Archive of SID

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال ششم، شماره پانزدهم، پائیز ۱۳۹۵ (۵۲-۳۷)

Crop Biotech.
Autumn (2016) 15: 37-52.

افزایش مقاومت به تنش شوری در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا با فرایان ژن فسفواتانول آمین N- متیل‌ترانسفراز اسفناج (*Spinacia oleracea*, Iranian landrace)

سمیه اللهی[۱]، محمد مهدی سوهانی[۲*]، حسن حسنی[۳]
۱. دانشجوی دکتری، ۲. دانشیار و ۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۱۹- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۲۹)

Enhance salinity resistance in *Arabidopsis thaliana* by overexpression of phosphoethanolamine N-methyltransferase gene from spinach (*Spinacia oleracea*, Iranian landrace)

Somayeh Allahi[1], Mohammad Mehdi Sohani[2], Hassan Hasani[3]
1. Ph.D. Student, 2. Associate Professor, 3. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture Science, Guilan University, Rasht, Iran
(Received: Aug. 9, 2016 -Accepted: Nov. 19, 2016)

چکیده

یکی از مکانسیم‌های مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی تولید محلول سازگار گلایسین بتائین است. کولین پیش‌ساز این متابولیت مهم و همچنین یک ترکیب اصلی در حفظ یکپارچگی و سیگنالینگ غشای سلولی است. در گیاهان مهمترین مرحله تولید کولین را آنزیم سیتوپلاسمی فسفو اتانول آمین N-متیل ترانسفراز (PEAMT; EC 2.1.1.103) کاتالیز می‌کند. در این مطالعه ژن *PEAMT* از یک رقم محلی گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* Iranian landrace) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و در داخل وکتور کلونینگ (pJET) همسانه سازی شد. به منظور فرایان ژن *PEAMT* ، سازه ژنی *PEAMT*:PBI121^{GUS-9} ساخته و در نهایت به باکتری *Agrobacterium* سویه GV3101(PMP90) منتقل شد. تراریزش گیاهان با استفاده از روش غوطه‌ورسازی گل آذین انجام و آنالیز اولیه گیاهان تراریخت احتمالی با جوانه‌زنی بذور در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین بررسی شد. گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین در سطح مولکولی با استفاده از روش PCR غربالگری و تراریختی گیاهان در سطح رونوشت‌برداری با RT-PCR تایید شد. متعاقباً بررسی‌های فنوتیپی گیاهان تراریخت حاوی ژن *PEAMT* در شرایط تنش شوری نشان داد که طول ریشه اصلی گیاهان تراریخت از مقدار آن در گیاهان شاهد به طور معنی‌داری طویل‌تر، ریشه‌های فرعی گسترده‌تر و رشد رویشی بهتری داشته‌اند. اندازه‌گیری متابولیت گلایسین‌بتائین و آنزیم پراکسیداز نیز نشان داد که گیاهان تراریخته دارای محتوای گلایسین‌بتائین بیشتر و فعالیت آنزیم پراکسیدازی بالاتری نسبت به گیاهان شاهد داشته‌اند.

واژه‌های کلیدی: غوطه‌ورسازی گل آذین، فسفواتانول‌آمین N-متیل ترانسفراز (PEAMT)، کولین، گلایسین بتائین.

Abstract

One of the plant resistant mechanisms to abiotic stresses is production of a compatible solute named glycine betaine. Choline is the precursor of this important metabolite and it is also essential compound for the structural integrity and signaling of cell membrane. In plants, the most important step of choline production is catalyzed by cytoplasmic phosphoethanolamine N-methyltransferase (PEAMT ; EC 2.1.1.103) enzyme. In this study, *PEAMT* gene from spinach (*Spinacia oleracea* Iranian landrace) was amplified using specific primers and cloned into an intermediate cloning vector (pJET). In order to overexpression of *PEAMT* gene, the construct of PBI121^{GUS-9}:*PEAMT* was made and finally was transferred to the *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (PMP90). Floral dip method was used for transformation and initial analysis of putative transgenic plants was tested in selective medium containing kanamycin. Then resistant seedlings at the molecular level were evaluated using PCR and RT-PCR methods. Results confirmed plant transformation in the level of transcription. Subsequently, The phenotypic analysis under salt stress showed that the main root length of transgenic plants was significantly longer than control nontransgenics. In adition, glycinebetaine contents and peroxidase activity were significantly higher in transgenic compare to non-transgenics control plants.

Keywords: Choline, Glycine betaine, Floral dip, Phosphoethanolamine N-methyltransferase (PEAMT).

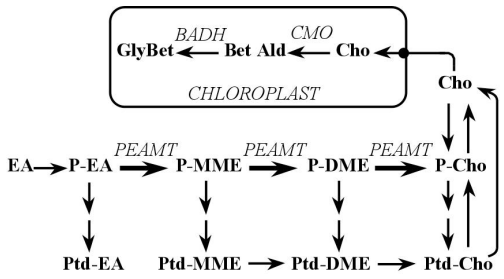
* نویسنده مسئول: محمدمهدی سوهانی
E-mail: msohani@guilan.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تولیدات گیاهان زراعی به شدت تحت تأثیر خشکی، شوری و دیگر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند. مطالعه بر روی گیاهان مقاوم به تنش‌ها (هالوفیت‌ها، زرفیت‌ها و ...) بعضی از مکانسیم‌های مقاومت به تنش در گیاهان را در سطوح مولکولی و متابولیکی مشخص کرده است. این مطالعات می‌تواند در ایجاد گیاهان زراعی مقاوم به تنش‌های محیطی از دیدگاه ژنتیکی کمک‌کننده باشد (Zhou *et al*., 2008). گیاهان هنگامی که در شرایط تنش قرار می‌گیرند کمیتِ دامنه متنوعی از متابولیت‌های درون سلولی آن‌ها شامل قندهای محلول، اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، پلی آمین‌ها و چربی‌ها تغییر می‌کند. از جمله این ترکیبات محلول‌های سازگار[1] هستند که ویژگی آن‌ها کوچک بودن، حلالیت بسیار بالا در آب و غیرسمی در غلظت‌های بالا است (Chen and Murata, 2011). گلایسین بتائین[2] (GlyBet) از جمله محلول‌های سازگار است که در بسیاری از موجودات مختلف وجود دارد و بین تجمع این ماده در گونه‌های گیاهی با مقاومت آن‌ها به تنش شوری همبستگی مشاهده شده است. زیستگاه بسیاری از گونه‌های گیاهی ذخیره‌کننده GlyBet نواحی خشک و شور است و این ترکیب را در پاسخ به خشکی و شوری ذخیره می‌کنند. باوجود این، چندین گونه گیاهی از جمله گیاهان زراعی مهم قادر به ذخیره GlyBet نیستند (Sakamoto *et al*., 2000). این محلول سازگار فشار اسمزی را در سیتوپلاسم سلول افزایش می‌دهد، باعث پایداری ماکرومولکول‌ها در طی دهیدراسیون سلولی می‌شود و در حفاظت غشاهای سلولی و کمپلکس‌های پروتئینی در طی رشد گیاهی در شرایط تنش‌زا اهمیت حیاتی دارد (Rhodes and Hanson, 1993). مسیر بیوسنتز GlyBet معمولاً از کولین[3] مشتق می‌شود و بیوسنتز کولین نیز در گیاهان با دیگر یوکاریوت‌ها متفاوت و از مسیرهای متنوعی صورت می‌گیرد (McNeil *et al*., 2001). در برگ‌ها و دیگر بافت‌های رویشی مرحله آغازین شامل متیلاسیون فسفواتانول آمین[4] (P-EA) و تولید فسفومنومتیل اتانول آمین اتانول آمین[5] (P-MME) است، دو مرحله بعدی متیلاسیون می‌تواند در سطح فسفوکولین[6] (P-Cho)، فسفاتیدیل کولین[7] (Ptd-Cho) یا ترکیبی از دو مسیر رخ دهد که به گونه گیاه بستگی دارد (شکل ۱).



