Archive of SID

اثر تنش خشکی بر بیان ژنهای کدکننده آنزیم اس-آدنوزیل-ال‌متیونین: فسفواتانول‌آمین‌ان-متیل‌ترانسفراز (PEAMT) در آرابیدوپسیس

زهرا زنگیشه‌ای و هومن سالاری*

کرمانشاه، دانشگاه رازی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۶

چکیده

در این مطالعه با استفاده از روش آنالیز نسبی بیان ژنها به‌کمک تکنیک Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) تأثیر دو سطح تنش خشکی ۱۲ و ۱۶ روزه بر بیان خانواده ژنی رمزکننده آنزیم اس-آدنوزیل-ال‌متیونین: فسفواتانول‌آمین‌ان-متیل‌ترانسفراز (PEAMT) در سه اندام آرابیدوپسیس؛ شامل برگهای درحال توسعه، برگهای توسعه یافته و ریشه؛ ارزیابی شد. این آنزیم نقش کلیدی در بیوسنتز فسفوکولین دارد. تاکنون یک ژن به طور قطع (*AtNMT1*) و دو ژن به صورت احتمالی (*AtNMT2* و *AtNMT3*) به عنوان رمزکننده آنزیمهای خانواده PEAMT در آرابیدوپسیس معرفی شده‌اند. رفتار این سه ژن در مواجهه با تنش خشکی متفاوت بود. درحالی که بیان ژن *AtNMT2* چندان متأثر از تنش و نوع اندام نبود، بیان دو ژن *AtNMT1* و *AtNMT3* بسیار به این عوامل وابسته بودند. بیان *AtNMT1* در پاسخ به ۱۲ روز قطع آبیاری در برگهای درحال توسعه و توسعه یافته کاهشی تقریباً ۰/۸ برابری داشت، اما بیان آن در ریشه تا حدود ۴/۵ برابر شاهد افزایش یافت. پس از ۱۶ روز قطع آبیاری بیان این ژن در برگهای در حال توسعه تقریباً ۲/۵ برابر افزایش یافت و در ریشه با کاهش روبرو و به سطح شاهد بازگشت. بیان ژن *AtNMT3* در ۱۲ و ۱۶ روز قطع آبیاری، به رغم عدم تغییر و کاهش در اندامهای هوایی، به ترتیب در حدود ۳/۵ و ۹ برابر در ریشه افزایش یافت. به نظر می‌رسد *AtNMT3* احتمالاً ژن حساس به خشکی در ریشه است. به‌طور کلی، شاید بتوان گفت که دو ژن *AtNMT1* و *AtNMT3* ایزوفرمهای مؤثر رمزکننده آنزیمهایPEAMT در شرایط مواجهه با تنش خشکی در آرابیدوپسیس هستند.

واژه های کلیدی: *آرابیدوپسیس تالیانا*، تنش خشکی، اس-آدنوزیل-ال‌متیونین: فسفواتانول‌آمین‌ان-متیل‌ترانسفراز، فسفاتیدیل‌کولین، qRT-PCR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۳-۳۸۳۲۴۹۲۹، پست الکترونیکی: hsalari@yahoo.com

مقدمه

ترکیب شیمیایی فسفوکولین به خاطر پیش‌سازی فسفاتیدیل‌کولین و کولین در گیاهان و جانوران اهمیت بسیار دارد. فسفاتیدیل‌کولین فسفولیپید عمده در غشای سلولهای یوکاریوتی است (۷ و ۱۷). علاوه بر نقش مهم به عنوان جزئی از غشای سلولی، فسفاتیدیل‌کولین دارای عملکرد حیاتی در سیگنالینگ سلولی نیز می‌باشد. پژوهشها نشان داده‌اند که فسفاتیدیک‌اسید که یکی از مشتقات فسفاتیدیل‌کولین می‌باشد، یک مولکول سیگنالینگ است که به عنوان پیغامبر ثانویه در انواع فرآیندهای سلولی و پاسخ به تنشها عمل می‌کند (۳۵). کولین، ترکیب دیگری است که از فسفوکولین حاصل می‌شود. این ترکیب به جهت پیش‌سازی گلایسین‌بتائین که از متابولیتهای حیاتی در گیاهان به شمار می‌رود، اهمیت زیادی دارد. به طوری که در کنار اهمیت کولین در واکنش گیاه به تنشها، این ماده در راستای بهبود ارزش غذایی گیاهان نیز مورد توجه است. در گیاهان و برخی از یوکاریوتها کولین همچنین می‌تواند

