ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٦
صفحه ٥٧٦ - ٥٦٧

اثر تنش‌های شوری، خشکی و اسمزی بر بیان ژن کولین‌مونواکسیژناز (*CMO*) در آرابیدوپسیس

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

زهرا زنگیشه‌ای[1]، لیلا باقری[1]، هومن سالاری[*1]

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

Zangishei Z[1], Bagheri L[1], 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: ۹٦/۲/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹٦/۵/۱۷)

چکیده

آنزیم کولین‌مونواکسیژناز یکی از اجزای کلیدی در مسیر بیوشیمیایی سنتز گلایسین‌بتایین است. این ماده نقش مهمی را در سازگاری تعداد قابل توجهی از موجودات به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند. در گیاهان ساخت گلایسین‌بتایین شامل اکسیداسیون دو مرحله‌ای کولین است که مرحله نخست آن به وسیله آنزیم کولین‌مونواکسیژناز کاتالیز می‌شود. براساس اطلاعات موجود در پایگاه داده ژنوم آرابیدوپسیس تالیانا (تارنمای TAIR) این گیاه واجد ژن *AtCMO-like* است که احتمالا نقش آن رمز کردن آنزیم اکسید کننده کولین به گلایسین می‌باشد. در مطالعه حاضر با بهره‌گیری از روش تجزیه نسبی بیان ژن‌ها به‌کمک تکنیک (qRT-PCR) Quantitative Real Time PCR به ارزیابی تاثیر 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 عمدتا 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
کولین‌مونواکسیژناز
گلایسین‌بتائین
qRT-PCR

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]

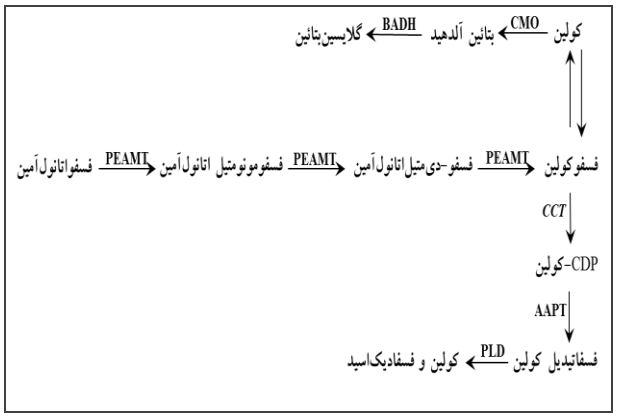
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]

مقدمه

محلول‌های حفاظت‌کننده اسمزی[1] 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 مبنی‌بر 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 گلایسین‌بتایین شامل اکسیداسیون دو مرحله‌ای کولین است (شکل ۱) (Rathinasabapathi et al. 1997). در گیاهان مرحله نخست این واکنش به‌وسیله یک کولین‌مونواکسیژناز وابسته به فردوکسین[2] (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 تیپCyt 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[3]، ساختار چهارم به مراتب ساده‌تری دارد. این پروتئین واجد دو موتیف حفاظت شده موسوم به کلاستر Rieske-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 آنزیم گزارش شد (Rathinasabapathi et al. 1997). ارزیابی تاثیر تنش‌های غیرزیستی بر القای بیان این ژن در برگ چغندرقند، افزایش سطح mRNA و فعالیت آنزیمی CMO به‌میزان ۵-۳ برابر در تنش رطوبتی و ۷-۳ 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 آرابیدوپسیس در سال ۲۰۰۰ نشان داد که این گیاه واجد یک ژن احتمالی (AT4G29890) *CMO-like* (شماره دسترسی NM_119135 و CAB43664) برای رمزگذاری آنزیم CMO است. این ژن به لحاظ توالی تشابه بالایی را با دیگر *CMO*های گیاهی گزارش شده دارد بااین‌حال، 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 آرابیدوپسیس، پروتئین متناظری که بتواند در بیوسنتز بتائین مداخله نماید، قابل شناسایی نیست. این مشاهده با توجه به غیرانباشت‌گر[4] بودن آرابیدوپسیس قابل توجیه است (Hibino et al. 2002).