شکل ۱. مسیر بیوسنتز گلایسین بتائین در گیاهان (McNeil *et al*., 2001)

سه مرحله متیلاسیون فسفواتانول آمین به منظور تشکیل فسفوکولین را آنزیم فسفواتانول آمین N-متیل ترانسفراز (PEAMT; EC 2.1.1.103) کاتالیز می‌کند، که یک مرحله بیوشیمیایی مهم در سنتز فسفولیپدها و فسفاتیدیل‌کولین در گیاهان، نماتدها، باکتری‌ها، پشه مالاریا پارازیت انسانی و ... است (Zhang *et al*., 2010). در گیاه اسفناج و چغندرقند دو مرحله بعدی متیلاسیون در سطح فسفوکولین، در گیاه سویا در سطح فسفاتیدیل کولین و در گیاه هویج ترکیبی از هر دو مسیر رخ می‌دهد.

1. Compatible solute
2. Glycinebetaine
3. Choline
4. Phospho-ethanolamine
5. Phospho-monomethyl-ethanolamine
6. Phospho-choline
7. Phosphatidyl-choline

www.SID.ir

Archive of SID

در گیاهان بیوسنتز کولین در هر یک از سه مسیر که رخ دهد، مرحله آغازین متیلاسیون بر روی فسفواتانول آمین و توسط آنزیم PEAMT صورت می‌گیرد. در گیاه اسفناج و چغندرقند مقادیر زیادی از کولین جهت تولید محافظت کننده اسمزی GlyBet از طریق مسیر نشان داده شده در شکل ۱ مصرف می‌شود زیرا، تجمع GlyBet مقاومت به تنش‌های اسمزی مانند شوری و خشکی را افزایش می‌دهد (Nuccio *et al*., 2000; Mou *et al*., 2002).

بر این اساس، تمایل زیادی وجود دارد تا بیوسنتز GlyBet در گیاهان دست‌کاری شود بخصوص گیاهانی که توانایی تجمع این ماده را ندارند. همچنین توجه زیادی به مسیر بیوسنتز کولین و تنظیم آن به عنوان پیش ماده بیوسنتز GlyBet معطوف شده است. مطالعات بیوشیمیایی و بیوفیزیکی نشان داده است مرحله اول متیلاسیون که توسط آنزیم PEAMT انجام می‌شود نقطه کنترل و آنزیم کلیدی در بیوسنتز کولین است. کنترل این مرحله از طریق دو مکانسیم صورت می‌گیرد ابتدا اثر مهاری فسفوکولین بر روی آنزیم PEAMT و دیگری اثر مهاری فسفوکولین بر روی بیان ژن *PEAMT* است (Chen and Murata, 2011). بنابراین، این آنزیم هدف اولیه برای دستکارهای ژنتیکی به منظور افزایش تولید کولین و GlyBet در گیاهان می‌باشد. علاوه بر نقش کلیدی کولین در مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی، کولین یک ماده مغذی ضروری در رژیم غذایی انسان‌ها است. کولین به‌دلیل نقش آن در سنتز فسفاتیدتیل کولین فسفولیپدِ غشا یک متابولیت حیاتی در گیاهان و در دیگر یوکاریوت‌ها می‌باشد (Zeisel, 2006). بیوسنتز GlyBet در کلروپلاست را دو آنزیم کولین منواکسیژناز (CMO) و بتائین آلدهیدروژناز (BADH) از ماده اولیه کولین کاتالیز می‌کنند (شکل ۱). کلونینگ و انتقال این دو آنزیم از منابع مختلف باکتریایی و گیاهی انجام شده است (Chen and Murata, 2011). گیاهان تراریخت تولید شده تجمع GlyBet را در سطوح مختلف نشان دادند و مقاومت افزایش یافته‌ای را به انواع تنش‌های محیطی مختلف داشتند (Wu *et al*., 2007). با وجود این، گیاهان تراریخت تولید شده شامل تنباکو حامل ژن *CMO* از گیاه چغندرقند (Zhang *et al*., 2008)، هویج حامل ژن *BADH* از گیاه اسفناج (Kumar *et al*., 2004)، برنج حامل ژن کولین اکسیداز *codA* از منابع باکتریایی (Su *et al*., 2006)، آرابیدوپسیس حامل ژن *PEAMT* از گیاه ذرت (Wu *et al*., 2007) سطوح پایینی از GlyBet را نسبت به گیاهان طبیعی تجمع‌کننده GlyBet مانند اسفناج و چغندرقند ذخیره می‌کنند که مقدار آن در سطح میکرو مول است. ولی همین سطوح پایین GlyBet مقاومت قابل توجهی را به تنش‌های مختلف محیطی ایجاد کرده است (Chen and Murata, 2011). یک فاکتور محدودکننده اصلی ذخیره گلایسین بتائین در گیاهان تراریخته دسترسی به مقادیر کافی کولین داخلی به عنوان پیش ماده بیوسنتز GlyBet است (McNeil *et al*., 2001). در این راستا McNeil *et al.* (2001) گزارش کردند که فرابیان ژن کلیدی بیوسنتز کولین *PEAMT* به همراه دو ژن دیگر بیوسنتز گلایسین بتائین *CMO*، *BADH* بیوسنتز کولین و GlyBet را به مقدار قابل توجهی افزایش و مقاومت به تنش شوری را بهبود داد.

یکی از اثرهای مخرب تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، خشکی، گرما و سرما در گیاهان القاء تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. تحت شرایط تنش تعادل بین تولید و مهار رادیکال‌های آزاد برهم می‌خورد و میزان آن در گیاه افزایش می‌یابد که این تجمع باعث تخریب ماکرومولکول‌های درون سلولی می‌شود (Einset and Connolly, 2009). گیاهان دارای دو نوع از سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیداتیوی هستند که یکی از طریق سیستم آنزیمی مانند کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتا، آسکوربات

www.SID.ir

Archive of SID

پراکسیداز و ... دیگری از طریق سیستم غیرآنزیمی مانند اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، ترکیبات فنولی. مطالعه ریزآرایه گیاهان تراریخته با ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز GlyBet نشان داده است که GlyBet در افزایش فعالیت اکسیداتیوی گیاهان نقش موثری داشته است (Chen and Murata, 2011). به طور کلی مطالعات بر روی گیاهان تراریخته نشان داد که فرابیان ژن *PEAMT* مقدار کولین داخلی را افزایش می‌دهد. دسترسی به کولین داخلی یک فاکتور مهم در تولید و افزایش بیوسنتز GlyBet در این دسته از گیاهان است (McNeil *et al*., 2001).

آنزیم PEAMT همچنین در مقاومت به تنش در برخی اندام‌های زایشی مانند گرده و کلاله دارای اهمیت است. خاموشی ژن *PEAMT* در گیاه آرابیدوپسیس منجر به نرعقیمی حساس به دما شد که در نتیجه عدم توانایی بیوسنتز محافظت‌کننده‌های اسمزی و غلبه بر تنش اسمزی ایجاد شده در اثر دما بوده است (Mou *et al*., 2002). علاوه براین، گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های مسیر بیوسنتز GlyBet تحت شرایط تنش دارای فعالیت فتوسنتزی، اسمیلاسیون CO_2 و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به گیاهان شاهد هستند که حاصل آن رشد رویشی بیشتر، گل‌ها و میوهای بزرگتر و تعداد بذور بیشتری نسبت به گیاهان شاهد است (Chen and Murata, 2011). در تحقیق حاضر طول کامل ژن *PEAMT* کدکننده آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز کولین از گیاه اسفناج بومی ایران جداسازی شد. جهت بررسی نقش کارکردی، ژن مذکور تحت کنترل پرموتور CaMV 35S همسانه‌سازی و با استفاده از روش غوطه‌ورسازی گل آذین به گیاه آرابیدوپسیس منتقل شد. گیاهان تراریخت تولیدی آنالیز مولکولی شدند و فنوتیپ مرتبط با شوری در آن‌ها مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده

