

واکاوی عمل ژن AAPT2 در آرابیدوپسیس با استفاده از جهش یافته غیرفعال

Functional analysis of the AAPT2 gene in *Arabidopsis* via knockout line studies

معصومه خسروی^۱، هومن سالاری^{۱*}

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی کرمانشاه

Khosravi M¹, Salari H^{*1}

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

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

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۶)

چکیده

یکی از ژن‌های کلیدی بیوستز فسفاتیدیل کولین در آرابیدوپسیس ژن آمینوالکل فسفوترانسفراز (*AtAAPT2*) است. برای ارزیابی عمل یکی از دو ایزوفرم این ژن از جهش یافته غیرفعال *aapt2* استفاده شد. مقایسه *aapt2* و تیپ وحشی نشان داد این لاین در بیش تر صفات مورد ارزیابی با تیپ وحشی تفاوت دارد. بین *aapt2* و تیپ وحشی از نظر صفات روز تا رسیدن به روزت دو، سه، چهار، پنج و شش برگی سائز نهایی روزت، روز تا باز شدن ۱۰ درصد گل‌ها، کامل شدن گلدهی، تفاوت بسیار معنی داری مشاهده شد. برای صفات روز تا رسیدن به روزت هشت، نه، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ برگی، مشاهده اولین جوانه گل، باز شدن اولین گل، باز شدن ۳۰ و ۵۰ درصد گل‌ها و شکسته شدن اولین سیلیک تفاوت معنی داری بین *aapt2* و تیپ وحشی مشاهده شد. صفات روز تا رسیدن به روزت ۱۴ برگی، روز تا رسیدن روزت به ۲۰، ۵۰ و ۷۰ درصد از سائز نهایی و کامل شدن پیری بین *aapt2* و تیپ وحشی تفاوتی دیده نشد. لذا احتمالاً پروتئین رمزگذاری شده توسط ژن *AAPT2* در مراحل نخستین نمو آرابیدوپسیس نقش دارد. *aapt2* و تیپ وحشی از نظر فشار اسمزی تفاوت بسیار معنی داری داشتند اما محتوای نسبی آب، میزان کلروفیل a و b، کاروتنوئید، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، مقاومت روزنه‌ای و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II تفاوتی نداشتند. هم‌چنین *aapt2* و تیپ وحشی برای تعداد برگ تفاوت بسیار معنی دار و برای وزن تر و خشک برگ تفاوت معنی دار داشتند، اما وزن تر و خشک ریشه بین *aapt2* و تیپ وحشی تفاوتی نداشت.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس
آمینوالکل فسفوترانسفراز
جهش یافته غیرفعال
فسفاتیدیل کولین

مقدمه

شواهد گسترده نشان می‌دهد که فسفولیپیدها و مولکول‌های مشتق شده از آن‌ها از اجزای حیاتی سلول هستند، به‌طوری که با قرارگیری در ساختار غشا و وزیکول، انتقال پیام و نیز برهم‌کنش با مسیرهای هورمونی مهم در بسیاری از رفتارهای گیاه نقش دارند (Nuccio et al. 1998; Charron et al. 2002; Cruz- (Ramírez et al. 2004). فسفاتیدیل‌کولین^۱ فراوان‌ترین فسفولیپید در غشای پلاسمایی یوکاریوت‌هاست. این فسفولیپید علاوه بر ایفای نقش در ترکیب غشا، به‌عنوان یک مولکول سیگنالینگ هم فعالیت دارد (Gibellini et al. 2010). این ماده همچنین از گلیسرولیپیدها در لایه بیرونی غشا پلاسمایی محافظت می‌کند (Wang and Nii 2000; Testerink and Munnik 2010). به‌علاوه فسفاتیدیل‌کولین می‌تواند پیش‌ماده فعالیت چندین آنزیم برای تولید فسفاتیدیک‌اسید^۲، لیزوفسفاتیدیک‌اسید^۳، لیزو فسفاتیدیل‌کولین^۴ و دی‌آسیل‌گلیسرول^۵ باشد که در مسیرهای سیگنالی ایجاد شده در تنش‌های محیطی مثل شوری، خشکی و سرما نقش دارند (Testerink and Munnik 2010). در آراییدوپسیس، تولید فسفاتیدیل‌کولین به‌عنوان کانال اصلی برای ساخت کولین عمل می‌کند. در یک جهش‌یافته آراییدوپسیس به‌نام (T365) که در آن ژن فسفاتاتانول‌آمین‌ان- متیل‌ترانسفراز^۶ (PEAMT) با استفاده از سیستم RNA سنس و آنتی‌سنس غیرفعال شده بود، فنوتیپ‌های مختلف مورفولوژیکی از قبیل برگ‌های رنگ پریده، پیری زودرس و نر عقیمی مشاهده شد. این جهش‌یافته همچنین به دما حساسیت داشت و به شوری حساسیت فوق‌العاده‌ای نشان داد. نشان داده شده‌است که جهش‌یافته T365، کولین خیلی کمی تولید کرده است. این مشاهدات مشخص می‌کند که بیوستتز کولین در ویژگی‌های مورفو-فیزیولوژیک گیاه مؤثر است و در مقاومت در برابر تنش‌های محیطی هم نقش دارد (Mou et al. 2002). در یوکاریوت‌ها

فسفاتیدیل‌کولین می‌تواند از طریق دو مسیر متفاوت کندی^۷ و متیلاسیون^۸ سنتز شود (شکل ۱). در مسیر کندی، کولین آزاد مستقیماً توسط کولین‌کیناز برای تولید فسفوکولین^۹ (P Cho) فسفوریله می‌شود و سپس فسفوکولین توسط آنزیم سی‌تی‌پی-فسفوکولین سیتیدیل‌ترانسفراز^{۱۰} (CCT) به سیتیدیل‌فسفات کولین^{۱۱} (CDP-Cho) تبدیل می‌شود. این ماده پیش‌ماده فعالیت آنزیم آمینوالکل‌فسفوترانسفراز^{۱۲} (AAPT) است که سیتیدیل‌فسفات کولین را به فسفاتیدیل‌کولین تبدیل می‌کند. مسیر دوم برای سنتز فسفاتیدیل‌کولین، از فسفاتاتانول‌آمین^{۱۳} (PEA) یا فسفاتیدیل‌اتانول‌آمین^{۱۴} (PtdEA) شروع می‌شود. شایان گفتن است متیلاسیون مستقیم فسفاتیدیل‌اتانول‌آمین تاکنون برای گیاهان گزارش نشده است، در حالی که مسیر متیلاسیون فسفاتاتانول‌آمین در گیاهان وجود دارد. مسیر مذکور با متیله شدن فسفاتاتانول‌آمین توسط فسفاتاتانول‌آمین‌ان- متیل‌ترانسفراز (PEAMT) شروع می‌شود و فسفومونومیتیل‌اتانول‌آمین^{۱۵} (PMMEA)، فسفودی‌متیل‌اتانول‌آمین (PDMEA) و فسفوکولین را تولید کرده و در نهایت فسفوکولین باز هم از طریق مسیر کندی منجر به تولید فسفاتیدیل‌کولین می‌شود (Boyes et al. 2001). فسفومونومیتیل‌اتانول‌آمین و فسفودی‌متیل‌اتانول‌آمین همچنین می‌توانند از طریق مسیر فسفاتیدیل‌پایه منجر به بیوستتز فسفاتیدیل‌کولین شوند (Smith et al. 2000). در این مسیر فسفومونومیتیل‌اتانول‌آمین و فسفودی‌متیل‌اتانول‌آمین به‌ترتیب به فسفاتیدیل‌مونومیتیل‌اتانول‌آمین^{۱۶} (PtdMMEA) و فسفاتیدیل‌دی‌متیل‌اتانول‌آمین^{۱۷} (PtdDMEA) و نهایتاً به فسفاتیدیل‌کولین تبدیل می‌شوند (Bolognese and McGraw 2000).

