

اثر تنش خشکی بر بیان ژن‌های رمزگذار آنزیم‌های خانواده بتائین آلدهیددهیدروژناز (BADH) در آرابیدوپسیس

Monitoring the Expression Pattern of Genes Coding Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) Enzymes in Arabidopsis under Drought Stress

زهرا زنگیشه‌ای^۱، هومن سالاری^{*۱}

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

Zangishei Z¹, Salari H^{*1}

1- MSc Student, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant breeding,
Razi University, Kermanshah, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۹)

چکیده

محلول‌های محافظت‌کننده به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی غیرسمی در سیتوپلاسم شناخته می‌شوند. گلايسين بتائين از مهم‌ترین این ترکیبات است که در بسیاری از گیاهان در پاسخ به اثرات سوء تنش‌های غیرزیستی سنتز شده و تجمع می‌یابد. در برخی از گونه‌هایی که به‌عنوان انباشت‌کننده طبیعی گلايسين بتائين طبقه‌بندی می‌شوند، در شرایط تنش، کولین طی یک مسیر دو مرحله‌ای ساده توسط آنزیم‌های کولین‌مونواکسیژناز (CMO) و بتائین آلدهیددهیدروژناز (BADH) به گلايسين بتائين اکسید می‌شود. براساس اطلاعات موجود در پایگاه داده ژنوم آرابیدوپسیس (تارنمای TAIR) ژن‌های احتمالی *AtALDH8* و *AtALDH9* آنزیم‌های اکسید-کننده بتائین به گلايسين بتائين را در گیاه آرابیدوپسیس رمز می‌کنند. در مطالعه حاضر با بهره‌گیری از روش آنالیز نسبی بیان ژن‌ها به کمک تکنیک (Quantitative RealTime PCR (qRT-PCR به ارزیابی تأثیر دو سطح قطع آبیاری بر الگوی بیان دو ژن *AtALDH8* و *AtALDH9* در سه اندام برگ‌های درحال توسعه، برگ‌های توسعه یافته و ریشه در آرابیدوپسیس پرداخته شد. مشاهدات نشان داد که رفتار این دو ژن در مواجهه با تنش خشکی متفاوت است. به رغم این که بیان ژن *AtALDH8* چندان متأثر از تنش و نوع اندام نبود، میزان بیان ژن *AtALDH9* بسیار به این فاکتورها وابسته بود. درحالی که بیان *AtALDH9* در پاسخ به ۱۲ روز قطع آبیاری در برگ‌های توسعه یافته بدون تغییر بود، در برگ‌های درحال توسعه به حدود ۰/۷ برابر شاهد کاهش و در ریشه تا نزدیک به چهار برابر آن افزایش یافت. در رفتاری متفاوت، پس از ۱۶ روز قطع آبیاری بیان این ژن در برگ‌های در حال توسعه تقریباً به ۲/۵ برابر در مقایسه با شاهد افزایش و در برگ‌های توسعه یافته و ریشه با کاهش روبرو و به حدود ۰/۲ برابر شاهد رسید. به‌طور کلی به نظر می‌رسد که *AtALDH9* ازوفرم مؤثر در شرایط مواجهه با تنش خشکی در آرابیدوپسیس است.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس تالیانا
بتائین آلدهیددهیدروژناز
تنش خشکی
گلايسين بتائين
qRT-PCR