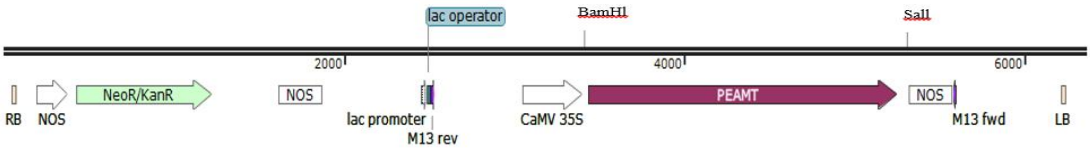
در این پژوهش جهت جداسازی ژن *PEAMT*، بذر گیاه اسفناج بومی ایران تهیه (شرکت پاکان بذر، اصفهان) و در گلدان‌های حاوی ورمی‌کولیت و پیت‌ماس (به نسبت مساوی) در شرایط ۸ ساعت روشنایی با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت تاریکی با دمای ۱۹ درجه سانتی‌گراد کشت و روزانه با محلول هوگلند (0.5 X) آبیاری شدند. به منظور افزایش فعالیت آنزیم فسفو اتانول آمین N–متیل ترانسفراز و سنتز کولین قبل از برداشت نمونه، گیاهان به مدت ۴۰ ساعت در تاریکی نگهداری شدند، سپس با محلول NaCl با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار تیمار و به مدت ۸ ساعت در شرایط روشنایی قرار گرفتند (Smith *et al*., 2000)، سپس نمونه‌های برگی تهیه و جهت استخراج RNA استفاده شدند.

سویه‌های باکتریایی و ناقل‌های مورد استفاده

در این مطالعه *E. Coli* سویه DH5α جهت تکثیر ناقل‌های پلاسمیدی و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101(PMP90) به منظور ترانسفورماسیون گیاه آرابیدوپسیس استفاده شد. همسانه‌سازی ژن *PEAMT* با استفاده از کیت کلونینگ CloneJET (Thermo Fisher) انجام شد. این کیت حاوی ناقل همسانه‌سازی pJET1.2/blunt است که دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد. جهت تراریزش گیاهان از ناقل بیانی $pBI121^{GUS-9}$ با نه جایگاه منحصر به فرد آنزیم‌های برشی بین پروموتر CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS استفاده شد که از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه شده بود (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. نمای شماتیک ناقل $PBI121^{GUS-9}$. ژن هدف (فلش قرمز) تحت کنترل پروموتر CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین در داخل مرزهای چپ و راست جهت گزینش گیاهان تراریخت (رسم با استفاده از برنامه SnapGene).

همسانه‌سازی ژن فسفواتانول آمین N- متیل ترانسفراز از گیاه اسفناج در داخل وکتور بیانی گیاهی

به منظور تکثیر طول کامل ژن *PEAMT* گیاه اسفناج بومی، اطلاعات و توالی ژن‌های *PEAMT* موجود در سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) جمع آوری و مطالعه شد. بر این اساس، یک جفت آغازگر اختصاصی پیشرو 5'-CTA TAG GAT CCA TGG CCG CTT CAG CTA TGG-3' دارای جایگاه برشی *BamH*I و پسرو 5'-GGT CCG TCG ACT CAC ATT TTC TTG GCA ATG-3' دارای جایگاه برشی *Sal*I برای ابتدا و انتهای ژن *PEAMT* اسفناج با استفاده از نرم‌افزار Primer 3.0 طراحی شد.

به منظور تکثیر ژن *PEAMT* اسفناج، RNA با استفاده از کیت RNX-Plus (سینا کلون) از نمونه‌های برگی استخراج شد. آلودگی DNA ژنومی نمونه‌های استخراج شده با تیمار آنزیم DNase I (Thermo Fisher) حذف شد. سنتز cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA و پرایمر Oligo dT براساس دستورالعمل شرکت سازنده (Thermo Fisher) انجام شد. در ادامه تکثیر ژن *PEAMT* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و طبق برنامه PCR با دمای واسرشته‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اجراء شد.

جهت همسانه‌سازی ژن مربوط، محصول PCR با استفاده از کیت استخراج از ژل (Thermo Fisher) خالص‌سازی شد. واکنش الحاق با استفاده از کیت مربوط و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Thermo Fisher) CloneJET PCR Cloning Kit انجام شد. محصول این واکنش الحاق با استفاده از الکتروپوریشن (Bio Rad, MicroPluser) به درون سلول‌های مستعد *E. Coli* ترانسفورم شد. به منظور تایید ترانسفورماسیون، باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط انتخابی LB حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ µg/ml) کشت شدند، کلونی‌های شکل گرفته مستقیماً با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن تحت واکنش کلونی PCR قرار گرفتند که وجود محصولی با سایز حدود ۱۴۸۵bp صحت انتقال ژن PEAMT را به دورن باکتری *E. Coli* تایید کرد. استخراج پلاسمید از باکتری‌های رشد کرده در محیط انتخابی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Thermo Fisher) انجام و جهت تایید نهایی واکنش هضم آنزیمی دوگانه با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Sal*I (Thermo Fisher) انجام شد. ناقل حاوی ژن مورد نظر جهت توالی‌یابی به شرکت (Bioneer, Korea) ارسال شد. بعد از تایید با توالی‌یابی، ژن هدف با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sal*I (Thermo Fisher) از ناقل pJET ایزوله و به ناقل گیاهی $PBI121^{GUS-9}$ انتقال یافت و در ادامه واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T_4 لیگاز (Thermo

www.SID.ir

Archive of SID

Fisher) انجام شد. باکتری‌ها در محیط انتخابی حاوی کانامایسین (۵۰ µg/ml) کشت و صحت درج ژن با استفاده از PCR مستقیم کلونی‌ها و هضم آنزیمی بررسی شد. ناقل گیاهی حاوی ژن هدف پس از تکثیر در باکتری *E. coli* به درون سلول‌های مستعد *Agrobacterium* سویه GV3101(PMP90) منتقل شد.

تراریزش گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از روش غوطه‌ورسازی گل‌آذین

ابتدا بذور گیاه آرابیدوپسیس ضدعفونی و به منظور شکستن خواب و جوانه‌زنی یکنواخت مدت ۴ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس بذور در گلدان‌های ۷ سانتی‌متر در مخلوط خاکی ورمی‌کمپوست، ورمی‌کولیت، پیت‌ماس و پرلیت با نسبت‌های به‌ترتیب (۱: ۲: ۱: ۲) کشت و در اتاقک رشد با دمای ۲۲- ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت یک ماه ساقه گل‌دهنده اولیه ظاهر می‌شود، که به منظور تولید گل‌آذین‌های بیشتر این ساقه گل‌دهنده قطع شد. مناسب‌ترین زمان جهت تلقیح زمانی است که هر گیاه علاوه بر داشتن چندین گل‌آذین باز دارای چند غلاف بسته نیز باشد (Zhang *et al*., 2006). به منظور تراریزش سه روز قبل، ابتدا تک کلونی *Agrobacterium* حاوی ناقل مورد نظر و رشد کرده بر روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسن، جنتامایسن و ریفامپیسن انتخاب و به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مذکور جهت کشت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۵۰ دور در دقیقه انتقال داده شد. سویه *Agrobacterium* GV3101(PMP90) دارای مقاومت ذاتی به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و ریفامپیسین می‌باشد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت این کشت آغازگر به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی انتقال داده شد و زمانی که OD600 باکتری به ۱/۵ رسید جهت تراریزش استفاده شد. سوسپانسیون باکتری با سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شد، سپس در ساکارز ۵ ٪ حل و Silwet L-77 به غلظت نهایی ۰/۰۵٪ به سوسپانسیون تلقیح اضافه شد (Zhang *et al*., 2006). تراریزش با غوطه‌ورسازی گل آذین گیاهان به مدت ۴۰ ثانیه درون سوسپانسیون باکتری همراه با تکان‌های آهسته انجام شد. سپس گیاهان درون کیسه پلاستیکی قرار داده شده و در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت به صورت خوابیده بر روی زمین نگهداری شدند. در مرحله بعد گیاهان به شرایط رشد طبیعی برگردانده می‌شوند تا به مرحله بذردهی برسند.