نقش آنزیم آمینوالکل‌فسفوترانسفراز در آخرین مرحله از مسیر کندی کاملاً مشخص است. این آنزیم همچنین در مسیر

⁷ Kennedy Pathway⁸ Methylation Pathway⁹ Phospho- choline¹⁰ CTP-phosphocholine cytidyltransferase¹¹ cytidyldiphosphate choline¹² aminoalcoholphosphotransferase¹³ Phosphoethanolamine¹⁴ Phosphatidylethanolamine¹⁵ Phosphomonomethylethanolamine¹⁶ Phosphatidylmonomethylethanolamine¹⁷ Phosphatidyl dimethylethanolamine¹ Phosphatidylcholine² Phosphatidic acid³ Lyso-phosphatidic acid⁴ Lyso- Phosphatidylcholine⁵ Diacylglycerol⁶ phosphoethanolamine N- methyltransferase

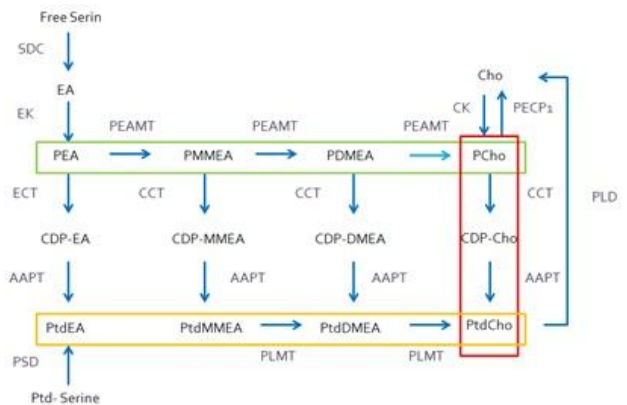
تقریباً در همه بافت‌های گیاهی بیان می‌شود. همچنین گزارش شده‌است *AAPT2* در بذر بالغ و دانه گرده بیش‌تر و در برگ‌های روزتی کمتر از *AAPT1* بیان می‌شود (Yu et al. 2015).

تعیین کامل توالی ژنوم آراییدوپسیس، زمینه مناسبی را برای روش‌های ژنتیک معکوس به‌منظور درک عملکرد ژن‌ها هموار کرده است. جستجوی همولوژی‌ها، آنالیز میکرواری برای بیان ژن‌ها و مطالعات متابولیکی احتمالاً برخی از اطلاعات مربوط به عملکرد ژن را فراهم می‌کنند. با این‌حال در بیش‌تر موارد، برای گزارش دقیق عملکرد یک ژن باید بتوان اثر آن ژن را در فنوتیپ و در سطح ارگانسیم شناخت (Boyes et al. 2001). تولید جهش یافته‌های غیرفعال^۴ که در آن یکی از ژن‌های شناخته شده ارگانسیم‌ها بی‌فعالیت شده‌است ابزار قدرتمندی برای منظور بالاست. در فناوری تولید جهش یافته‌های غیرفعال مکان ژن در کروموزوم دچار اختلال می‌شود (Reski 1998). از آنجایی که ایترون‌های آراییدوپسیس کوچک هستند و همین‌طور مواد بین ژنی کمی دارند وارد کردن قطعه T-DNA به‌طول ۵ Kb تا ۲۵ Kb عموماً سبب ایجاد اختلال چشمگیر در عملکرد یکی از ژن‌ها شده و جهش یافته غیرفعال تولید می‌شود. همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد ژن *AAPT* که رمزگذار آنزیم آمینوالکل فسفوترانسفراز است، نقشی اساسی در مسیر بیوسنتزی فسفاتیدیل‌کولین دارد. بنابراین، مطالعه آن از اهمیت زیادی برخوردار است. بررسی عملکرد ایزوفرم *AAPT2* با استفاده از جهش یافته غیرفعال هدف گزارش حاضر است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: جهش یافته‌های غیرفعال آراییدوپسیس از اکوتیپ Columbia-0 بود که از مؤسسه سالک^۵ تهیه شدند. کد کد دسترسی جهش یافته مورد استفاده SALK-123095 بود. بذور تیپ وحشی پیش‌تر در دانشگاه رازی کرمانشاه تهیه شد (Zangishei and Salari 2015). بذور مطابق روش پیشنهادی (Weigel and Glazebrook 2001) ضدعفونی شدند. سپس بذور به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرمادهی

فسفاتیدیل پایه برای تولید فسفاتیدیل‌کولین نقش دارد (شکل ۱). بر اساس اطلاعات موجود در تارنمای TAIR^۱ برای ژن رمزگذار آنزیم آمینوالکل فسفوترانسفراز (*AAPT*) در آراییدوپسیس دو ایزوفرم *AAPT1*^۲ و *AAPT2*^۳ گزارش شده‌است.