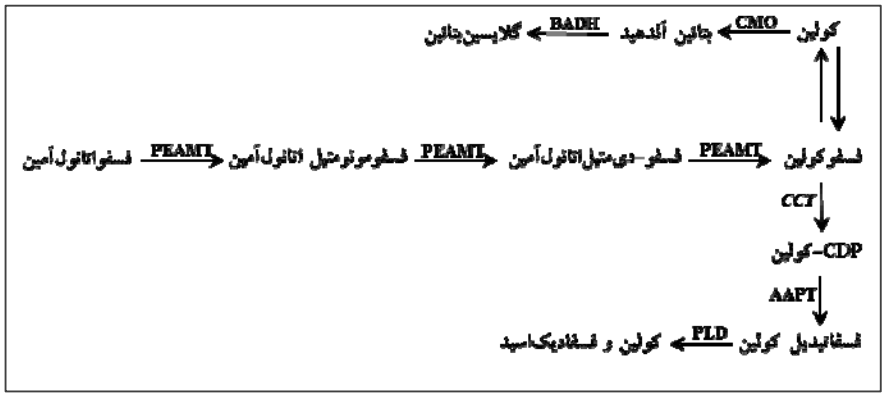
www.SID.ir

Archive of SID

به عنوان پیش‌ساز فسفاتیدیل‌کولین مورد استفاده قرار گیرد (۱۶).

بیوسنتز فسفاتیدیل‌کولین در گیاهان با سایر یوکاریوتها متفاوت به نظر می‌رسد. گزارشهایی مبنی بر وجود مسیرهای مختلف بیوسنتز فسفوکولین وجود دارد، اما شواهد مختلف نشان داده‌اند که آنزیم اس-آدنوزیل-ال‌متیونین: فسفواتانول‌آمین‌ان-متیل ترانسفراز (PEAMT) مهم‌ترین آنزیم کنترل کننده در تمامی این مسیرهاست. مک نیل و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داده اند که ان-متیلاسیون فسفواتانول‌آمین، رخداد اصلی کنترل در مسیر بیوسنتز فسفاتیدیل‌کولین می‌باشد که توسط آنزیم PEAMT تسهیل می‌گردد (۱۶). سپس دو ان-متیلاسیون متوالی رخ می‌دهد که نتیجه آن به ترتیب فسفو-دی‌متیل‌اتانول‌آمین و فسفوکولین است (شکل ۱)(۲۵). تسهیل دو متیلاسیون اخیر نیز همچون متیلاسیون نخست توسط آنزیم PEAMT انجام می‌شود (۲ و۲۰ و ۲۸). همان طور که پیشتر اشاره شد، به طور کلی می‌توان گفت که آنزیم PEAMT و فعالیت آن مهم‌ترین عامل کنترل بیوسنتز فسفاتیدیل‌کولین و سایر مشتقات این ماده آلی است (۷، ۸، ۱۶، ۱۹، ۲۰و ۳۲). بررسی فعالیتهای آنزیمی در گیاهان مختلف مسیرهای جایگزین دیگری را هم برای بیوسنتز فسفاتیدیل‌کولین پیشنهاد داده است (۱۵ و ۲۹) اما تاکنون درباره شواهد ژنتیکی که مستقیماً این مسیرها را به اثبات برساند گزارشی ارائه نشده است. پس از تولید فسفوکولین، سنتز فسفاتیدیل‌کولین از طریق CDP-کولین (مسیر کندی) و توسط دو آنزیم CCT-فسفوکولین سیتیدیل ترانسفراز (CCT) و آمینوالکل‌فسفوترانسفراز (AAPT) کاتالیز می‌شود (۱۱). علاوه بر تولید فسفاتیدیل‌کولین، کولین هم می‌تواند در ادامه این مسیر تولید شود (۱۵ و ۲۵).

در شرایط تنش، کولین توسط آنزیمهای کولین‌مونواکسیژناز (CMO) و بتائین‌آلدهیددهیدروژناز (BADH) در کلروپلاست‌ها اکسید شده و به گلایسین‌بتائین تبدیل می‌شود. گلایسین‌بتائین از محلولهای سازگاری است که به عنوان تنظیم کننده‌های اسمزی غیرسمی در سیتوپلاسم شناخته می‌شوند. این ترکیبات در بسیاری از گیاهان در پاسخ به اثرات سوء تنشهای غیرزیستی سنتز و انباشت می‌یابند (۵، ۲۴ و ۳۳).