مقدمه

گیاهان در محیط رشد طبیعی خود اغلب طیف وسیعی از شرایط نامطلوب از قبیل خشکی، شوری، یخ‌زدگی، گرما و نور شدید را تجربه می‌کنند. مجموع این شرایط نامطلوب که در اصطلاح تنش‌های غیرزیستی نامیده می‌شوند، بیان واکنش‌های متفاوتی را در گیاه به دنبال دارد (Chen and Murata 2002). این واکنش‌ها می‌تواند در گستره تغییر در بیان ژن‌ها، تغییر در وقوع واکنش‌ها در مسیرهای متابولیکی سلول، تغییر در رفتارهای فیزیولوژیکی گیاه و در نهایت تغییر در رشد و عملکرد آن نمایان شود. تغییر در بیان شماری از ژن‌ها در اثر تنش به اثبات رسیده است (Kasuga et al. 1999). یکی از شایع‌ترین پاسخ‌های گیاهی به اثرات سوء تنش‌های غیرزیستی سنتز ترکیباتی موسوم به محلول‌های محافظت‌کننده است¹ که از آن‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی در سیتوپلاسم یاد می‌شود. این ترکیبات مولکول‌هایی کوچک و خنثی هستند که در غلظت بالا سمیت ندارند، و بدون ایجاد هرگونه اختلال در فرآیندهای متابولیکی سلول، در جهت افزایش پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم عمل می‌کنند. گلیسین‌بتائین² از مهم‌ترین این محلول‌هاست که در بسیاری از گیاهان در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی سنتز و انباشت می‌شود. نتایج بسیاری از پژوهش‌ها نشان می‌دهد که تجمع سیتوپلاسمی گلیسین‌بتائین عمده‌ترین تطابق بیوشیمیایی است که گیاهان انباشت‌کننده³ آن در شرایط شوری و خشکی اتخاذ می‌کنند (Wyn et al. 1997; Chen and Murata 2008). گلیسین‌بتائین از فتوسیستم II و کمپلکس‌های پروتئینی حفاظت کرده و هم‌چنین به عنوان نگهدارنده غشاء سلولی و زدا کننده اکسیژن‌های فعال ایفای نقش می‌کند (Chen and Murata 2008). بیوسنتز گلیسین‌بتائین شامل اکسیداسیون دو مرحله‌ای کولین⁴ است که طی آن ابتدا کولین به بتائین آلدهید⁵ و سپس بتائین آلدهید به گلیسین‌بتائین تبدیل می‌شود (Rathinasabapathi et al. 1997). در گیاهان، مرحله دوم این واکنش به‌وسیله یک بتائین آلدهیددروژناز وابسته به NAD⁶

کاتالیز می‌شود که خود به سوپرخانواده ALDH تعلق دارد. این آنزیم‌ها می‌توانند درجه تخصص‌گرایی بالا برای بتائین آلدهید یا میل ترکیبی گسترده‌تری را برای طیف وسیعی از آمینوآلدهیدها نشان دهند. اکثر گیاهان واجد بیش از یک نوع ایزوفرم برای این آنزیم هستند (Fitzgerald et al. 2009). با توجه به گستردگی و تنوع ALDHها، عملکردهای مختلفی برای این آنزیم‌ها شناسایی و گزارش شده‌است با این حال هنوز شناخت دقیقی از عملکرد بیوشیمیایی آن‌ها در دست نیست. رایج‌ترین جنبه مورد توجه در مطالعات صورت‌گرفته پیرامون BADHهای گیاهی به نقش آن‌ها در بهبود تحمل تنش‌های غیرزیستی مربوط است (Fitzgerald et al. 2009).

براساس گزارش‌های موجود، القای ژن‌های ALDH در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی به شیوه‌های متفاوتی انجام می‌گیرد (Kirch et al. 2004). نخستین بار، (Weretilnyk et al. 1989) افزایش چندین واحدی در سطح mRNA کدکننده BADH اسفناج را در تنش شوری گزارش کردند. براساس اطلاعات موجود در پایگاه داده ژنوم آرابتدوپسیس تالیانا⁷ (تارنمای TAIR) ژنوم آرابتدوپسیس واجد دو ژن احتمالی *AtALDH8* و *AtALDH10A8* و *AtALDH9* است که دو عضو از خانواده پروتئینی ALDH10 را که به‌ترتیب به لوکوپلاست و پراکسی‌زوم هدایت می‌شوند، رمز می‌کنند (Missihoun et al. 2011). آنالیز تجمع رونوشت این دو ژن به روش RNA بلا‌تینگ و بیان نیمه کمی در پاسخ به تیمار آب‌سزیک اسید و تنش‌های شوری، دهیدراسیون، سرما و اکسیداتیو القای ضعیف ژن *AtALDH8* را نشان داده است در حالی‌که، سطوح رونوشت ژن *AtALDH9* در پاسخ به این تیمارها افزایش یافته است (Missihoun et al. 2011).