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی تولید فسفاتیدیل‌کولین. مسیر کندی (مستطیل قرمز)، به‌عنوان مسیر اصلی تولید فسفاتیدیل‌کولین در حیوانات گزارش شده‌است. با این‌حال مسیر متیلاسیون فسفومتیل پایه (مستطیل نارنجی) نیز در بعضی از بافت‌ها عملکرد دارد. در گیاهان تولید فسفاتیدیل‌کولین با ترکیبی از مسیرهای متیلاسیون و مسیر کندی انجام می‌شود. متیلاسیون مسیر فسفات پایه (مستطیل سبز) با فسفات‌اتانول‌آمین آغاز می‌شود و پس از سه متیلاسیون متوالی توسط ان‌متیل ترانسفراز (PEAMT)، فسفوکولین (PCho) که یک متابولیت واسطه است تولید می‌شود و این ماده در ادامه وارد مسیر کندی می‌شود. در گیاهان مسیر متیلاسیون فسفومتیل پایه با فسفومونومتیل‌اتانول‌آمین (PMMEA) آغاز و با فسفولیپید ان‌متیل ترانسفراز (PLMT) کنترل می‌شود. *AAPT* آمینوالکل فسفوترانسفراز. CCT، سی‌تی‌پی - فسفوکولین سیتیدیل ترانسفراز. CDP-Cho، سیتیدیل فسفات کولین. Cho، کولین. CK، کولین کیناز. EA، اتانول‌آمین. ECT، سی‌تی‌پی - اتانول‌آمین سیتیدیل ترانسفراز. SDC، سرین دیکربوکسیلاز. EK، اتانول‌آمین کیناز. PECP1، فسفات‌اتانول‌آمین/فسفوکولین فسفاتاز. PLD، فسفولیپاز دی. PSD، فسفاتیدیل‌سرین دیکربوکسیلاز. PtdEA، فسفاتیدیل‌اتانول‌آمین. نام متابولیت‌های واسطه به این ترتیب است: CDP، سیتیدیل دی‌فسفات. DMEA، دی‌متیل‌اتانول‌آمین. MMEA، مونومتیل‌اتانول‌آمین. P، فسفو. Ptd، فسفاتیدیل (Alatorre-Cobos et al. 2012).

این دو ژن از نظر توالی آمینواسیدی حدود ۸۸ درصد مشابهت دارند. داده‌های میکرواری و RNA-seq نشان داده‌اند که *AAPT1*

^۱ www.arabidopsis.com

^۲ AT1G13560

^۳ AT3G25585

^۴ T-DNA insertion mutant

^۵ SALK (Ohio State University- ABRC)

به ترتیب از سه روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۲ (PCR)، استفاده از آنتی‌بیوتیک و همدیفی توالی ژن AAPT2 در لاین‌های *aapt2* در برابر توالی ژن AAPT2 در تیپ وحشی استفاده شد. استخراج DNA از برگ آراییدوپسیس براساس روش (1983) Dellaporta et al. صورت گرفت. جهت اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد که با محلول اتیدیوم بروماید تیمار شده بود استفاده شد. پرایمرهای مستقیم (AAPT2Rp) و معکوس (AAPT2Lp) برای ژن AAPT2، از طریق نمایه^۳ SIGNAL iSect Primer Design در سایت^۳ SIGNAL طراحی شدند. برای T-DNA از پرایمر معرفی شده در سایت SIGNAL به نام LBb1.301 استفاده شد (جدول ۱). به منظور غربالگری برای هر لاین دو واکنش مجزا با استفاده از AAPT2Rp- و AAPT2Rp-AAPT2Lp پرایمرهای LBb1.301 انجام گرفت (شکل ۲).

شدند. از گلدان‌هایی به قطر ۹/۵ و ارتفاع ۷/۵ سانتی‌متر و با گنجایش تقریبی ۱۷۰ گرم خاک استفاده شد. در مرکز هر گلدان یک عدد بذرکشت شد. خاک مورد استفاده نسبت مساوی حجمی از ورمیکولایت سایز ۰-۳ (کاندیس- ایران) و پیت ماس (ای دی فری پیت- هلند) بود. از کود آماده آگرویت^۱ (آگلونک- آلمان) به میزان دو گرم به ازای هر لیتر خاک استفاده شد. گلدان‌های آماده شده در سینی‌هایی به ابعاد ۹×۲۵×۵۰ سانتی‌متر قرار داده شدند. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده اتاق رشد در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۳۰ درصد، شدت نور ۱۲۰ میکرو انیشتن (لامپ فلوروسنت سفید) و طول روز ۱۰ ساعت که در اواخر رشد به تدریج به ۱۴ ساعت رسانیده شد، نگهداری شدند. آبیاری هر چهار روز یکبار از کف و با آب شرب شهری تا رسیدن به ظرفیت زراعی انجام شد.

غربالگری لاین‌های دارای T-DNA: به منظور جداسازی لاین‌ها از نظر عدم درج، درج و هموزیگوت بودن برای T-DNA درج شده

^۱ AGRAVIT

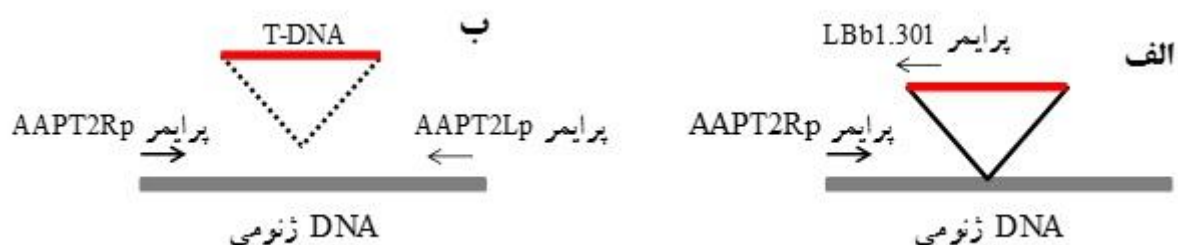
^۲ Polymerase Chain Reaction

^۳ <http://signal.salk.edu/isectprimers.html>

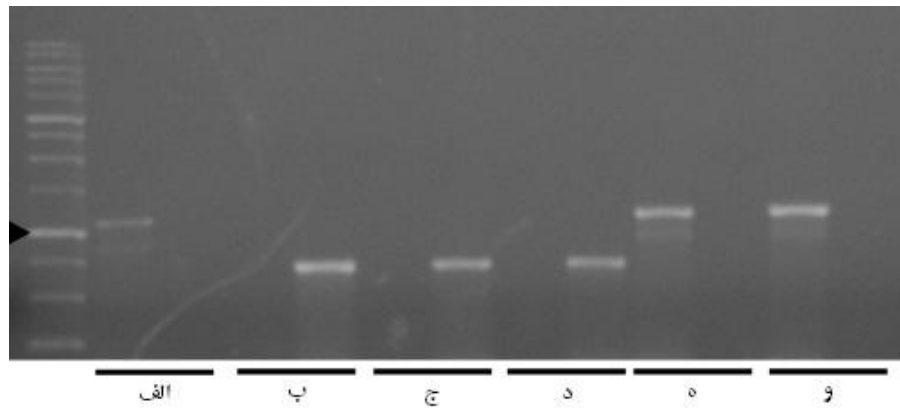
^۳ Salk Institute Genomic Analysis Laboratory