بررسی و تایید گیاهان تراریخته

جهت بررسی و تایید تراریزش گیاهان، ابتدا بذور در محیط انتخابی MS ½ حاوی ۱٪ ساکارز و کانامایسین (۵۰ µg/ml) کشت شدند. بعد از گذشت دو هفته گیاهان جوانه زده و مقاوم بر روی محیط انتخابی به خاک انتقال داده شدند. به منظور بررسی حضور ژن *PEAMT* از گیاهان مقاوم به کانامایسین نمونه برگی تهیه، DNA با استفاده از روش CTAB استخراج و واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *PEAMT* استفاده شده در بخش کلونینگ این ژن انجام شد. در ادامه از گیاهان نسل T_1 و T_2 استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus (سینا کلون) و سنتز cDNA صورت گرفت و واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *PEAMT* انجام شد.

آزمون بررسی رشد ریشه اصلی در شرایط تنش NaCl

بذور گیاهان تراریخت و شاهد در محیط MS ½ حاوی یک درصد ساکارز کشت و به مدت ۳ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار داده شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

چهار روز بعد از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به محیط کشت MS ½ حاوی ۱٪ ساکارز و حاوی غلظت‌های ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl منتقل شدند (Li *et al*., 2010; Wu et al., 2007). طول ریشه‌های هر کدام از گیاهان ۵ روز پس از تیمار اندازه‌گیری شد (Li *et al*., 2010). آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار و هر تکرار شامل ۶ گیاهچه انجام شد، همچنین مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد.

اندازه‌گیری متابولیت GlyBet و فعالیت آنزیم پراکسیداز وابسته به گایاکول

اندازه‌گیری متابولیت GlyBet و فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) وابسته به گایاکول در نسل T_2 بر روی گیاهان ۴ هفته‌ای شاهد و تراریخت پس از اعمال تیمار NaCl در غلظت ۱۵۰ mM بعد از گذشت ۳ روز انجام شد. برای این‌منظور ۰/۵ گرم بافت از گیاهان تراریخت جدا و به خوبی پودر و اندازگیری متابولیت GlyBet در گیاهان شاهد و تراریخت براساس دستورالعمل Grieve *et al.* (1983) انجام شد. همچنین ۰/۵ گرم بافت گیاهی به خوبی پودر و سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم POD وابسته به گایاکول براساس دستورالعمل Amako *et al.* (1994) انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار و همچنین مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماریSAS انجام شد.

نتایج و بحث

تایید کلونینگ ژن *PEAMT*

به منظور جداسازی ژن *PEAMT*، ابتدا RNA از برگ‌های جوان گیاه اسفناج ۴ هفته‌ای استخراج سپس نسخه cDNA ژن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با آنزیم *pfu* (Thermo Fisher) سنتز و یک قطعه به طول حدود ۱۴۸۵ bp تکثیر شد. تعدادی کلونی در نتیجه ترانسفورماسیون باکتری *E.coli* با سازه ژنی pJET:PEAMT نوترکیب بر روی پتری‌های محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین رشد کردند. جایگاه چندگانه کلونینگ ناقل مورد استفاده در این تحقیق در درون ژن کدکننده یک آنزیم کشنده قرار دارد که با درج DNA نوترکیب غیرفعال می‌شود بنابراین، فقط سلول‌های باکتری حاوی ناقل نوترکیب قادر به تشکیل کلونی هستند و از تشکیل کلونی‌های حاصل از لایگیشن خودبخودی ناقل بدون درج DNA نوترکیب جلوگیری می‌شود. علاوه بر آسانی در غربالگری سلول‌های ترانسفورم شده این کیت قابلیت کلونینگ قطعات با انتهای صاف و تکثیری با آنزیم *pfu* را نیز دارد. جهت بررسی موفقیت‌آمیز بودن ترانسفورماسیون و اطمینان از درج ژن درون ناقل، واکنش کلونی PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن*PEAMT* انجام و در اغلب کلونی‌ها یک قطعهbp ۱۴۸۵ تکثیر شد. بعد از تایید حضور ژن در باکتری، از باکتری‌های ترانسفورم شده احتمالی استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *BamH*I و *Sal*I انجام شد و باندهای حدود ۱۴۸۵ bp و ۳۰۰۰ bp که به ترتیب مربوط به ژن *PEAMT* و بدنه ناقل بود بر روی ژل آگارز یک درصد مشاهده شد. این نتیجه مجدداً صحت درج ژن در درون ناقل کلونینگ را تایید کرد.

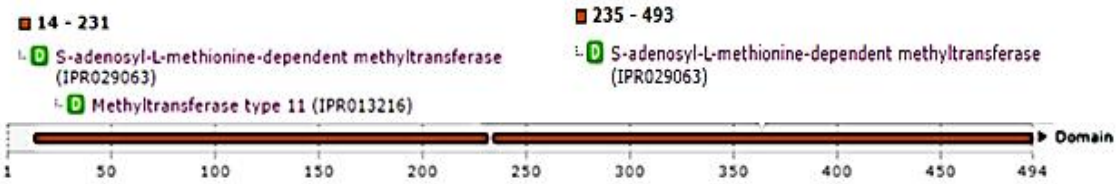
آنالیز بیوانفورماتیکی توالی ژن *PEAMT*

ژن *PEAMT* با استفاده از پرایمرهای طراحی شده تکثیر شد. توالی‌یابی محصول PCR و انجام BLAST در سایت (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) NCBI صحت توالی ژن *PEAMT* تایید کرد. توالی به‌دست آمده یک ژن جدید از منشاء اسفناج توده بومی ایران بوده است که با شماره دسترسی KR865952 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد.

www.SID.ir

Archive of SID

به منظور شناسایی دومین‌های مختلف پروتئین PEAMT، توالی اسید آمینه آن در سایت Interpro (http://www.ebi.ac.uk) بررسی شد. نتایج نشان داد این پروتئین دارای ۴۹۴ اسید آمینه و دارای دو دومین متیل ترانسفرازی است که بصورت متوالی در کنار هم قرار گرفته‌اند (شکل ۳). نتایج نشان داد که PEAMT احتمالاً از طریق مضاعف شدگی یا ادغام ژن‌ها ایجاد شده است (Zhang, 2003).



شکل ۳. نمای شماتیک دومین‌های متیل ترانسفرازی ژن *PEAMT* با استفاده از برنامه Interpro. دومین اول (خط قرمز پیوسته) از اسید آمینه ۲۳۱-۱۴ (گروه دوم: آنزیم‌های PEAMT گیاهی) و دومین دوم از اسید آمینه ۴۹۳-۲۳۵ را شامل می‌شود.

آنزیم‌های PEAMT براساس ساختار اولیه و توزیع دومین‌های کاتالیکی به چهار گروه تقسیم بندی می‌شوند. گروه یک شامل آنزیم‌های مالاریا (به طول ۲۶۶-۲۶۳ اسید آمینه) و پروتئوباکتری‌ها (به طول ۱۶۴ اسید آمینه) و دارای یک دومین متیل ترانسفرازی می‌باشد. گروه دوم شامل آنزیم‌های دو قسمتی دارای ۵۸۰-۴۵۰ اسید آمینه و دو دومین متیل ترانسفرازی می‌باشند. این گروه شامل آنزیم‌های PEAMT گیاهان، zebrafish، *P. infestans*، lancelet Florida، frogs می‌شود. گروه سوم و چهارم شامل آنزیم‌های *PEAMT* از *C. elegans* و *C. briggsae* که از نظر اندازه دوبرابر آنزیم مالاریا است اما شامل یک دومین کاتالیکی متیل ترانسفرازی در سمت N-ترمینال (گروه ۳) ویا در سمت C-ترمینال (گروه ۴) می‌باشد (Bobenchik *et al.*, 2011). آنالیز دومین‌های پروتئینی PEAMT اسفناج بومی ایران نشان داد که دارای دو دومین متیل ترانسفرازی است و در گروه دوم آنزیم‌های PEAMT (گروه گیاهان) قرار دارد.