به‌رغم این‌که اثرات عمومی تنش‌های غیرزیستی بر جنبه‌های گوناگون رشدی و فیزیولوژیکی گیاهان به تفصیل مورد مطالعه قرار گرفته اما اثرات اولیه آن‌ها بر سطوح بیوشیمیایی و مولکولی به خوبی شناسایی نشده‌است. با توجه به محدودیت سطوح قابل کشت و به‌منظور بهبود تولید، معرفی گیاهانی که قادر به تحمل شرایط نامطلوب باشند حائز اهمیت است. از این رو، درک

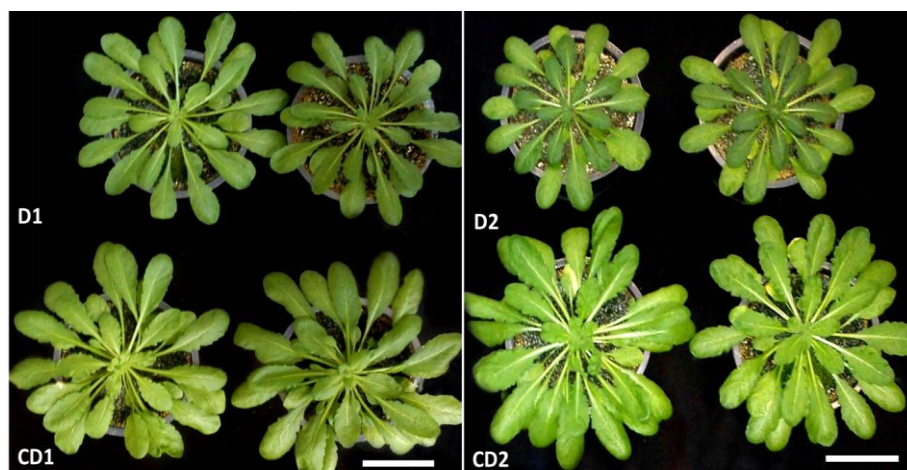
¹ Compatible solutes/ osmoprotectants² Glycine betaine³ GB accumulators⁴ Choline⁵ Betaine aldehyde⁶ NAD-dependent betaine aldehyde dehydrogenase⁷ <https://www.arabidopsis.org/>

به قطر و ارتفاع نه سانتی‌متر از جنس پلی اتیلن شفاف و با گنجایش تقریبی ۱۷۰ گرم خاک مورد استفاده قرار گرفت. جهت آبیاری هشت سوراخ با فاصله مساوی در لبه ماس بر ته هر گلدان تعبیه شد. در هر گلدان پنج بذر کشت و در دو نوبت (در مرحله ۴-۳ برگی) از طریق تنک‌کردن به یک گیاه در هر گلدان کاهش یافت. خاک مورد استفاده نسبت مساوی حجمی از ورمیکولایت سایز ۳-۳ صفر (کاندیس- ایران) و پیت ماس (ای دی فری پیت- هلند) و ۲ گرم به‌ازای هر لیتر خاک، کود آماده آگرویت (آگلوکن- آلمان) بود. گلدان‌های آماده شده برای هر سطح، در سینی‌هایی به ابعاد ۹×۲۵×۵۰ سانتیمتر و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت 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 با آب شرب شهری از کف و تا رسیدن به ظرفیت زراعی، هر چهار روز یک‌بار انجام شد. تنش خشکی از هفته هفتم و در دو سطح تنش خشکی سطح یک (قطع کامل آبیاری به مدت ۱۲ روز) و تنش خشکی سطح دو (قطع کامل آبیاری به مدت ۱۶ روز) اعمال و سپس نمونه‌گیری انجام شد. از تیمار شاهد متناظر با هر سطح تنش همزمان با تیمار تنش مربوطه نمونه‌گیری به عمل آمد (شکل ۱).

پاسخ‌های گیاهی به شرایط محیط پیرامون و شناسایی راه‌کارهای بهبود تحمل تنش‌های غیرزیستی یکی از حوزه‌های مهم در مطالعات زیستی به شمار می‌رود. براساس اطلاعات در دسترس، تاکنون از چگونگی تغییر در بیان دو ژن *ALDH8* و *ALDH9* بر اثر قطع آبیاری در گیاه آراییدوپسیس به‌عنوان مهم‌ترین گیاه مدل در بررسی‌های زیست‌شناسی گزارشی منتشر نشده‌است. در مطالعه حاضر برای نخستین بار تلاش شده تا با بهره‌گیری از روش آنالیز نسبی بیان ژن‌ها به کمک تکنیک qRT-PCR، چگونگی تاثیر دو دوره قطع آبیاری بر بیان ژن‌های *AtALDH8* و *AtALDH9* در سه اندام گیاه آراییدوپسیس شامل برگ‌های در حال توسعه، برگ‌های توسعه یافته و ریشه مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کلیه آزمایشات در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد. در این پژوهش اکوتیپ Col-0 گیاه آراییدوپسیس که بذور آن از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایران تهیه شده بود مورد استفاده قرار گرفت. این بذور پس از استریل کردن مطابق روش پیشنهادی Weigel and Glazebrook (2002) به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی کامل و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سرمادهی شدند. گلدان‌هایی