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	ژن هدف	توالی پرایمر	دمای اتصال °C
AAPT2 Rp	AAPT2	AAGTAAGCCGTGTGCAAAGTG	۵۲/۴
AAPT2 Lp	AAPT2	TCGTTACAGATACGCAAAGCAC	۵۳/۰
LBb1. 301	T-DNA	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	۴۶/۸



شکل ۲- تصویر شماتیک از درج T-DNA و موقعیت قرارگیری پرایمرها در غربالگری توسط PCR - الف: جهش یافته ب: تیپ وحشی

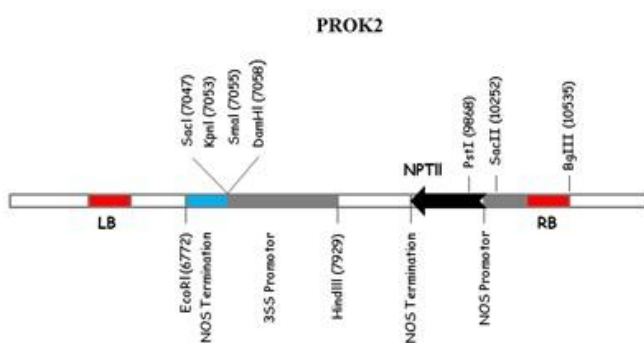


شکل ۳- نتایج حاصل از غربالگری لاین‌های آراییدوپسیس از نظر درج یا عدم درج T-DNA در ژن *AAPT2*. الف: تیپ وحشی ب، ج و د: لاین هموزیگوت برای درج T-DNA در ژن *AAPT2*. ه، و: لاین بدون درج T-DNA در ژن *AAPT2*. برای تمامی لاین‌ها چاهک‌های اول و دوم به ترتیب تکثیر با پرایمرهای AAPT2 Lp - AAPT2 Rp و AAPT2 Rp-LBb1.301 در تصویر باند ۱۰۰۰ bp مشخص شده است.

کانامایسین (دخفا بیوشیمی - هلند)^۱ انجام شد. غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر برای انجام غربالگری نهایی انتخاب شد. برای انتخاب روش غربالگری مناسب، دو روش متداول با اعمال تغییرات و روش سریع بررسی شدند (Harrison et al. 2006). براساس نتایج، روش متداول با اعمال تغییرات، برای غربالگری نهایی انتخاب گردید. به این منظور ابتدا بذور لاین‌هایی که در مرحله پیشین به عنوان هموزیگوت شناخته شده بودند - به همراه بذور - تیپ وحشی بعد از استریل کردن به مدت دو روز در محیط تاریک سرمادهی شدند.

ظهور باند برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با جفت پرایمرهای AAPT2Rp-AAPT2Lp به معنی عدم درج T-DNA و مشاهده باند با جفت پرایمرهای AAPT2Rp- LBb1.301 به معنی درج T-DNA بود. ظهور باند برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با جفت پرایمرهای AAPT2Rp-AAPT2Lp و عدم ظهور برای واکنش با جفت پرایمرهای AAPT2Rp- LBb1.301 به معنی تیپ وحشی بودن گیاه مورد بررسی، مشاهده باند برای هر دو واکنش پیش گفته به معنی هتروزیگوت بودن لاین مورد بررسی از نظر درج T-DNA و مشاهده باند فقط برای واکنش با جفت پرایمرهای AAPT2Rp- LBb1.301 به معنی هموزیگوت بودن لاین مورد بررسی از نظر درج T-DNA بود. در تمامی مراحل غربالگری به وسیله PCR از یک گیاه تیپ وحشی بعنوان شاهد استفاده شد و کنترل منفی در تمام آزمایش‌ها لحاظ شد. بر اساس شیوه غربالگری اشاره شده سه لاین که از نظر درج T-DNA هموزیگوت بودند برای مراحل بعدی آزمایش انتخاب شدند (شکل ۳).

برای اطمینان از صحت هموزیگوت بودن لاین‌هایی که براساس غربالگری به وسیله PCR انتخاب شده بودند از غربالگری به وسیله کانامایسین استفاده شد. در T-DNA وکتور مورد استفاده برای ایجاد جهش‌یافته‌های غیرفعال، ژن مقاومت به کانامایسین *NPTII* قرار داده شده است (شکل ۴). غربالگری ابتدایی با غلظت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر



شکل ۴- ساختار T-DNA در وکتور *prok2*. این وکتور برای ایجاد جهش‌یافته غیرفعال در آراییدوپسیس مورد استفاده قرار می‌گیرد. ([HTTP://SIGNAL.SALK.EDU/CGI-BIN/TDNAEXPRESS](http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress))

¹ Biochemie, Netherland Duchefa Lod. No: K0126.0001- Lot. No: 011216.24

AAPT2 در لاین‌های *aapt2* و توالی همان ژن در تیپ وحشی درج T-DNA در ژن مورد نظر تایید شد. مکان این درج در اگزون شماره یک و نوکلئوتید شماره ۵۷ بود (شکل ۶). شایان گفتن است نخستین نوکلئوتید کدون آغاز نوکلئوتید شماره ۱ در نظر گرفته شده بود.

اندازه‌گیری پارامترهای فنولوژیکی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی: در بررسی پارامترهای فنولوژیکی سه لاین مستقل *aapt2* در چهار تکرار بیولوژیک و دو لاین مستقل تیپ وحشی در دو تکرار بیولوژیک در نظر گرفته شد. هر تکرار بیولوژیک شامل یک گیاه مستقل بود. از مقیاس BBCH^۲ برای بررسی‌های فنولوژیک استفاده شد (Boyes et al. 2001). جدول ۲ مراحل فنولوژیک مورد بررسی را نشان می‌دهد. بدین منظور ضمن یادداشت برداری، هر هفت روز یکبار عکس‌برداری توسط دوربین (کانن، د ۷۰۰- لنز ۱۸-۵۵)^۳ انجام گرفت.