شکل ۱- مسیر متابولیکی بیوسنتز فسفوکولین، کولین، فسفاتیدیل‌کولین و گلایسین‌بتائین در گیاهان عالی (براساس سالاری، ۲۰۰۸)

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که فسفاتیدیل‌کولین ممکن است در پاسخ گیاه به تنشهای غیرزیستی، به ویژه در گونه‌هایی که قادر به انباشت گلایسین‌بتائین نیستند، ایفای نقش کند. برای نمونه نشان داده شده که در طی سازگاری به سرما، کمیت و سهم نسبی فسفاتیدیل‌کولین نسبت به دیگر لیپیدها افزایش می‌یابد (۴، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۴). طبق بررسی صورت گرفته، غلظت فسفاتیدیل‌کولین با درجه تحمل یخ زدگی در ۱۳ رقم سرما دیده گندم همبستگی نشان داده است (۹). همچنین محتوای فسفاتیدیل‌کولین روزت آرابیدوپسیس در روز اول و چهارم بعد از

www.SID.ir

Archive of SID

قرارگرفتن گیاه در سرمای ۲ درجه سانتی گراد به ترتیب به میزان ۱۵ و ۲۶ درصد افزایش یافته است (۱۰). گزارشهایی وجود دارند که نشان می‌دهند تحمل یخزدگی با تغییر در مقدار و درجه غیراشباعیت چندگانه فسفاتیدیل‌کولین همبستگی دارد (۱۲ و ۲۷). مطالعات دیگری درباره نقش فسفاتیدیل‌کولین در تنشهای شوری و اسموتیک انجام شده است. پیکال و همکارانش (۱۹۹۹) نشان دادند که، در سلولهای کشت سوسپانسیونی آرابیدوپسیس مقدار فسفاتیدیل‌کولین پس از تیمار با ۴۰۰ میلی مولار NaCl در حدود ۳۵ برابر افزایش یافته است. این درحالی بود که، تیمار با سوربیتول (۸۰۰ میلی مولار) محتوای فسفاتیدیل‌کولین را متأثر نساخت (۲۲).

گزارشهایی درباره رفتار ژنهای کدکننده آنزیمهای خانواده PEAMT که عامل مهم و اصلی در کنترل مسیر بیوسنتز فسفوکولین و سایر مشتقات این ماده آلی است، در پاسخ به تنشهای غیرزیستی ارائه شده است. خاموش‌کردن ژنهای خانواده *AtNMT* - کدکننده آنزیمهای خانواده PEAMT - در آرابیدوپسیس به نرعقیمی حساس به دما و همچنین حساسیت شدید به نمک منتج شده است (۱۸). آنالیز بیان ژنهای خانواده فوق الذکر به روش نورترن بلاتینگ، نشان داد که شش ساعت پس‌از تیمار سرمایی بیان کاهش می‌یابد، ولی ۴۸ ساعت بعد به سطح نرمال باز می‌گردد (۳۰). براساس گزارش صورت گرفته توسط چرن و همکاران (۲۰۰۲)، تجمع رونوشتهای ژن *PEAMT* گندم پس از تیمار با آبسیزیک اسید و قرار گرفتن در معرض شوری، تنش رطوبتی و دمای پایین در سطوح بالایی صورت می‌گیرد. فعالیت ویژه آنزیم نیز ۵ برابر پس از شش روز تنش سرمایی، ۴ برابر بعد از افزودن نمک، ۳ برابر پس از تیمار با آبسیزیک اسید و حدود ۱ برابر پس از اعمال تنش آبی افزایش یافت. علاوه بر این، رابطه مثبت و معنی‌داری بین ظرفیت انطباق با سرما و تجمع رونوشتهای *PEAMT* در طیف وسیعی از ارقام مختلف گندم مشاهده شد (۴). آنالیز RT-PCR صورت گرفته توسط وو و همکاران (۲۰۰۷) هم حاکی‌از القای بیان ژن *PEAMT* ذرت در شرایط تنش شوری و عدم بیان در دمای بالا بود. بیش بیانی این ژن در آرابیدوپسیس افزایش تحمل شوری، طول ریشه و تعداد سیلیک را به‌دنبال داشت (۳۴).