شکل ۱- وضعیت نمونه‌های آراییدوپسیس در روز نمونه‌گیری. خشکی سطح ۱ (D1) و کنترل خشکی سطح ۱ (CD1). خشکی سطح ۲ (D2) و

کنترل خشکی سطح ۲ (CD2). مقیاس (اندازه خط افقی) = ۴/۵cm

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

نام آغازگر	ژن هدف	توالی آغازگر (3' → 5')	دمای اتصال (°C)	اندازه قطعه مورد انتظار (bp)
AtALDH8_qPCR-F02	<i>AtALDH8</i>	TGGAAGTTTCGCCACAGGAA	57.3	85
AtALDH8_qPCR-R01		GCTCTCCCACCAAGTTCCA	59.4	
AtALDH9_qPCR-F01	<i>AtALDH9</i>	AGGAGTTCGTCCTGAGCATT	57.3	120
AtALDH9_qPCR-R01		TTCACACACAGAGCAGGACC	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		GCTTGTCTTGAGAGCCAG	55.9	

Rotator-Gene Q,) و در دستگاه ترموسایکلر (EURx, Poland) انجام گرفت. براساس پروتکل کیت، در برنامه واکنش ابتدا یک مرحله ۳۰ دقیقه‌ای در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد جهت رونویسی معکوس^۳ در نظر گرفته شد. سپس qRT-PCR با یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه 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، یک مرحله ذوب به منظور دستیابی به منحنی ذوب آغازگرها در محدوده دمایی ۹۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. بررسی کیفیت آغازگرها و اختصاصی بودن تکثیر محصول هدف، بعد از هر دور qRT-PCR و به کمک تجزیه منحنی‌های ذوب صورت گرفت. مقادیر چرخه آستانه^۴ (CT) به روش Fit Point توسط نرم‌افزار دستگاه (-rotor gene_1_7_87) و براساس منحنی‌های استاندارد تولید شده، تعیین شد. در وارد کردن داده‌ها و انجام تجزیه‌های آماری، میانگین مقادیر CT حاصل از سه تکرار فنی برای هر نمونه به کار رفت. به منظور نرمال کردن داده‌ها، از میانگین هندسی مقادیر CT سه ژن مرجع *AtPDF2*، *AtUBC9* و *AtYLS8* استفاده شد (Czechowski et al. 2005). داده‌ها با دو روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2011) در

استخراج RNA از نمونه‌های برگ و ریشه آراییدوپسیس براساس روش (Botella et al. 1992) انجام شد. کیفیت و کمیت RNAهای حاصل با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA) تعیین شد. طراحی آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش با استفاده از نمایه pick primers در سایت NCBI^۱ صورت گرفت (جدول ۱). این آغازگرها تا آنجاکه ممکن بود نزدیک به انتهای^۲ انتخاب شدند. طراحی آغازگرها به صورتی انجام شد که حداقل یکی از دو آغازگر در نواحی آگزون پیشین-آگزون پسین^۲ قرار داشته باشد. بنابراین برای هیچ‌یک از ژن‌ها تکثیر الگوهای غیراختصاصی ناشی از آلودگی‌های ژنومی احتمالی صورت نگرفت. مقادیر راندمان تکثیر آغازگرهای هدف و رفرنس با استفاده از منحنی‌های استاندارد مشخص و همچنین، به کمک رگرسیون خطی منحنی تکثیر و توسط نرم‌افزار LinRegPCR (Ramakers et al. 2003) تایید شد. جهت تعیین راندمان‌ها با استفاده از منحنی استاندارد، یک‌سری رقت ۱۰ واحدی (۲۵ نانوگرم تا ۲۵ پیکوگرم) از یکی از نمونه‌های RNA آماده شد. راندمان پرایمرها براساس رابطه $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ محاسبه شد (Pfaffl et al. 2002). این روش همچنین جهت تعیین غلظت مطلوب RNA در آنالیزهای qRT-PCR به کار رفت به طوری که، غلظت ۲۵ نانوگرم به‌عنوان مقدار مطلوب RNA در واکنش‌های بعدی تعیین شد. اندازه‌گیری بیان کمی ژن‌ها به روش qRT-PCR با استفاده از کیت تک مرحله‌ای qRT-PCR OneStep SG