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

[1] Osmoprotectants
[2] Ferredoxin-Dependent Choline Monooxygenase
[3] Non-heme Iron
[4] Non-accumulator

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]

یکی از اهداف اولیه مهندسی متابولیک در گیاهان افزایش مقاومت آن‌ها به تنش‌هاست. سنتز و تجمع حفاظت کننده‌های اسمزی[1] چون گلایسین‌بتائین یکی از راه‌کارهایی است که برخی از گونه‌های گیاهی، موسوم به انباشت‌گران طبیعی حفاظت کننده‌های اسمزی، جهت مقابله با انواع مختلفی از تنش‌ها اتخاذ می‌کنند. از همین رو، به‌نظر می‌رسد که مهندسی متابولیک با هدف ارتقا تجمع گلایسین‌بتائین 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 درگیاه 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[2]، برگ‌های توسعه یافته[3] 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 گلایسین‌بتایین 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) انجام گرفت. بذور ضدعفونی شده پس از ٤٨ ساعت سرمادهی در دمای ٤ 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 لیترخاک، کود آماده اگرویت (آگلوکن- آلمان) بود. در هر گلدان پنج بذر کشت شد، که در دو نوبت (درمرحله ٤-۳ برگی) از طریق تنک‌کردن به یک گیاه در هر گلدان کاهش یافت. گلدان‌ها به تعداد مساوی در سینی‌هایی به ابعاد ۵۰×۲۵×۹ سانتی‌متر و در اتاقک رشدی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳۰ درصد، شدت نور ۱۲۰ میکروانشتین (لامپ فلوئورسنت 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 ٤- 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 ١٦ 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

[1] Osmoprotectants
[2] Fast expanding leaves
[3] Fully expanded leaves

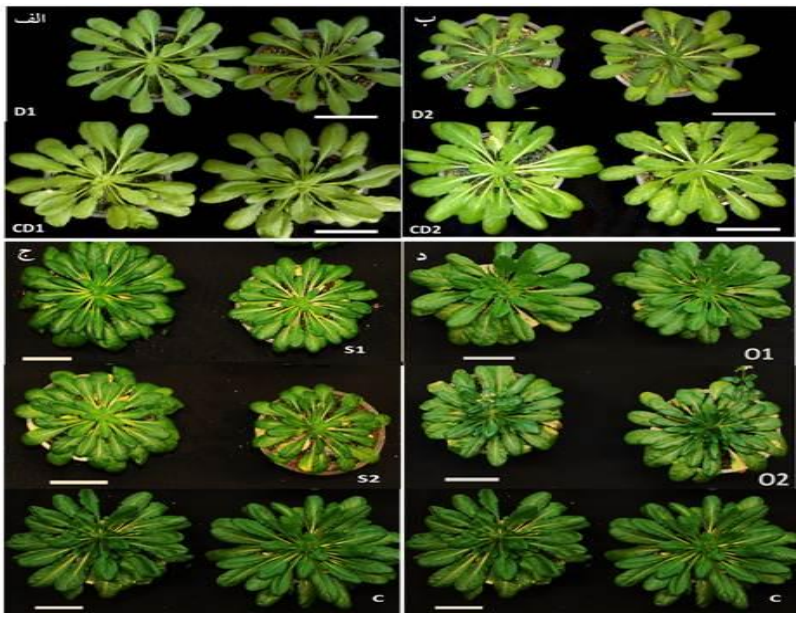
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]

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 در سایت NCBI[1] طراحی شدند (جدول ۱). محل آغازگرها تا حد امکان نزدیک به انتهای ′۳ انتخاب شد. به‌منظور جلوگیری از تکثیر غیراختصاصی ناشی‌از آلودگی‌های ژنومی، طراحی آغازگرها به نحوی انجام شد که حداقل یکی از دو آغازگر رفتی یا برگشتی در نواحی اگزون پیشین- اگزون پسین[2] قرار داشته باشد. بازده تکثیر آغازگرها با استفاده از منحنی‌های استاندارد و نیز رگرسیون خطی منحنی تکثیر در نرم‌فزار LinRegPCR (Ramakers et al. 2003) بررسی شد.