براساس اطلاعات موجود در پایگاه داده ژنوم *آرابیدوپسیس تالیانا* (تارنمای TAIR) تاکنون یک ژن به طور قطع (*AtNMT1*) (At3g18000) و دو ژن به صورت احتمالی (*AtNMT2*) (At1g48600)و (*AtNMT3*) (At1g73600) آنزیمهای خانواده PEAMT را در گیاه آرابیدوپسیس کد می‌کنند. مطالعه الگوی بیان کمی این ژنها در شرایط بدون تنش نشان داد که همه اعضای این خانواده در هر دو بخش ریشه و اندام هوایی بیان می‌شوند، اما میزان بیان آنها متفاوت است (۲۶). براساس این مطالعه، *AtNMT3* ایزوفرم غالب در برگ آرابیدوپسیس گزارش شد، به طوری که بیان آن به ترتیب ۱۷ و ۲ برابر بیشتر از میزان بیان *AtNMT1* و *AtNMT2* در این اندام بود. درمقابل، *AtNMT2* ایزوفرمی بود که بیشترین بیان را در ریشه نشان داد؛ این درحالی بود که میزان بیان دو ایزوفورم *AtNMT1* و *AtNMT3* در مقادیر قابل مقایسه‌ای از برگ پایین‌تر بود.

با وجود آنکه اثرات تنشهای غیرزیستی بر عملکرد، ویژگیهای رشدی و فیزیولوژیک گیاهان به فراوانی مورد بررسی قرار گرفته است، اما تأثیر اولیه این تنشها بر رفتارهای بیوشیمیایی و مولکولی به خوبی مطالعه نشده است. لذا به نظر می‌رسد آگاهی از پاسخهای مولکولی گیاهان به تغییر محیط پیرامون و تنشهای غیرزیستی یکی از حوزه‌های مهم در پژوهشها به شمار می‌رود. این آگاهی می‌تواند منجر به به کارگیری فناورهای زیستی به منظور ایجاد ارقام متحمل به تنشها گردد. براساس اطلاعات در دسترس تاکنون از چگونگی تغییر در بروز سه ژن *AtNMT1*، *AtNMT2* و *AtNMT3* بر اثر قطع آبیاری درگیاه آرابیدوپسیس، به عنوان مهم‌ترین گیاه مدل در بررسیهای زیست شناسی و زیست فناوری، گزارشی منتشر نشده

www.SID.ir

Archive of SID

است. از سوی دیگر، هرگونه دست‌کاری ژنتیکی در ژنهای کدکننده این آنزیم در مسیر متابولیکی مربوطه پیش‌تر نیازمند پاسخ به این پرسش است که آیا بروز این ژنها متأثر از وقوع تنشها می‌باشد یا خیر؟ در مطالعه حاضر برای نخستین بار تلاش شده است تا با بهره‌گیری از روش آنالیز نسبی بیان ژنها به‌کمک تکنیک qRT-PCR، چگونگی تأثیر دو دوره قطع آبیاری بر بروز این ژنها در سه اندام گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* شامل برگهای درحال توسعه، برگهای توسعه یافته و ریشه مورد ارزیابی قرار گیرد.