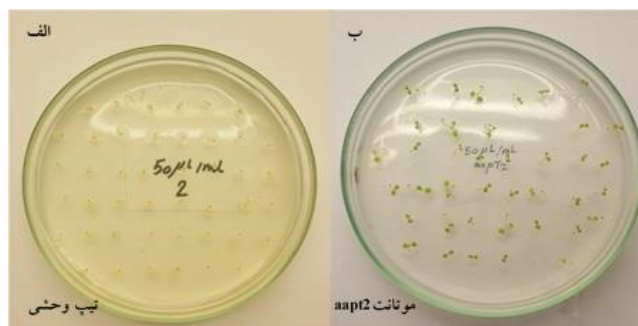
سپس روی محیط کشت MS^۱/۲ (دخفا بیوشیمی - هلند^۱) حاوی ۵۰ mg/l آنتی بیوتیک کانامایسین کشت شدند و به مدت ۱۰ روز با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی رشد داده شدند. جوانه‌های مقاوم به کانامایسین بعد از ۱۰ روز تشخیص داده شد. غربالگری با آنتی بیوتیک صحت غربالگری به‌وسیله PCR را تایید کرد (شکل ۵).

غربالگری با استفاده از هم‌ردیفی توالی‌ها: به‌منظور تایید نهایی هموزیگوت بودن لاین‌های انتخاب شده، از هم‌ردیفی توالی ژن AAPT2 در لاین‌های هموزیگوت غربال شده (*aapt2*) در مقابل توالی تیپ وحشی ژن AAPT2 (با کد دسترسی AF 360151.1) به‌وسیله نرم‌افزار Seq Man از مجموعه نرم‌افزارهای DNA STAR، استفاده شد. ژن AAPT2 با استفاده از پرایمر AAPT2Rp توالی‌یابی شد (شرکت بایونیر، کره جنوبی به‌واسطه شرکت تکاپوزیست، ایران). در هم‌ردیفی توالی به‌دست آمده برای ژن

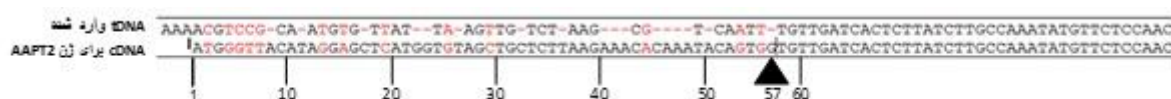
² BASF, Bayer, Ciba-Geigy, Hoechst (BBCH)

³ Canon d700- Lens 18~55

¹ Biochemie, Netherland Duchefa -Lot. No: P13890.04



شکل ۵- بررسی گیاهان تیپ وحشی (الف) و لاین *aapt2* (ب) در محیط حاوی ۵۰ μL/ML آنتی‌بیوتیک کانامایسین



شکل ۶- هم‌ردیفی توالی cDNA برای ژن AAPT2 با کد دسترسی AF 360151.1 در مقابل توالی T-DNA وارد شده در لاین *aapt2* با کد T-SALK - 123095. DNA در نوکلئوتید شماره ۵۷ به ژنوم وارد شده شده‌است.

جدول ۲- صفات فنولوژی مورد بررسی براساس مقیاس BBCH

مرحله ۱ رشد اصلی	توسعه برگ
۱,۰۲	روزت ۲ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۰۳	روزت ۳ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۰۴	روزت ۴ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۰۵	روزت ۵ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۰۶	روزت ۶ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۰۷	روزت ۷ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۰۸	روزت ۸ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۰۹	روزت ۹ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۱۰	روزت ۱۰ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۱۱	روزت ۱۱ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۱۲	روزت ۱۲ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۱۳	روزت ۱۳ برگی < طول ۱ میلی متر
۱,۱۴	روزت ۱۴ برگی < طول ۱ میلی متر
مرحله ۳ رشد اصلی	رشد روزتی
۳,۲۰	روزت ۲۰٪ از سایز نهایی است
۳,۷۰	روزت ۵۰٪ از سایز نهایی است
۳,۹۰	روزت ۷۰٪ از سایز نهایی است
مرحله ۵ رشد اصلی	ظهور گل آذین
۵,۱۰	مشاهده اولین جوانه گل
مرحله ۶ رشد اصلی	گلدهی
۶,۰۰	باز شدن اولین گل
۶,۱۰	۱۰٪ از گل های تولید شده باز شده اند
۶,۳۰	۳۰٪ از گل های تولید شده باز شده اند
۶,۵۰	۵۰٪ از گل های تولید شده باز شده اند
۶,۹۰	تکمیل گلدهی
مرحله ۸ رشد اصلی	رسیدن سیلیک
۸,۰۰	شکسته شدن اولین سیلیک
مرحله ۹ رشد اصلی	پیری
۹,۷۰	کامل شدن پیری: آماده برای برداشت بذر

گیاه جدا شدند و بلافاصله وزن تر تمامی برگ ها توسط ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه گیری شد.



شکل ۷- مرحله رشدی (۵/۱۰)، ظهور اولین جوانه گل

در مطالعات پارامترهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نیز از سه لاین مستقل *aapt2* و سه لاین مستقل تیپ وحشی استفاده شد. تعداد تکرار بیولوژیک برای هر دو لاین سه تکرار بود. مطالعه صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در زمان رسیدن گیاهان به مرحله ظهور اولین جوانه گل (۵/۱۰) انجام شد (شکل ۷) (Bolognese and McGraw 2000).

تعداد برگ، متوسط وزن تر و خشک تک برگ، وزن تر و خشک ریشه به عنوان پارامترهای مورفولوژیکی اندازه گیری شدند. برای پارامتر تعداد برگ، کلیه برگ های گیاه جدا شدند و شمارش شدند. برای محاسبه وزن های تر و خشک، گیاهان مدنظر، ۳ ساعت پس از آغاز دوره نوری برداشت شدند. برگ ها از ریشه

برای به دست آوردن متوسط وزن تر تک برگ، وزن کل به دست آمده بر تعداد برگ‌ها تقسیم شد. وزن تر ریشه‌ها پس از آبشویی با ترازوی پیش‌تر گفته اندازه‌گیری شد. برای به دست آوردن وزن‌های خشک، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس با ترازوی اشاره شده توزین شدند. متوسط وزن خشک تک برگ مجدداً از تقسیم وزن به دست آمده بر تعداد برگ‌ها حاصل شد.

سنجش میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها مطابق روش Lichtenthaler and Wellburn (1983) انجام و براساس روابط (۱ تا ۳) محاسبه شد.

$$1) \text{Chlorophyll a (mg/gFw)} = 12.21 (A663) - 2.81 (A646)$$

$$2) \text{Chlorophyll b (mg/gFw)} = 20.13 (A646) - 5.1 (A663)$$

$$3) \text{Carotenoids (mg/gFw)} = [1000 (A470) - 3.27 (\text{Chl a})] - 104 (\text{Chl b})/227$$

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا (مالون دی آلدئید) براساس روش Heath and Packer (1968)، میزان کارائی فتوشیمیایی فتوسیستم II براساس روش Tang (2008)، میزان نفوذپذیری نسبی غشا براساس روش Zhao et al. (1992)، محتوای نسبی آب^۱ (RWC) براساس روش Ritchie et al. (1990) و پتانسیل اسمزی طبق روش Zhang et al. (1999) تعیین شد. هم‌چنین میزان مقاومت روزنه‌ای توسط دستگاه Leaf Porometer (مدل SC-1) اندازه‌گیری شد.