[1] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
[2] Exon-exon border

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

نام آغازگر	ژن هدف	توالی آغازگر (′5 → ′3)	دمای اتصال (^{0}C)	اندازه قطعه مورد انتظار (bp)
AtCMO-like_qPCR-F01	*AtCMO-like-like*	CCTCAATTCTACAGTTTCGAGC	58.4	119
AtCMO-like_qPCR-R01		TCTACATCTCCAAGCCTCCC	59.4	
AtPDF2_ Ref -F01	*AtPDF2*	AATCGGTAGGGAGTGATTTGAGT	53.5	231
AtPDF2_ Ref -R01		AGCCAAAAGCACCTCATCGT	51.8	
AtUBC9_ Ref -F01	*AtUBC9*	GGATTGGTTTTCGATTGCAGAG	53	134
AtUBC9_ Ref -R01		ACGGGTCCTGCGCTACA	51.9	
AtYLS8_ Ref -F01	*AtYLS8*	GCAGATGGATGAGGTGCTTG	53.8	212
AtYLS8_ Ref -R01		GCTTGTCCTTGAGAGCCCAG	55.9	



شکل ۲- وضعیت نمونه‌های آرابیدوپسیس در روز نمونه‌گیری. شامل: الف) خشکی سطح۱ (D_1) و کنترل خشکی سطح۱(CD_1)، ب) خشکی سطح۲ (D_2) و کنترل خشکی سطح ۲(CD_2)، ج) شوری سطح۱ (S_1)، شوری سطح۲ (S_2) و کنترل (C)، د) اسمزی سطح۱ (O_1)، اسمزی سطح ۲ (O_2) و کنترل (C). کنترل تنش‌های شوری و اسمزی یکسان می‌باشد. مقیاس (اندازه خط افقی) = ٤/٥cm

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]

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 $E = 10^{(-1/slope)}-1$ 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 به‌عنوان مقدار مطلوب RNA در واکنش‌های بعدی انتخاب شد. جهت ارزیابی راندمان آغازگرها در نرم‌فزار LinRegPCR مستقیما از مقادیر چرخه آستانه[1] (CT) حاصل از واکنش‌های qRT-PCR اصلی استفاده شد. اندازه‌گیری بیان کمی ژن‌ها به روش qRT-PCR با استفاده از کیت تک مرحله‌ای OneStep qRT-PCR (EURx, Poland) SG 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[2] درنظر 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 ٤٠ سیکل شامل سه مرحله متوالی ۹٤ 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 به‌منظور دستیابی به منحنی ذوب، آغازگرها در محدوده دمایی ۹۵-۶۰ 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 Fit Point 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*[3]، *AtUBC9*[4] و *AtYLS8*[5] استفاده شد (Czechowski et al. 2005). دو روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان $2^{-\Delta\Delta CT}$[6] (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^-ΔΔCT به‌دست 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 به‌ترتیب 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. به‌طوری 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 به‌ویژه 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

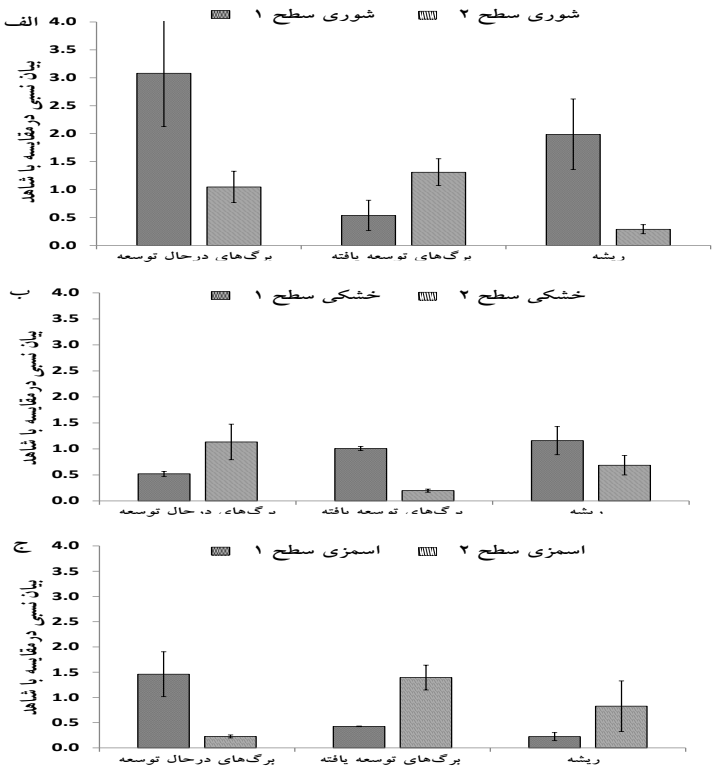
[1] Threshold cycle
[2] Reverse transcription
[3] Protodermal factor 2
[4] Ubiquitin conjugating enzyme 9
[5] Yellow-leaf-specific gene 8
[6] ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\Delta CT = CT_{target}-CT_{refrence}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{sample}-\Delta CT_{normal}$)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]