بررسی فیلوژنی توالی پروتئینی PEAMT اسفناج بومی ایران با تعدادی از انواع شناخته شده گیاهی این پروتئین انجام و با نرم‌افزار MEGA و روش Maximum Likelihood با آزمون Bootstrap (1000) آنالیز شد. توالی‌های پروتئینی *PEAMT* گیاهان تک‌لپه و دولپه در این دندروگرام به خوبی از یکدیگر متمایز شده‌اند. در همین خصوص توالی پروتئینی گندم و برنج در یک دسته و گیاهان دولپه اسفناج، کلزا، گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس در گروه دیگر قرار گرفتند (شکل ۴). در دسته‌بندی گیاهان دولپه توالی پروتئینی PEAMT اسفناج توده بومی ایران با توالی اسفناج رقم ساوی هیبرید ۶۱۲ در یک گروه، توالی پروتئینی PEAMT کلزا و آربیدوپسیس در گروه دیگر و توالی پروتئینی PEAMT گوجه‌فرنگی مابین این دو گروه قرار گرفت که نشان‌دهنده حفاظت شدگی بالای این پروتئین درون گیاهان دولپه و تک‌لپه است.

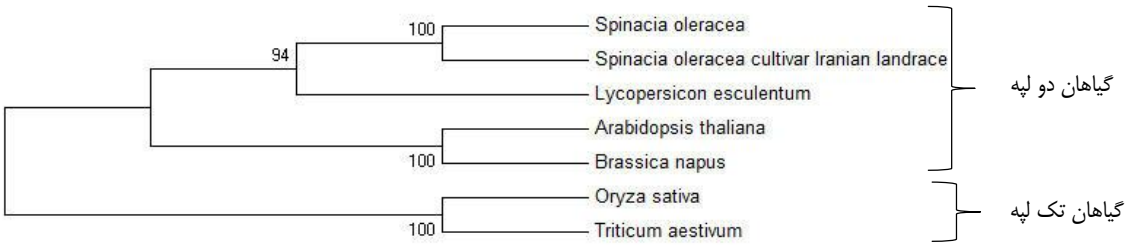
تایید تراریزش گیاهان و آنالیز گیاهان تراریخت حامل تراژن *PEAMT*

پس از آنالیز و تایید با توالی یابی، ژن*PEAMT* با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sal*I (Thermo Fisher) هضم و در درون ناقل بیانی $PBI121^{GUS-9}$ کلون شد. صحت درج ژن *PEAMT* درون ناقل بیانی با واکنش کلونی PCR و هضم آنزیمی دوگانه اثبات شد. ناقلین دوتایی به طور گسترده در انتقال ژن به گیاهان به‌واسطه *Agrobacterium* استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

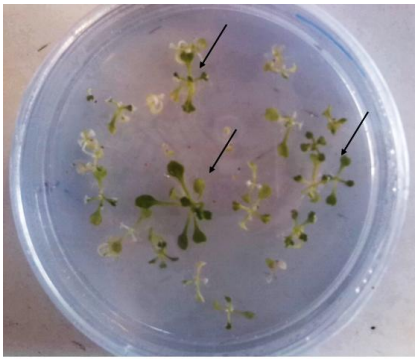
می‌شوند. در بسیاری از مطالعات انتقال ژن به واسطه *Agrobacterium* از ناقلین مبتنی بر PBI121 استفاده می‌شود. البته به دلیل تعداد محدود جایگاه‌های منحصر به فرد شناسایی آنزیم‌های برشی در این ناقل، در برخی موارد ساخت سازه‌های انتقالی با مشکل مواجه می‌شود. در این راستا از ناقل بیانی مهندسی شده $PBI121^{GUS-9}$ دارای نه جایگاه برشی منحصر به فرد آنزیم‌های برشی اهدایی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری استفاده شد (Esfahani and Salmanian, 2013).



شکل ۴- آنالیز فیلوژنی توالی پروتئینی برخی از پروتئین‌های PEAMT در گیاهان مختلف.

عوامل متعددی می‌تواند در بهبود کارایی تراریزش مؤثر باشند که از جمله انتخاب روش تراریزش و سویه مناسب *Agrobacterium* است. در این تحقیق از روش غوطه‌ورسازی گل آذین استفاده شد. مزیت این روش نسبت به سایر روش‌ها این است که اغلب روش‌های تراریزش وابسته به کشت بافت گیاه و در بسیاری از موارد تولید کالوس است که باید به گیاه کامل باززایی شوند و نیاز به صرف وقت و هزینه است. در روش غوطه‌ورسازی گل آذین هر چند کارایی پایین است اما از آنجایی‌که گیاه آرابیدوپسیس بذور زیادی تولید می‌کند، تعداد گیاهان تراریخت تولید شده در حد قابل قبول است. همچنین در این روش نیاز به استفاده از کشت بافت نیست و لذا مشکلات مربوط به ایجاد تنوع سوماکلونال، اثرات اپی‌ژنتیکی و نوترکیبی کروموزومی وجود ندارد (Kaeppler *et al.*, 2000). همچنین از سویه *Agrobacterium* GV3101 (PMP90) استفاده شد که مناسب روش غوطه‌ورسازی گل آذین است (Zhang *et al.*, 2006).

پس از تراریزش، بذور گیاهان بر روی محیط کشت انتخابی MS ½ حاوی کانامایسین (۵۰µg/ml) کشت شدند. بذور تراریخت احتمالی نسبت به آنتی‌بیوتیک مقاوم و پس از گذشت دو هفته دارای برگ‌های سبز و ریشه‌های توسعه یافته بودند. بذور گیاهان غیرتراریخت (شاهد) پس از چند روز در محیط انتخابی جوانه‌زنی محدود داشته‌اند، کلروفیل برگ‌ها از بین رفته و در نهایت گیاهان مردند (شکل ۵).



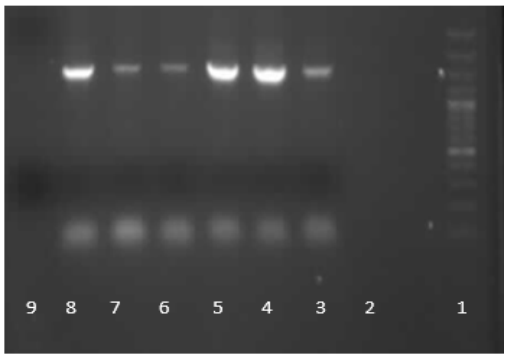
شکل ۵. جوانه زنی بذور آرابیدوپسیس تراریخت دو هفته پس از کشت در محیط انتخابی. گیاهان مقاوم و تراریخت (→) سبز و ریشه‌های توسعه یافته داشته‌اند اما غیرتراریخت‌ها رشد نکرده، کوچک و سفید ماندند.