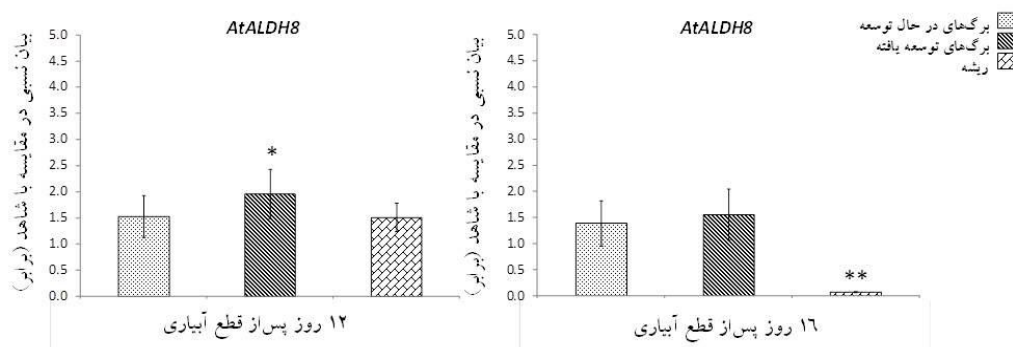
³ Reverse transcription⁴ Threshold cycle⁵ $(2^{-\Delta\Delta CT})$, $\Delta CT = CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{normal}}$ ¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>² Exon-exon border

تنش موجب کاهش بسیار ناچیز بیان این ژن در برگ‌های توسعه یافته می‌شود و در برگ‌های در حال توسعه نیز بیان این ژن تا حدود ۰/۷ برابر شاهد کاهش می‌یابد. با افزایش مدت تنش به ۱۶ روز افزایش چشم‌گیری در بیان ژن *AtALDH9* در برگ‌های در حال توسعه قابل مشاهده بود تا آنجا که بیان آن به ۲/۵ برابر شاهد رسید. این درحالی‌است که افزایش مدت قطع آبیاری موجب کاهش بیان این ژن به حدود ۰/۲ برابر شاهد در برگ‌های توسعه یافته شد. اثر تنش بر بیان این ژن در ریشه الگوی متفاوتی دارد. ۱۲ روز قطع آبیاری بیان این ژن را تقریباً به میزان چهار برابر در مقایسه با شرایط بدون تنش افزایش داد، اما افزایش این زمان به ۱۶ روز به‌طور چشمگیری موجب کاهش بیان این ژن در ریشه شد به نحوی که میزان بیان آن پس از اعمال ۱۶ روز تنش در مقایسه با شرایط بدون تنش به حدود ۰/۲ رسید.

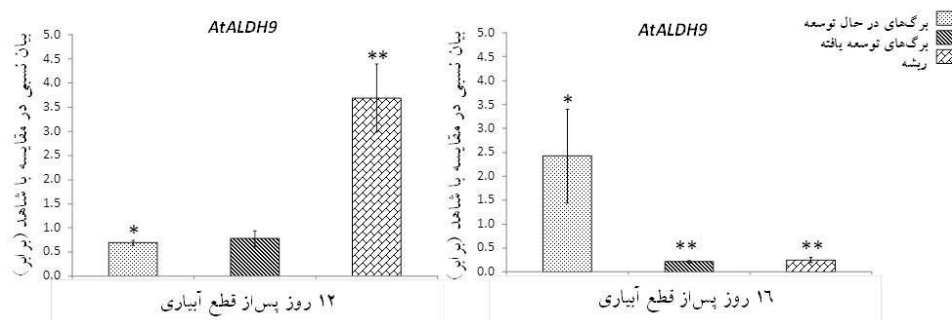
در محیط Excel و روش مبتنی بر تصحیح راندمان پافل در نرم-افزار REST 2009 (Pfaffl et al. 2002) آنالیز شدند.