داده‌های این آزمایش با آزمون t جفت نشده و با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه شدند. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

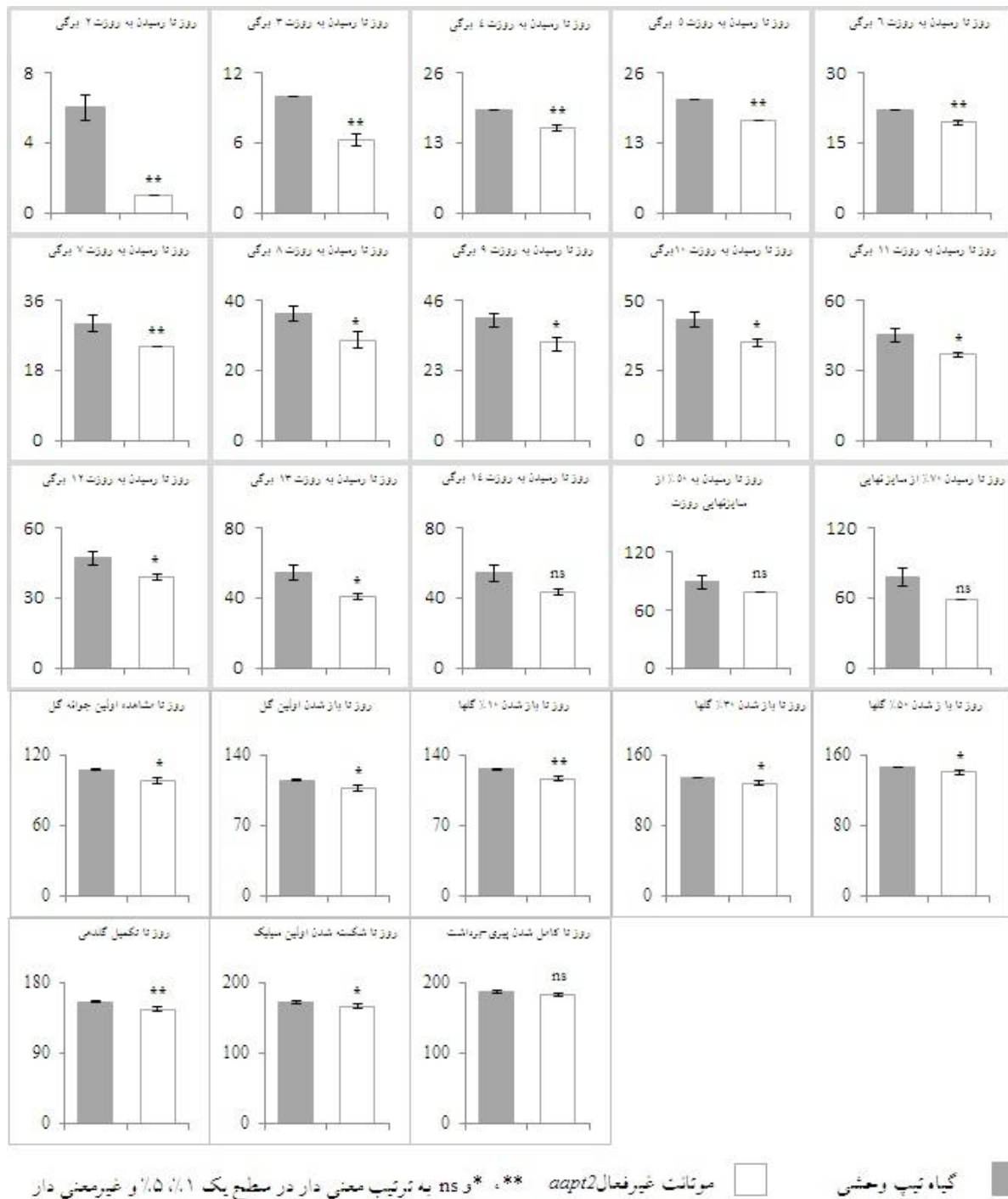
نتایج بررسی صفات فنولوژیک با استفاده از آزمون t جفت نشده نشان داد (شکل ۸). *aapt2* و تیپ وحشی برای صفات روز تا رسیدن به روزت دو، سه، چهار، پنج و شش برگی، روز تا باز شدن ۱۰ درصد گل‌ها، و روز تا کامل شدن گلدهی دارای تفاوت

بسیار معنی‌دار و از نظر صفات روز تا رسیدن به روزت هشت، نه، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ برگی، روز تا مشاهده اولین جوانه گل، روز تا باز شدن اولین گل، روز تا باز شدن ۳۰ و ۵۰ درصد گل‌ها و روز تا شکسته شدن اولین سیلیک دارای تفاوت معنی‌دار هستند. این مشاهدات نشان می‌دهد *aapt2* در مراحل آغازین رشد نمو سریع‌تری نسبت به تیپ وحشی دارد. با افزایش سن گیاه تفاوت برای ویژگی‌های فنولوژیک *aapt2* و تیپ وحشی به شکل قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، به نحوی که در مراحل پایانی رشد یعنی روز تا رسیدن به روزت ۱۴ برگی، روز تا رسیدن روزت به ۲۰، ۵۰ و ۷۰ درصد از سایز نهایی و کامل شدن پیری دیگر تفاوت معنی‌داری بین *aapt2* و تیپ وحشی قابل مشاهده نبود. براساس نتایج به دست آمده می‌توان گفت غیرفعال شدن ایزوفرم AAPT2 در روند نمو گیاه به‌ویژه در مراحل ابتدایی رشد تغییر ایجاد کرده است و احتمالاً فعالیت آنزیم رمزگذاری شده توسط این ژن مراحل نمو گیاه جوان را به تاخیر خواهد انداخت. استنباط دیگری که از این مشاهدات می‌توان کرد آن است که ایزوفرم دیگر این ژن یعنی AAPT1 حداقل در مراحل ابتدایی رشد نقش بازدارندگی AAPT2 را نمی‌تواند بازی کند لذا این دو ایزوفرم نمی‌توانند هم‌عملکرد^۲ باشند. هم‌چنین شاید بتوان استنتاج کرد که AAPT2 در اوائل رشد و نمو گیاه نقش بیش‌تری داشته و این نقش را در مراحل بلوغ گیاه به AAPT1 واگذار می‌نماید و یا آنکه اساساً آنزیم‌های رمزگذاری شده توسط این دو ایزوفرم در مرحله بلوغ گیاه نقش جدی در نمو ندارند. البته اثبات این استنتاج‌ها نیاز به مطالعه سه‌گانه *aapt1*، *aapt2* و جهش‌یافته دوگانه^۳ *aapt1* و *aapt2* دارد. Yu et al. (2015) در بررسی بروز ایزوفرم‌های AAPT1 و AAPT2 نشان دادند که AAPT2 در بذر بروز بیش‌تری از AAPT1 دارد، در حالی که میزان بروز AAPT1 در برگ بیش از AAPT2 است. این گزارش شاید بتواند مشاهدات و استنتاج ما مبنی بر نقش بیشتر AAPT2 در مراحل آغازین رشد را به واسطه بروز بیش‌تر در بذر و مراحل جنینی گیاه را توجیه نماید.