گیاهچه‌های مقاوم به گلدان انتقال داده شدند، از گیاهچه‌های سبز و زنده DNA استخراج و واکنش

www.SID.ir

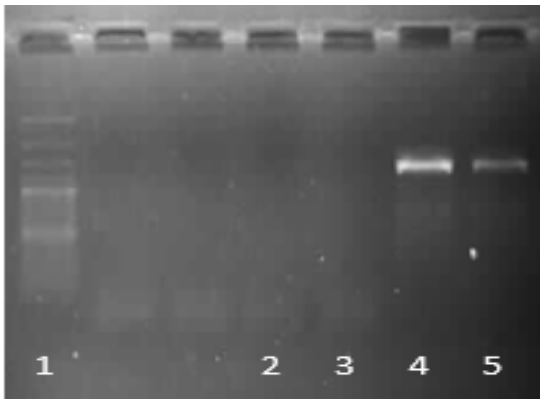
Archive of SID

PCR با پرایمرهای اختصاصی *PEAMT* انجام شد. در تعدادی از آنها یک باند به اندازه bp ۱۴۸۵ مشاهده شد در حالی که باند مذکور در گیاهان شاهد وجود نداشت. این غربالگری بر روی تمامی گیاهان تراریخته احتمالی نسل‌های T_1 و T_2 نیز انجام شد (شکل ۶).



شکل ۶. واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *PEAMT*. ۱- مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ۲- کنترل منفی؛ ۳-۸- گیاهان تراریخته حاوی باند bp ۱۴۸۵ مربوط به ژن *PEAMT*؛ ۹- گیاه غیرتراریخت (شاهد).

به‌منظور بررسی رونوشت برداری ژن *PEAMT* در گیاهان تراریخته واکنش RT-PCR در لاین‌های تراریخت شماره ۱، ۲ و گیاه شاهد آرابیدوپسیس (Col-0) انجام شد. واکنش RT-PCR گیاهان تراریخت حاوی باندی به طول حدود bp ۱۴۸۵ بود. این نتایج نشان داد *PEAMT* می‌تواند بخوبی در گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس رونوشت برداری شود در حالی که گیاهان شاهد فاقد باند مذکور بودند (شکل ۷).



شکل ۷. نتیجه واکنش RT-PCR ژن *PEAMT*. ۱- مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ۲- کنترل منفی (آب به عنوان الگو)؛ ۳- گیاه شاهد (Col-0)؛ ۴- کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن مورد نظر)؛ ۵- لاین تراریخت

ارزیابی‌های فنوتیپی گیاهان تراریخت *PEAMT* تحت تنش شوری

ارزیابی فنوتیپی طول ریشه اصلی در گیاهان تراریخت و شاهد اکوتیپ Col-0 تحت تنش شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار انجام شد. تجزیه واریانس آزمون بررسی رشد ریشه اصلی در شرایط تنش NaCl درگیاهچه‌های دو هفته‌ای شاهد و تراریخت نشان داد که اثرات ساده فاکتورهای ژنوتیپ در سطح احتمال ۵٪ و غلظت در سطح احتمال ۱٪ دارای تفاوت معنی‌داری بوده‌اند (جدول ۱).

www.SID.ir

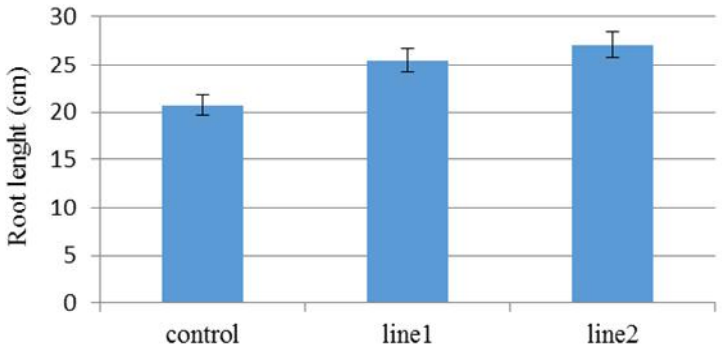
Archive of SID

نتایج مقایسه میانگین اثر ساده ژنوتیپ نشان داد که بیشترین مقدار طول ریشه اصلی مربوط به لاین تراریخت شماره ۲ با ۲۷/۰۸ cm و بعد از آن لاین تراریخت شماره ۱ با ۲۵/۵ cm و کمترین مقدار طول ریشه اصلی مربوط به گیاهان شاهد آرابیدوپسیس Col-0 با طول ۲۰/۷ cm بوده است (شکل ۸). تفاوت در میزان رشد در لاین‌های تراریخت می‌تواند مربوط به جایگاه درج ژن و یا تعداد کپی ژن درون ژنوم گیاه باشد (Yin *et al*., 2006).

جدول ۱. تجزیه واریانس طول ریشه اصلی در گیاهچه‌های دو هفته‌ای تراریخت و شاهد (Col-0)

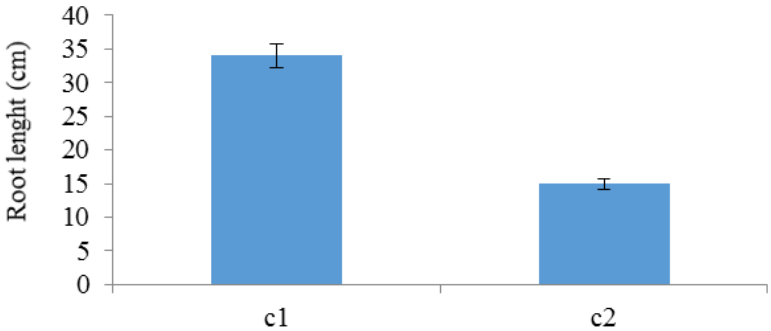
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات طول ریشه اصلی
ژنوتیپ	2	0.0502^{*}
تیمار	1	0.6450^{**}
ژنوتیپ × تیمار	2	0.0222^{ns}
خطای آزمایش	12	0.0093
کل	17	

*: معنی‌داری در سطح ۵٪ ، **: معنی‌داری در سطح ۱٪ ، ns عدم معنی‌داری.



شکل ۸. نمودار مقایسه میانگین اثر ساده ژنوتیپ بر طول ریشه: در شرایط تنش شوری گیاه غیرتراریخت (شاهد) به طور معنی داری طول ریشه کوتاه‌تری نسبت به گیاهان تراریخت (لاین ۱ و ۲) داشته‌اند.

مقایسه میانگین اثر ساده غلظت NaCl در گیاهان شاهد Col-0 نشان داد که با افزایش غلظت نمک طول ریشه اصلی کاهش یافته است. در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار طول ریشه اصلی ۳۳/۹۸ cm و در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار مقدار آن ۱۴/۹۱ cm بوده است. گیاهان آرابیدوپسیس در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl نیز رشد بیشتری نسبت به غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار داشتند (شکل ۹).



شکل ۹. نمودار مقایسه میانگین اثر ساده غلظت NaCl: با افزایش غلظت نمک از ۱۰۰ (c1) به ۲۰۰ (c2) میلی‌مولار طول ریشه اصلی به طور معنی‌داری کاهش یافت.

www.SID.ir

Archive of SID

آرابیدوپسیس از نظر مقاومت به شوری در دسته گیاهان گلیکوفیت قرار دارد، لذا در سطح شوری نسبتاً بالا سریعاً آسیب دیده و رشد این گیاهان مختل می‌شود (Galvan-Ampudia and Testerink, 2011). بر این اساس، تعدادی از گیاهان شاهد تحت تیمار شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در مدت دو هفته از بین رفتند در حالی‌که گیاهان تراریخت سبز و شاداب باقی ماندند. علاوه بر رشد رویشی بیشتر و بهتر گیاهان تراریخت تفاوت در رشد طولی ریشه‌های اصلی و کلاً گستردگی ریشه‌ها در این دسته از گیاهان کاملاً مشهود بود. شوری بر رشد ریشه اصلی و تشکیل ریشه‌های فرعی در گیاهان تأثیر سوء دارد. تحت تنش شوری مقدار آب موجود در گیاهچه‌ها یا به عبارتی مقدار آب جذب شده توسط گیاهچه کاهش می‌یابد که منجر به کاهش تقسیم سلولی و رشد گیاهچه از جمله رشد ریشه می‌شود (Galvan-Ampudia and Testerink, 2011). اسمولیت‌هایی مانند پرولین و GlyBet از طریق حفظ فشار اسمزی در بافت‌ها به حفظ آب درون بافت‌ها کمک می‌کند (Saker *et al.*, 20012). همچنین GlyBet از طریق حفظ ساختار کمپلکس پروتئینی سیستم فتوسنتزی II و فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مقدار فتوسنتز و اسمیلاسیون CO_2 را در گیاهان تراریخته افزایش می‌دهد در نتیجه گیاهان تراریخته دارای رشد بیشتری نسبت به گیاهان شاهد تحت شرایط تنش می‌باشند (Chen and Murata, 2011). با توجه به اینکه کولین پیش ماده بیوستز GlyBet در کلروپلاست است، نتایج آزمایش ما نیز نشان می‌دهد که گیاهان آرابیدوبسیس تراریخته حاوی ژن *PEAMT* اسفناج دارای رشد بهتری نسبت به گیاهان شاهد تحت تنش شوری هستند.