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 ٤- 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 ٦۰ درصد (۰/٦ برابر) و ۸۰ درصد (۰/۸ برابر) در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد. رفتار این ژن در اندام‌های مورد مطالعه در شدت تنش اسمزی بیش‌تر (٤- بار) کاملا متفاوت بود. بیان این ژن در برگ‌های درحال توسعه و ریشه به‌ترتیب به۲۰ 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 ۱/٤ برابر افزایش داد (شکل ۳-ج).

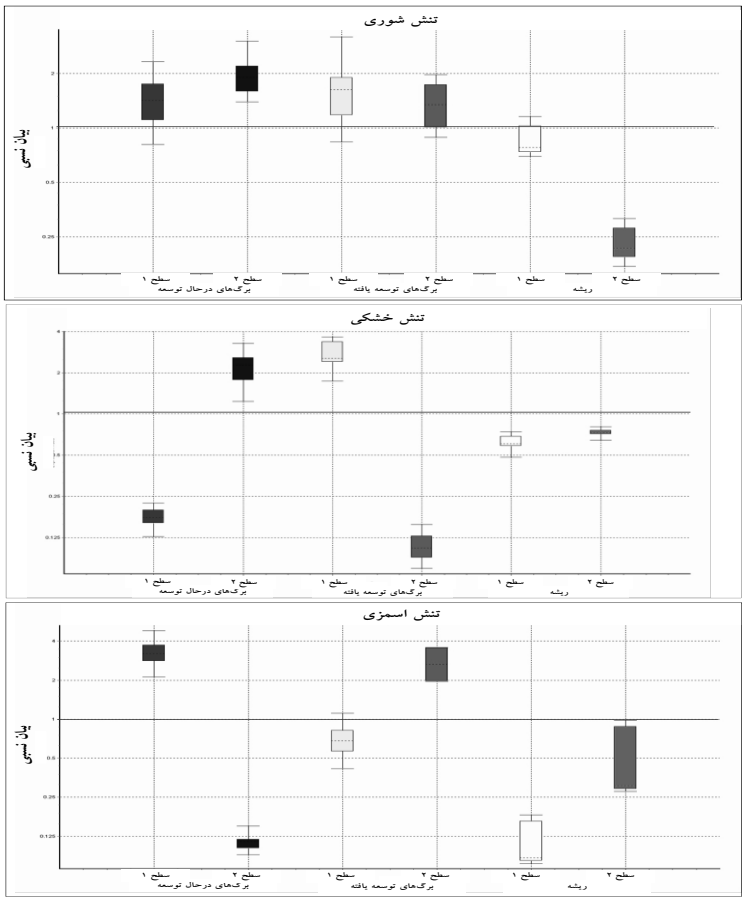
به‌طور کلی، می‌توان گفت که ژن *AtCMO-like* در گیاه آرابیدوپسیس بسته به نوع تنش غیرزیستی، شدت تنش و نوع اندام مورد بررسی متفاوت رفتار می‌کند. با این حال عمدتا رفتار مشاهده شده به شکل عدم تغییر و یا کاهش بیان می‌باشد. تنها افزایش قابل توجه مشاهده شده در بروز ژن *AtCMO-like* مربوط به تنش شوری با غلظت ۱۰۰ 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^-ΔΔCT را نسبتا تایید می‌کند (شکل ٤).



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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]



شکل ٤- 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 درنظرگرفته می‌شود، که به‌وسیله خط مبنا مشخص شده‌است.