نتایج و بحث

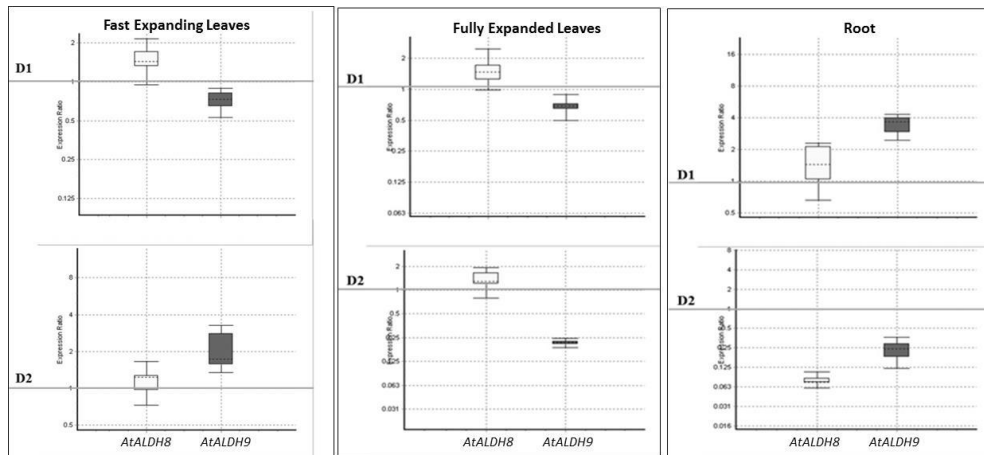
نتایج بررسی به روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان $2^{-\Delta\Delta CT}$ در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده‌است. بررسی الگوی تغییر بیان ژن *AtALDH8* نشان داد که ۱۲ روز قطع آبیاری و افزایش این زمان به ۱۶ روز نتوانسته در مقایسه با شرایط بدون تنش افزایش محسوسی را در بیان ژن *AtALDH8* در دو اندام هوایی ایجاد کند. ۱۲ روز قطع آبیاری در ریشه نیز همانند اندام‌های هوایی موجب تغییر در بیان این ژن نشد اما افزایش این مدت به ۱۶ روز بیان این ژن را در ریشه در مقایسه با شرایط بدون تنش شدیداً کاهش داد و تقریباً به صفر رساند (شکل ۲). درخصوص ژن *AtALDH9* مشاهده شد که ۱۲ روز قطع آبیاری در مقایسه با شرایط بدون



شکل ۲- الگوی تغییر بیان کمی در پاسخ به خشکی برای ژن *AtALDH8* در اندام‌های مختلف. اندام‌های مورد مطالعه شامل برگ‌های در حال توسعه، برگ‌های توسعه یافته و ریشه است، که در دو بازه زمانی ۱۲ و ۱۶ روزه پس از اعمال تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. *** = تفاوت بسیار معنی‌دار نسبت به شاهد، * = تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد.



شکل ۳- الگوی تغییر بیان کمی در پاسخ به خشکی برای ژن *AtALDH9* در اندام‌های مختلف. اندام‌های مورد مطالعه شامل برگ‌های در حال توسعه، برگ‌های توسعه یافته و ریشه است، که در دو بازه زمانی ۱۲ و ۱۶ روزه پس از اعمال تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. *** = تفاوت بسیار معنی‌دار نسبت به شاهد، * = تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد.



شکل ۴- بیان کمی دو ژن *AtALDH8* و *AtALDH9* در برگ‌های در حال توسعه (Fast Expanding L.)، برگ‌های توسعه یافته (Fast Expanded L.) و ریشه (Root)، در دو بازه زمانی ۱۲ (D1) و ۱۶ (D2) روزه پس از قطع آبیاری، 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 معادل ۱ در نظر گرفته می‌شود، که به وسیله خط مبنا مشخص شده‌است.