لاین موتانت XIPOTL1 آرابیدوپسیس با درج T-DNA در لوکوس At3g18000– ژن کدکننده آنزیم PEAMT– تولید شد (Cruz-Ramírez *et al.*, 2004). این موتانت تغییرات قابل توجهی در مراحل نمو ریشه داشت، بطوری که در مرحله گیاهچه‌ای دارای ریشه‌های اولیه کوتاه، تعداد ریشه‌های جانبی زیاد، سلول‌های اپیدرمی کوتاه و به‌طور کلی دارای یک مورفولوژی غیر طبیعی نسبت به گیاهان طبیعی بودند. این محققان استنتاج کردند که مولکول‌هایی که پایین دست مسیر بیوسنتز کولین تولید می‌شوند دارای نقش کلیدی در توسعه سیستم ریشه‌ای هستند. نتایج آزمایش ما نیز نشان داد که گیاهان تراریخت حاوی ژن *PEAMT* دارای سیستم ریشه توسعه یافته‌تری نسبت به گیاهان شاهد هستند.

در سال ۲۰۱۰ Zhang *et al.* نیز گزارش کردند که رشد و مقاومت گیاه آرابیدوپسیس تیمارشده با باکتری *Bacillus subtilis* (GB03) تحت تنش‌های اسمزی در مقایسه با شاهد افزایش یافت. تحقیقات نشان داد که تحت تیمار این باکتری خاکزی مقدار متابولیت کولین و GlyBet به ترتیب دو و پنج برابر در گیاهان تحت تیمار افزایش پیدا کرد که این افزایش مقدار متابولیت‌ها با مقاومت و رشد گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش اسمزی همبستگی داشت. آن‌ها همچنین گزارش کردند که بیان *PEAMT* در گیاهان آرابیدوپسیس تیمار شده با باکتری بیشتر از گیاهان غیر تیمار شده بوده است. این نتایج نشان‌دهنده نقش مثبت ژن *PEAMT* تحت تنش‌های محیطی است. تحقیقات بر روی گیاهان تراریخته حاوی دیگر ژن‌های مسیر بیوسنتز گلایسین بتائین مانند *CMO* و *BADH* (شکل ۱) نشان داد که تحت شرایط تنش و غیر تنش این گیاهان دارای رشد رویشی بالاتر، اندام‌های زایشی بزرگتر و تعداد بذور بیشتری بودند، که این یکی دیگر از مزایای تراریزش گیاهان با ژن‌های مسیر بیوسنتز GlyBet است که گیاهان تراریخت حتی در شرایط غیر تنش هم دارای عملکرد بیشتری نسبت به گیاهان شاهد هستند. همچنین این گیاهان دارای سطوح متابولیت GlyBet بالاتری هستند و مقاومت

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتری به انواع تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری، سرما و گرما در طی مراحل جوانه‌زنی، رشد رویشی و زایشی را دارا هستند (Chen and Murata, 2011). افزایش میزان رشد و بهره‌وری گیاهان تحت شرایط تنش‌های محیطی مختلف از طریق استعمال خارجی GlyBet و محلول پاشی گیاهان نیز تایید شده است (Einset and Connolly, 2009).

ارزیابی‌های متابولیکی گیاهان تراریخت *PEAMT*

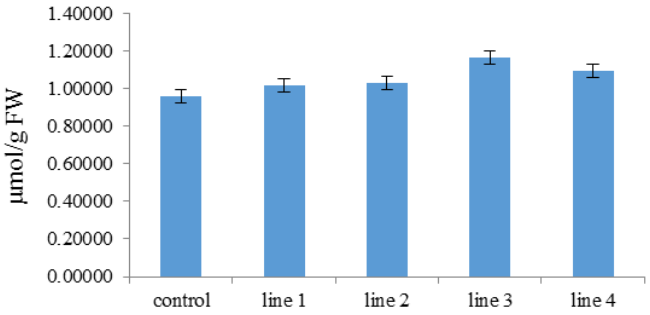
در این آزمایش آنالیز محتوای متابولیت GlyBet در گیاهان شاهد و تراریخت انجام شد. نتایج نشان داد که بین این گیاهان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد (جدول ۲).

گیاهان تراریخت حاوی ژن *PEAMT* به‌عنوان ژن کلیدی مسیر بیوسنتز کولین و پیش ماده بیوسنتز GlyBet در کلروپلاست، دارای محتوای GlyBet بیشتری نسبت به گیاهان شاهد بودند. نتایج مقایسه میانگین این گیاهان نشان داد که بیشترین مقدار GlyBet مربوط لاین شماره ۴ با مقدار ۱/۱۶ میکرو مول بر گرم وزن تر بوده است (شکل ۱۰).

جدول ۲. تجزیه واریانس متابولیت گلایسین بتائین در گیاهان ۴ هفته‌ای شاهد و تراریخت

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات متابولیت گلایسین بتائین
ژنوتیپ	4	0.01776**
خطای آزمایش	10	0.00005
کل	14	

** معنی‌داری در سطح ۱٪.



شکل ۱۰. اندازه‌گیری متابولیت گلایسین بتائین در گیاهان ۴ هفته‌ای شاهد (غیرتراریخت) و تراریخت (لاین‌های ۱ الی ۴).

متابولیت GlyBet به دو طریق باعث افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود. ۱- تجمع مقادیر زیاد این متابولیت در گیاهانی مانند اسفناج و چغندرقند حفظ تعادل اسمزی سلولی در شرایط تنش‌های محیطی مختلف را به دنبال داشت ۲- در نقش یک تنظیم‌کننده گیاهی می‌تواند باعث فعال‌سازی ژن‌های فاکتورهای رونویسی و آنتی‌اکسیدان‌های درگیر در ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی شود (Einset and Connolly, 2009). آنزیم پراکسیداز دارای توزیع گسترده‌ای در میان خانواده گیاهان عالی است. پراکسیدازها نقش‌های مختلفی مانند لیگنینی‌شدن[1]، متابولیسم اکسیداتیو، تحمل به تنش‌های شوری و فلزات سنگین را در گیاهان برعهده دارند. اعتقاد بر این است که افزایش فعالیت پراکسیدازها مسئول ایجاد یک مکانسیم آنتی‌اکسیدانی در طول شرایط تنش شوری است (Galvan-Ampudia and Testerink, 2011). در این خصوص میزان فعالیت

1. Lignification

www.SID.ir

Archive of SID

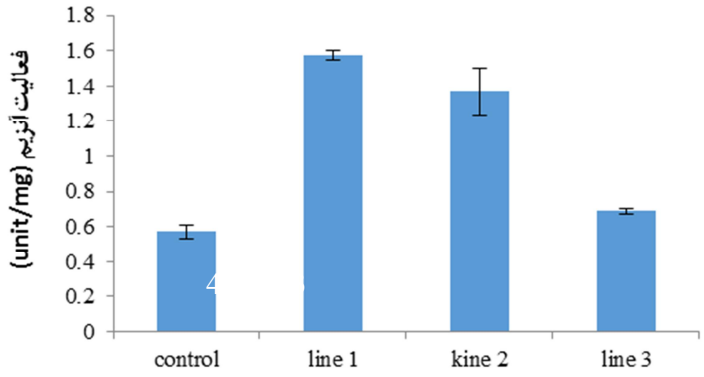
آنزیم پراکسیداز که یکی از آنزیم‌های دخیل در حذف رادیکال‌های آزاد است در گیاهان شاهد و تراریخت اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیز آنزیم پراکسیداز تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۱٪ در گیاهان شاهد و تراریخت نشان داد (جدول ۳).