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 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 هم‌چون *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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]

الگوی بیان ژن‌های بالادستی (*AtNMT1*) و پایین دستی آن (*AtALDH*) در مسیر بیوسنتز فسفوکولین و گلایسین‌بتائین 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 احتمالا مسیر بیوسنتز فسفوکولین و گلایسین‌بتایین در برگ‌های توسعه یافته از مکانیسم‌های اصلی مواجه با تنش نباشد (Zangishei and Salari 2015a; Zangishei and Salari 2015b). با این حال شواهد ژنتیکی که بتواند مستقیما این فرضیه را تایید کند در دست نیست؛ اگرچه اشاره شده‌است که تنها برگ‌های جوان و ریشه اندام‌های هدف برای سنتز گلایسین‌بتایین در برخی گیاهان هستند (Yamada et al. 2015). سنتز گلایسین‌بتائین در اندام دیگر یعنی برگ‌های درحال توسعه و انتقال آن به برگ‌های توسعه‌یافته، فرضیه دیگری است که می‌تواند عدم القای بیان ژن‌های فوق به هنگام مواجهه با تنش‌های غیرزیستی مورد مطالعه در برگ‌های توسعه یافته را توجیه کند؛ اما اثبات این موضوع نیازمند تجزیه بیان ژن‌های گلایسین‌بتائین 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 (Tsutsumi et al. 2015).

سوال دیگری که نتایج این پژوهش ایجاد می‌نماید آنست که چرا با وجود القای نسبتا 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 نشده است و رفتار این ژن در پاسخ به این تنش‌ها عمدتا 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 گلایسین‌بتائین 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 گلایسین‌بتایین حداقل در برخی اندام‌ها نقشی ایفا ننماید و یا علاوه بر نقش احتمالی آن در مسیر بیوسنتز گلایسین بتایین نقش‌های دیگری هم برای آن محتمل باشد. شایان گفتن است غیرانباشتگر بودن آرابیدوپسیس برای محلول سازگاری گلایسین‌بتائین (Hibino et al. 2002) می‌تواند این فرضیه را تقویت نماید.

همانطورکه 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 ننمودند، 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 گلایسین‌بتایین 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* به هنگام افزایش زمان خشکی در ریشه موجب محدودیت سنتز کولین و فسفوکولین می‌شود که پیش ماده‌های مورد نیاز ژن *AtCMO-like* در مسیر بیوسنتز گلایسین‌بتائین هستند (شکل ۱). بنابراین کاهش سنتز این ترکیبات منجر به بی‌نیازی به فعالیت آنزیم‌ها و بیان ژن‌های پایین 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 آنست‌که مقدار نسبی این افزایش برای *AtCMO-like* در مقایسه با این دو ژن دیگر بسیار کمتر است. پیشنهاد شده‌است که عدم تجمع گلایسین‌بتائین 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 گلایسین‌بتائین گزارش کرده‌اند. لذا افزایش ناچیز بروز ژن *AtCMO-like* در برگ‌های در حال توسعه می‌تواند با این

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]

گزارش‌ها همسو باشد و نقش کلیدی ژن یا آنزیم AtCMO-like در تنظیم سنتز گلایسین‌بتائین در گیاهان انباشت‌گر یا غیر انباشتگر گلایسین‌بتائین 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 درحال توسعه و ریشه افزایش بسیار معنی‌دار می‌یابد. برخلاف انتظار، افزایش بیان نسبتا 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 شده‌است. به‌عنوان مثال در کشت سوسپانسیونی علف شور دوست *Kochia scoparia* نیز کاهش بیان ژن در پاسخ به افزایش شدت تنش شوری گزارش شده‌است (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 گزارشات پیشین که حاکی از القای نسبتا 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 عمدتا مقاوم به خشکی و شوری و هم‌چنین انباشتگر گلایسین‌بتائین 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 گلاسین‌بتائین نیز می‌تواند در تایید و حصول اطمینان از صحت نتایج حاصل از این آزمایش موثر باشد. حضور عناصر مرتبط با پاسخ به تنش[1] 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, Schlagnhaufer 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 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^−ΔΔCT 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]

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, 0 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 satival. 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).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.8.4]