinebetaine and choline monooxygenase in bladder hairs and lamina leaves of *Atriplex gmelini* under high salinity. *Journal of Plant Physiology* 176:101-107.
- Wang LW, Showalter AM (2004) Cloning and salt-induced, ABA-independent expression of choline mono-oxygenase in *Atriplex prostrata*. *Physiologia Plantarum* 120:405-412.
- Weigel D, Glazebrook J (2002) *Arabidopsis, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Wyn Jones RG, Storey R, Leigh RA, Ahmad N, Pollard A (1977) A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In E Marr and, O Ciferri, eds, *Regulation of Cell Membrane Activities in Higher Plants*. Elsevier/North Holland, Amsterdam 121-136.
- Yamada N, Takahashi H, Kitou K, Sahashi K, Tamagake H, Tanaka Y, Takabe T (2015) Suppressed expression of choline monooxygenase in sugar beet on the accumulation of glycine betaine. *Plant Physiology and Biochemistry* 96:217-221.
- Yu J, Li Y, Tang W, Liu J, Lu BR, Liu Y (2014) The accumulation of glycine betaine is dependent on choline monooxygenase (oscmo), not on phosphoethanolamine n-methyltransferase (ospeamt1), in rice (*oryza sativa*. ssp. japonica). *Plant Molecular Biology Report* 32:916-922.
- Zangishei Z, Salari H (2015a) Monitoring the Expression Pattern of Genes Coding Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) Enzymes in *Arabidopsis*. *Journal of Modern Genetics* 11:349-356. (In Farsi).
- Zangishei Z, Salari H (2015b) Monitoring the Expression Pattern of Genes encoding S-adenosyl-L-methionine: phosphoethanolamine N-methyltransferase (PEAMT) enzyme in *Arabidopsis* under Drought Stress. *Journal of Cellular and Molecular Researches* 28:539-550. (In Farsi).