² Redundant

³ Double mutant

¹ Relative water content



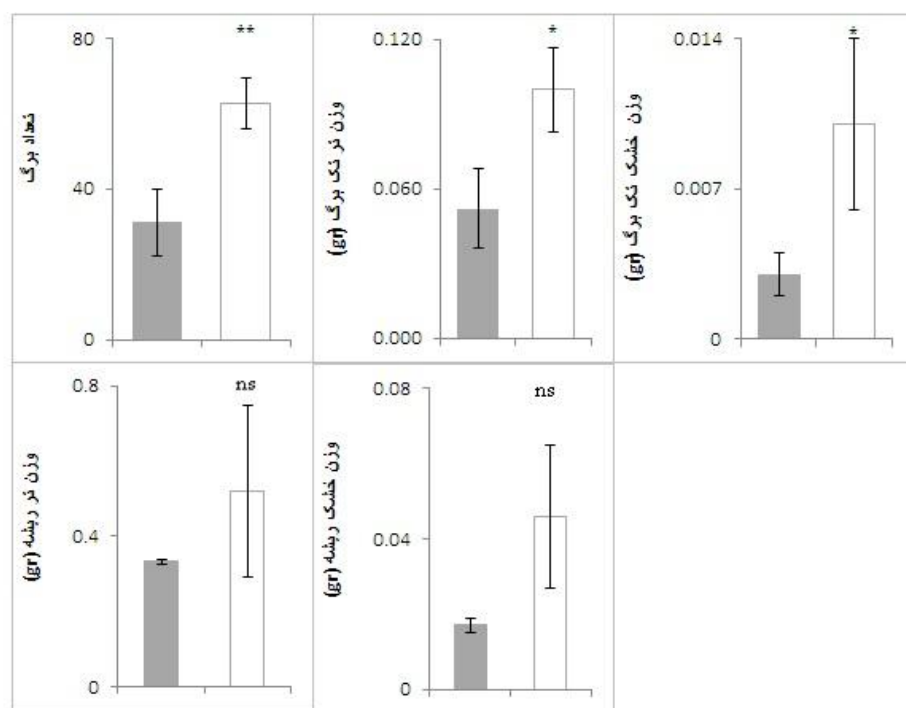
شکل ۸ - مقایسه لاین *aapt2* و گیاهان تیپ وحشی از نظر صفات فنولوژیک

نداشته و به تبع آن آب کافی در اختیار گیاهان قرار دارد تفاوتی در درصد محتوای نسبی آب *aapt2* و تیپ وحشی مشاهده نشده است. منفی تر بودن معنی دار مقدار پتانسیل اسمزی تیپ وحشی در مقایسه با *aapt2* نشان دهنده آن است که مقدار املاح در عصاره برگ‌های تیپ وحشی در مقایسه با این لاین بیشتر شده

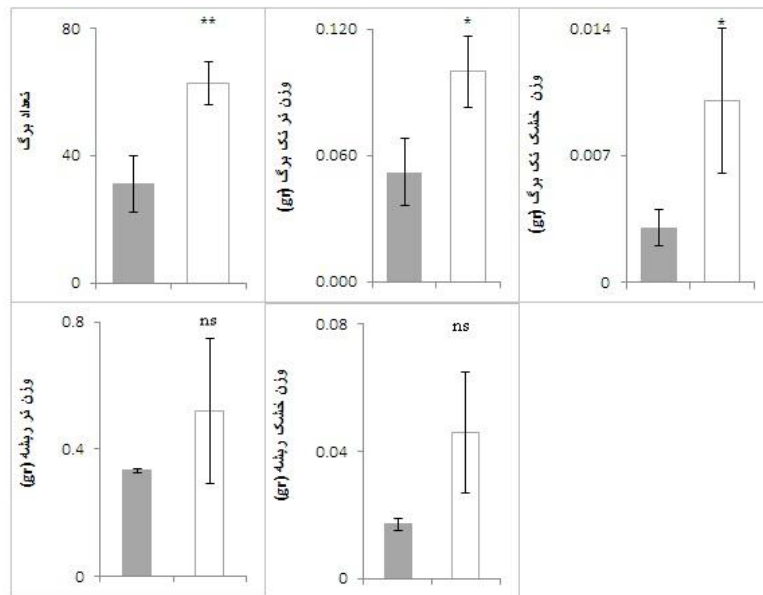
نتایج حاصل از آزمون t جفت نشده برای صفات فیزیولوژی (شکل ۹) نشان داد که تیپ وحشی به صورت بسیار معنی داری پتانسیل اسمزی منفی تری در مقایسه با *aapt2* دارد. این بدان معنی است که گیاهان تیپ وحشی قابلیت جذب آب بهتری نسبت به *aapt2* دارند. اما در شرایطی که هیچ گونه تنش رطوبتی وجود

آنزیم رمزگذاری شده توسط ژن *AAPT* در سنتز فسفاتیدیل کولین قابل توجه است. به نظر می‌رسد احتمالاً بی‌فعالیتی ژن *AAPT2* در غشا تغییراتی ایجاد کرده که این تغییرات به نفوذپذیری بیشتر غشا کمک کرده است. این رخداد احتمالاً از طریق تغییر در فسفاتیدیل کولین رخ داده است که نیازمند بررسی جداگانه‌ای است. سایر صفات فیزیولوژیک مورد بررسی شامل میزان کلروفیل *a* و *b* و کاروتنوئیدها، مقاومت روزنه‌ای و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II تفاوتی را بین *aapt2* و تیپ وحشی نشان ندادند که با توجه به مسیری که ژن *AAPT* در آن دخالت دارد قابل پیش‌بینی بود. مقایسه برخی از ویژگی‌های مورفولوژی بین *aapt2* و تیپ وحشی در شکل ۱۰ نشان داده شده است. *aapt2* و تیپ وحشی برای تعداد برگ تفاوت بسیار معنی‌دار و برای میانگین وزن تر و وزن خشک تک برگ تفاوت معنی‌دار داشتند.