به شوری، بیان *BADH2* تحت تاثیر تنش قرار نگرفته است (Fitzgerald et al. 2009). احتمالاً تفاوت مشاهده شده در پژوهش حاضر برای بیان ژن‌های این خانواده در ریشه، برگ‌های توسعه یافته و برگ‌های در حال توسعه آراییدوپسیس با القای مختص به بافت این ژن‌ها در ارتباط است. به حداقل رسیدن میزان بیان هر دو ژن به هنگام مواجهه با ۱۶ روز قطع آبیاری در ریشه را می‌توان ناشی از این موضوع دانست که احتمالاً مسیر متابولیکی تولید گلايسين بتاين که محصول این دو ژن در آن دخالت دارد، در شرایط تشدید عدم دسترسی به آب چندان فعال نیست. همچنین می‌توان گفت دلیل رفتار متفاوت ریشه با اندام‌های هوایی می‌تواند به جهت آن باشد که ریشه نخستین اندامی است که با تنش مواجه می‌شود. به نظر می‌رسد این نتایج با نتایج مطالعات (Tasseva et al. 2004) که اظهار داشته‌اند مسیر CDP-کولین و بیوستنز فسفاتیدیل کولین نسبت به مسیر متیلاسیون کولین و بیوستنز گلايسين بتاين در پاسخ به تنش‌های مختلف غیرزیستی در آراییدوپسیس اهمیت بیشتری دارد مطابقت داشته باشد. بنابراین کاهش بیان دو ژن *AtALDH8* و *AtALDH9* در شرایط تشدید عدم دسترسی به آب ممکن است به دلیل غلبه مسیر CDP-کولین نسبت به مسیر متیلاسیون کولین و عدم سنتز گلايسين بتاين در ریشه باشد. براساس نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که بیان ژن *AtALDH8* چندان تحت تأثیر

به نظر می‌رسد که افزایش مدت قطع آبیاری رابطه نسبی بیان این ژن بین برگ‌های در حال توسعه و ریشه را معکوس می‌کند (شکل ۳). به طور کلی، می‌توان گفت که رفتار دو ژن خانواده *AtALDH* در مواجهه با تنش خشکی متفاوت است (شکل‌های ۲ و ۳). نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها به روش مبتنی بر تصحیح راندمان پافل تایید کننده نتایج حاصل از روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان $2^{-\Delta\Delta CT}$ بود (شکل ۴).

با توجه به تعدد همولوگ‌های *BADH* گیاهی، گزارش‌های متعددی پیرامون افزایش بیان آن‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی وجود دارد با این حال نشان داده شده که القای آن‌ها می‌تواند مختص به بافت باشد (Fitzgerald et al. 2009). در جو دیده شده که تنش خشکی و شوری موجب افزایش بیان این ژن‌ها می‌شود با این حال، در تنش شوری بیان *BADH1* در برگ در سطح پایینی قرار دارد و در ریشه به شدت افزایش می‌یابد، این درحالی‌ست که افزایش بیان *BADH2* در برگ با شدت نسبتاً بیش‌تری از ریشه اتفاق افتاده است (Nakamura et al. 1997). در تحقیق انجام گرفته بر روی گیاه شاه‌پسند مشاهده شده که سطح رونوشت یکی از همولوگ‌های *BADH* به واسطه شوری هم در ریشه و هم در برگ افزایش یافته در حالی که همولوگ دیگر مستقل از تنش عمل می‌کند (Hibino et al. 2001). در برگ برنج هم مشاهده شده‌است که علی‌رغم افزایش بیان *BADH1* در پاسخ

کوتاه‌تر قطع آبیاری در ریشه افزایش می‌یابد درحالی‌که با افزایش زمان تنش این تغییر در برگ‌های درحال توسعه مشاهده می‌شود. افزایش بیان این ژن در بررسی حاضر سازگار با گزارشی است که نشان می‌دهد پروتئین نوترکیب *AtALDH9* قادر به متابولیزه کردن بتائین‌آلدهیدها و همین‌طور دو آمینوآلدهید دیگر در شرایط تنش در گیاه آراییدوپسیس است (Missihoun et al. 2011; Stiti et al. 2011). بر این اساس می‌توان گفت که فرآورده این ژن در بیوستنز گلایسین‌بتائین هم می‌تواند نقش داشته باشد. با توجه به نتایج این آزمایش و مطالعات قبلی به نظر می‌رسد که *AtALDH9* ایزوفرم *ALDH* مفروض مؤثر در مواجهه با تنش خشکی در آراییدوپسیس است. بر این اساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کدشده توسط این ژن‌ها در شرایط مشابه با شرایط این آزمایش و همچنین ارزیابی بیان این ژن‌ها در شرایط رفع تنش (آبیاری مجدد) ضروری به نظر می‌رسد.