گیاهان تراریخته دارای میزان فعالیت بیشتری نسبت به گیاه شاهد بودند و بیشترین میزان فعالیت مربوط به لاین شماره یک با مقدار فعالیت ۱/۵۷ (unit/mg) بود (شکل ۱۱).

جدول ۳. تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان ۴ هفته‌ای شاهدو تراریخت

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات فعالیت آنزیم پراکسیداز
ژنوتیپ	3	0.7297**
خطای آزمایش	8	0.0049
کل	11	

** معنی‌داری در سطح ۱٪.



شکل ۱۱. بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در گیاهان چهار هفته‌ای شاهد و تراریخت (لاین‌های ۱ الی ۳) ۳ روز پس از تیمار NaCl.

GlyBet مستقیماً دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نبوده بلکه اثر آن بطور غیرمستقیم از طریق القاء سنتز و یا فعال‌سازی سیستم‌های دفاعی و حذف رادیکال‌های آزاد اعمال می‌شود. اثر مذکور از طریق استعمال خارجی GlyBet و تأثیر آن بر روی سطوح فعالیت آنتی اکسیدانی و آنزیم‌های چرخه گلوتامات-آسکوربات در کشت سلولی گیاه تنباکو بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های این چرخه افزایش پیدا کرده است. همچنین مطالعات ریزآرایه در گیاهان تراریخته برنج (حامل ژن کولین‌اکسیداز از منابع باکتریای-*codA*) نشان داد که حداقل بیان ۱۶۵ ژن در گیاهان تراریخته از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است (Chen and Murata, 2011). نتایج آزمایش حاضر نیز نشان داد بیان ژن *PEAMT* اسفناج بومی در گیاهان آرابیدوپسیس تراریخته توانسته است مقدار متابولیت GlyBet و فعالیت پراکسیدازی را افزایش دهد و از این طریق در بهبود مقاومت گیاهان تراریخته به تنش‌های اسمزی نقش موثری داشته باشد.

در نتیجه‌گیری نهایی می‌توان گفت تنش غیرزیستیِ شوری گسترش گیاهان زراعی را محدود و عملکرد آن‌ها را کاهش داده است. در این مطالعه جداسازی و انتقال ژن *PEAMT* از یک اسفناج بومی به گیاه آرابیدوپسیس سبب شد تا از طریق تولید بیشتر متابولیت GlyBet و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر در بهبود مقاومت گیاهان تراریخت به تنش شوری نقش موثری داشته باشند. بنابراین، احتمالاً از طریق افزایش بیان ژن *PEAMT* اسفناج بومی

www.SID.ir

Archive of SID

می‌توان مقاومت و عملکرد گیاهان زراعی مهم مانند برنج و گندم را تحت تنش شوری افزایش داد.

REFERENCES

Amako K, Chen GX, Asada K (1994) Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. Plant Cell Physiol. 35(3): 497-504.

Bobenchik AM, Augagneur Y, Hao B, Hoch JC, Mamoun CB (2011) Phosphoethanolamine methyltransferases in phosphocholine biosynthesis: functions and potential for antiparasite therapy. FEMS Microbiol Rev. 35(4): 609-619.

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

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. Plant Cell. 16(8): 2020-2034.

Einset J, Connolly EL (2009) Glycine betaine enhances extracellular processes blocking ROS signaling during stress. Plant Signal Behav. 4(3): 197-199.

Esfahani K, Salmanian AH (2013) Designing and construction of new plant expression vectors with more recognition sites of restriction enzymes. 8th National Congress of Biotechnology, Tehran, Iran.

Galvan-Ampudia CS, Testerink C (2011) Salt stress signals shape the plant root. Curr Opin Plant Biol. 14(3): 296-302.

Grieve CM, Grattan SR (1983) Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium-compounds. Plant Soil. 70(2): 303-30.

Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Mol. Biol. 43(2-3): 179-188.

Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004) Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. Plant Physiol. 136(1): 2843-2854.

Li F, Guo S, Zhao Y, Chen D, Chong K, Xu Y (2010) Overexpression of a homopeptide repeat-containing bHLH protein gene (OrbHLH001) from Dongxiang Wild Rice confers freezing and salt tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant Cell Rep. 29(9): 977-986.

McNeil SD, Nuccio ML, Ziemak MJ, Hanson AD (2001) Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine N-methyltransferase. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 98(17): 10001-10005.

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. Plant Cell. 14(9): 2031-2043.

Nuccio ML, Ziemak MJ, Henry SA, Weretilnyk EA, Hanson AD (2000) cDNA Cloning of Phosphoethanolamine N-Methyltransferase from Spinach by Complementation in Schizosaccharomyces pombe and Characterization of the Recombinant Enzyme. J. Biol. Chem. 275(19): 14095-14101.

Rhodes D, Hanson A (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. Annu. Rev. Plant Biol. 44(1): 357-384.

www.SID.ir

Archive of SID

Sakamoto A, Valverde R, Chen TH, Murata N (2000) Transformation of Arabidopsis with the codA gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. Plant J. 22(5): 449-453.

Sakr M, El-Sarkassy NM, Fuller MP (2012). Osmoregulators proline and glycine betaine counteract salinity stress in canola. . Agron. Sustain. Dev. 32(3): 747-754.

Smith DD, Summers PS, Weretilnyk EA (2000) Phosphocholine synthesis in spinach: Characterization of phosphoethanolamine N-methyltransferase. Physiol. Plantarum. 108(3): 286-294.

Su J, Hirji R, Zhang L, He C, Selvaraj G, Wu R (2006) Evaluation of the stress-inducible production of choline oxidase in transgenic rice as a strategy for producing the stressprotectant glycinebetaine. J. Exp. Bot. 57(5): 1129-1135.

Wu S, Yu Z, Wang F, Li W, Ye C, Li J, Tang J, Ding J, Zhao J, Wang B (2007) Cloning, characterization, and transformation of the phosphoethanolamine N-methyltransferase gene (ZmPEAMT1) in maize (*Zea mays* L.). Mol. Biotechnol. 36(2): 102-112.

Ye C, Ye C, Wu S, Ye C, Wu S, Yang Q, Ye C, Wu S, Yang Q, Ma C, Yang G, Wang B (2005) Cloning, sequencing and salt induced expression of PEAMT and BADH in oilseed rape (*Brassica napus*). DNA Seq. 16(5): 364-371.

Zeisel SH (2006) Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. Ann. Rev. Nutr. 26: 229-250.

Zhang H, Murzello C, Sun Y, Kim MS, Xie X, Jeter RM, Zak JC, Dowd SE, Paré PW (2010) Choline and osmotic-stress tolerance induced in Arabidopsis by the soil microbe Bacillus subtilis (GB03). Mol. Plant Microbe. Interact. 23(8): 1097-1104.

Zhang J (2003) Evolution by gene duplication: an update. Trends Ecol. Evol. 18(6): 292-298.

Zhang J, Tan W, Yang XH, Zhang HX (2008) Plastidexpressed choline monooxygenase gene improved salt and drought tolerance through accumulation of glycine betaine in tobacco. Plant Cell Rep. 27(6): 1113-1124.

Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006) Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. Nat. Protoc. 1(2): 641-646.

Zhou S, Chen X, Zhang X, Li Y (2008) Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene BADH and a vacuolar Na+/H+ antiporter gene SeNHX1. Biotechnol. Lett. 3(2) 369- 376.

www.SID.ir