است. با توجه به نقش حیاتی آنزیم *AAPT2* در مسیر سنتز فسفاتیدیل کولین، غیر فعال کردن ایزوفرم *AAPT2* احتمالاً باعث شده است مسیر به سمت کمتر تولید شدن کولین و شاید گلاسیسین بتائین جهت‌گیری کرده باشد. عدم تغییر معنی‌دار در مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا (میزان مالون دی آلدئید) در مقایسه تیپ وحشی و *aapt2* مشاهده شد که نشان می‌دهد احتمالاً ژن *AAPT* و یا حداقل ایزوفرم *AAPT2* در این فرآیند نقشی ندارد، اگرچه این مشاهده می‌تواند با تفسیر کاهش احتمالی مقدار گلاسیسین بتائین هم‌خوان نباشد. برای بررسی این تفاسیر اندازه‌گیری مقادیر کولین و گلاسیسین بتائین در *aapt2* و تیپ وحشی توصیه می‌شود. ویژگی فیزیولوژیک دیگری که بین *aapt2* و تیپ وحشی تفاوت بسیار معنی‌دار نشان داد درصد نفوذپذیری نسبی غشا بود. غشا در برگ‌های *aapt2* نسبت به تیپ وحشی نفوذپذیری بیشتری نشان داد. این مشاهده نیز با توجه به نقش



شکل ۹- مقایسه لاین *aapt2* و گیاهان تیپ وحشی از نظر صفات فیزیولوژی



شکل ۱۰- مقایسه لاین *aapt2* و گیاهان تیپ وحشی از نظر صفات مورفولوژیک

موتانت غیرفعال *aapt2* **، * و ns به ترتیب معنی دار در سطح یک، ۵٪ و غیرمعنی دار

گفت ایزوفرم *AAPT1* در وزن ریشه نقش بیشتری داشته است. برای بررسی این استنتاج‌ها نیز نیازمند مطالعه سه‌گانه *aapt1*، *aapt2* و جهش‌یافته دوگانه *aapt1* و *aapt2* هستیم. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد ایزوفرم‌های *AAPT1* و *AAPT2* هم‌عملکرد نیستند و ایزوفرم *AAPT2* در فنولوژی، فیزیولوژی و مورفولوژی گیاه نقش دارد. با توجه به نتایج این آزمایش و نیز مسیری که ژن *AAPT* در آن نقش دارد (شکل ۱) به‌نظر می‌رسد مطالعه نقش ایزوفرم *AAPT2* در تنش‌های غیر زیستی در آراییدوپسیس دارای اهمیت است.

این در حالی است که وزن تر و وزن خشک ریشه بین *aapt2* و تیپ وحشی تفاوتی نشان نداد. تاثیر معنی‌دار بی‌فعالیت کردن ژن *AAPT2* برای صفات مرتبط با مورفولوژی برگ نشان می‌دهد که ایزوفرم مورد بررسی برای این صفت نقش حیاتی داشته و احتمالاً ایزوفرم دیگر نتوانسته است نقش پروتئین رمزگذاری شده توسط ایزوفرم *AAPT2* را در برگ جبران کند. *aapt2* و تیپ وحشی برای صفت اندازه‌گیری شده وزن ریشه تفاوت معنی‌داری نداشتند. اگر چه صفات مرتبط با ریشه و نقش احتمالی این ژن در معماری ریشه نیازمند مطالعه جداگانه‌ای است اما ممکن است با توجه به اهمیت مسیری که ژن *AAPT* در آن دخالت دارد بتوان

منابع

Alatorre-Cobos F, Cruz-Ramírez A, Hayden CA, Pérez-Torres CA, Chauvin AL, Ibarra-Laclette E, Alva-Cortés E, Jorgensen RA, Herrera-Estrella L (2012) Translational regulation of Arabidopsis XIPOTL1 is modulated by phosphocholine levels via the phylogenetically conserved upstream open reading frame 30. *Journal of Experimental Botany* 63: 5203-5221.

Bolognese CP, McGraw P (2000) The isolation and characterization in yeast of a gene for arabidopsis s-adenosylmethionine: Phospho-ethanolaminemethyltransferase. *Plant Physiology* 124: 1800-1813.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth stage-

based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* 13: 1499-1510.

Charron JBF, Breton G, Danyluk J, Muzac I, Ibrahim RK, Sarhan F (2002) Molecular and Biochemical Characterization of a Cold-Regulated PhosphoethanolamineN-Methyltransferase from Wheat. *Plant Physiology* 129: 363-373.

Cruz-Ramírez A, López-Bucio J, Ramírez-Pimentel G, Zurita-Silva A, Sánchez-Calderon L, Ramírez-Chávez E, González-Ortega E, Herrera-Estrella L (2004) The xipotl mutant of Arabidopsis reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity. *The Plant Cell* 16: 2020-2034.

- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Gibellini F, Smith TK (2010) The Kennedy pathway de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB life* 62: 414-428.
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A (2006) A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2: 19.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transaction* 603: 591-592.
- Liu Y, Wang G, Wang X (2015) Role of aminoalcoholphosphotransferases 1 and 2 in phospholipid homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27: 1512-1528.
- Mou Z, Wang X, Fu Z, Dai Y, Han C, Ouyang J, Bao F, Hu Y, Li J (2002) Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 2031-2043.
- 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.
- Reski R (1998) *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: the David and Goliath of reverse genetics. *Trends in Plant Science* 3: 209-210.
- Ritchie SW, Nguyen HT, Holaday AS (1990) Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop science* 30: 105-111.
- Smith DD, Summers PS, Weretilnyk EA (2000) Phosphocholine synthesis in spinach: Characterization of phosphoethanolamine N-methyltransferase. *Physiologia Plantarum* 108: 286-294.
- Tang L, Kim MD, Yang KS, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Yun DJ, Kwak SS, Lee HS (2008) Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. *Transgenic Research* 17: 705-715.
- Testerink C, Munnik T (2011) Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 2349-2361.
- Wang Y, Nii N (2000) Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase- oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75: 623-627.
- Weigel D, Glazebrook J (2002) *Arabidopsis: a laboratory manual*. CSHL Press.
- Zangishei Z, Salari H (2015) 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).
- Zhang J, Nguyen HT, Blum A (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany* 50: 291-302.
- Zhao Y, Aspinall D, Paleg LG (1992) Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycinebetaine against the effects of freezing. *Journal of Plant Physiology* 140: 541-543.