تنش خشکی نیست. این نتیجه می‌تواند سازگار با نتایج مطالعات (Missihoun et al. 2011) باشد. آن‌ها با استفاده از آنالیز تجمع رونوشت ژن‌های *AtALDH8* و *AtALDH9* (به‌روش RNA بلاتینگ و بیان نیمه کمی) در پاسخ به تیمار آب‌سبزیک اسید و تنش‌های شوری، دهیدراسیون، سرما و اکسیداتیو القای ضعیف این ژن‌ها را نشان دادند (Missihoun et al. 2011). هم‌چنین گروه پژوهشی فوق با استفاده از موتانت‌های *aldh8* و گیاهان تیپ وحشی و بررسی آن‌ها در تنش‌های شوری و دهیدراسیون نشان دادند که احتمالاً فرآورده این ژن در مسیری متفاوت از مسیر بیوستنز گلایسین‌بتائین فعالیت دارد. آن‌ها پیشنهاد کردند که احتمالاً این ژن بیش از آن‌که در پاسخ به تنش نقش داشته باشد، در تنظیم هموستازی سلول دخالت دارد (Missihoun et al. 2011; Stiti et al. 2011). در این مطالعه هم‌چنین مشاهده شد که قطع آبیاری الگوی بیان ژن *AtALDH9* را در اندام‌های مورد مطالعه بسیار تغییر داده است به‌طوری‌که بیان این ژن در زمان

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 (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 250-257.
Chen THH, Murata N (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science* 13: 499-505.
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.
Fitzgerald TL, Waters DLE, Henry RJ (2009) Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biology* 11:119-130.
Hibino T, Meng YL, Kawamitsu Y, Uehara N, Matsuda N, Tanaka Y, Ishikawa H, Baba S, Takabe T, Wada K, Ishii T, Takabe T (2001) Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk) Vierh. *Plant Molecular Biology* 45: 353-363.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
<https://www.arabidopsis.org/>

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17: 287-291.
Kirch HH, Bartels D, Wei Y, Schnable PS, Wood AJ (2004) The ALDH gene superfamily of Arabidopsis. *Trends Plant Science* 9: 371-377.
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.
Missihoun TD, Schmitz J, Klug R, Kirch HH, Bartels D (2011) Betaine aldehyde dehydrogenase genes from Arabidopsis with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta* 233: 369-382.
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.
Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, Tsutsui K, Oguri Y, Fukui K, Takabe T (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant Journal* 11:1115-1120.
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.

Stiti N, Missihoun TD, Kotchoni SO, Kirch H, Bartels D (2011) Aldehyde dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis. *Plant Science* 2: 65.

Tasseva G, Richard L, Zachowski A (2004) Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 566: 115-120.

Weretilnyk EA, Bednarek S, McCue KF, Rhodes D, Hanson AD (1989) Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons. *Planta* 178: 342-352.

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.

Monitoring the Expression Pattern of Genes Coding Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) Enzymes in *Arabidopsis* under Drought Stress

Zahra Zangishei¹, Hooman Salari^{*1}

1- MSc Student, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant breeding, Razi University, Kermanshah, Iran

* Corresponding Author, Email: hsalari@yahoo.com

ABSTRACT

Compatible solutes or osmoprotectants serve as nontoxic solutes for cytoplasmic osmoregulation. Glycine betaine is one of the most critical compatible solutes accumulated by many plants in response to adverse effects of various abiotic stresses. In some species named Glycine betaine accumulators, Glycine betaine is synthesized by a two-step oxidation of choline by choline monooxygenase (CMO) and betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) enzymes. According to the *Arabidopsis thaliana* genome database (TAIR) there are the most likely two *AtALDH8* and *AtALDH9* genes coding BADH enzyme. In this study, using the relative expression analysis *via* quantitative Real-Time PCR, it has been evaluated how the expression pattern of these genes affected by drought levels in *Arabidopsis thaliana* tissues including fast expanding leaves, fully expanded leaves, and roots. It has been denoted that the mRNA induction level of the *AtALDH9* gene varies in tissues in response to drought levels. However, the expression of *AtALDH8* gene is affected negligibly by these factors. While 12-day of water withholding made no changes in the expression level of *AtALDH9* gene in fully expanded leaves, the expression level of the gene were changed at about 0.7-fold and 4-fold in fast expanding leaves and roots, respectively. Differently, after 16-day of water withholding the expression level of *AtALDH9* gene rose about 2.5-fold in fast expanding leaves and reduced about 0.2-fold in both fully expanded leaves and roots. Generally, it seems that *AtALDH9* is the gene accountable in *Arabidopsis* in response to drought stress.

Key Words

Arabidopsis thaliana, drought stress, betaine aldehyde dehydrogenase, glycine betaine, qRT-PCR