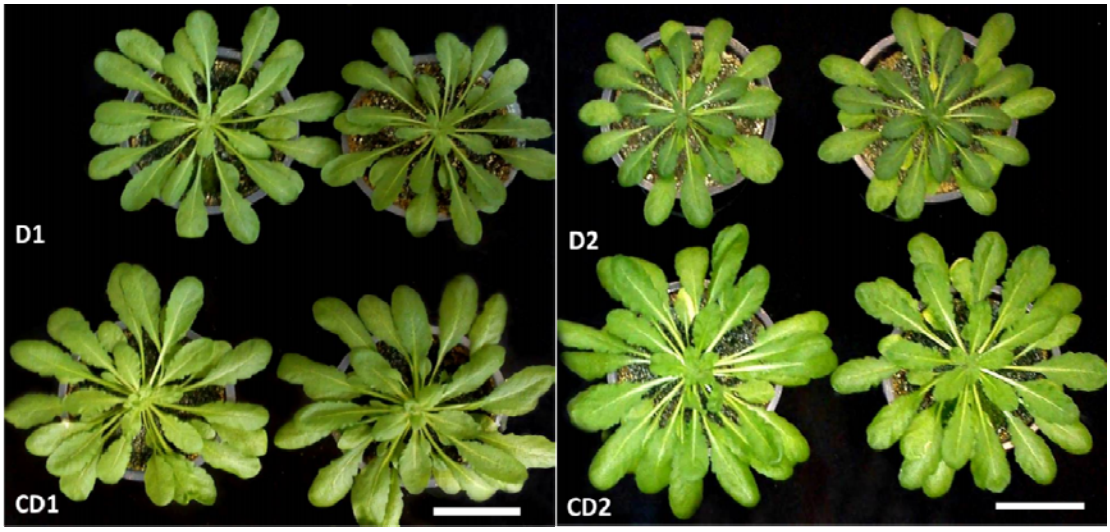
مواد و روشها

آزمایشهای این پژوهش در آزمایشگاههای تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد. اکوتیپ Col-0 گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا*، مورد استفاده قرار گرفت. بذور مربوطه از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایران تهیه شد. بذور مطابق روش پیشنهادی ویگل و همکاران (۲۰۰۲) ضد عفونی شدند (۳۱). بذور ضدعفونی شده به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی کامل و دمای ۴ درجه سانتی گراد سرمادهی و در یک نوبت کشت شدند. گلدانهایی به قطر و ارتفاع نه سانتیمتر از جنس پلی اتیلن شفاف و با گنجایش تقریبی ۱۷۰ گرم خاک مورد استفاده قرار گرفت. خاک مورد استفاده 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 و در دو نوبت (درمرحله ۴-۳ برگی) از طریق تنک‌کردن به یک گیاه در هر گلدان کاهش یافت. گلدانها در سینیهایی به ابعاد ۵۰×۲۵×۹ سانتیمتر و در اتاقک رشدی با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، 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. تنش خشکی از هفته هفتم و در دو سطح قطع کامل آبیاری به مدت ۱۲ روز (خشکی سطح ۱) و قطع کامل آبیاری به مدت ۱۶ روز (خشکی سطح ۲) اعمال شد. پس از اعمال تنش نمونه‌گیری انجام شد (شکل ۲). از تیمار شاهد متناظر با هر سطح تنش همزمان با تیمار تنش مربوطه نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع منجمد و تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سه اندام مورد مطالعه شامل برگهای درحال توسعه، برگهای توسعه یافته و ریشه، بود. هر نمونه آزمایشی متشکل از بالک (مخلوط) اندام مدنظر از دو گیاه مجزا در نظر گرفته شد.

از روش پیشنهادی بوتلا و همکاران (۱۹۹۲) برای استخراج RNA استفاده شد (۳). کیفیت RNAهای حاصل با بارگذاری در ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی 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 طراحی شد (جدول ۱). محل آغازگرها تا حد امکان نزدیک به انتهای '۳ انتخاب شدند. طراحی آغازگرها به نحوی انجام شد که حداقل یکی‌از دو آغازگر رفتی یا برگشتی در نواحی اگزون پیشین- اگزون پسین قرار گیرد تا از تکثیر غیراختصاصی ناشی‌از آلودگیهای ژنومی جلوگیری شود. بازده تکثیر آغازگرها با استفاده از منحنیهای استاندارد و نیز رگرسیون خطی منحنی تکثیر نرم‌فزار LinRegPCR (۲۳) بررسی شدند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- وضعیت نمونه‌های آرابیدوپسیس در روز نمونه‌گیری. خشکی سطح ۱(D1) و کنترل خشکی سطح ۱ (CD1). خشکی سطح ۲ (D2) و کنترل خشکی سطح ۲ (CD2). مقیاس (اندازه خط افقی) = ۴/۵cm

برای این هدف یک سری رقت ۱۰ واحدی (۲۵ نانوگرم تا ۲۵ پیکوگرم) از یکی از نمونه‌های RNA آماده شد. راندمان پرایمرها براساس رابطه $E = 10^{(-1/slope)}-1$ محاسبه شد (۲۱). این روش همچنین جهت تعیین غلظت مطلوب RNA در آنالیزهای qRT-PCR به کار رفت و غلظت ۲۵ نانوگرم به عنوان مقدار مطلوب RNA در واکنشهای بعدی تعیین شد. بیان کمی ژنها به روش qRT-PCR با استفاده از کیت تک مرحله‌ای SG OneStep qRT-PCR (EURx, Poland) و در دستگاه ترموسایکلر Rotor-GeneQ, (Corbett Research, Australia) اندازه گیری شد. براساس پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده در برنامه واکنش ابتدا یک مرحله ۳۰ دقیقه‌ای در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد جهت رونویسی معکوس درنظر گرفته شد. سپس qRT-PCR با یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه شروع و پس از آن ۴۰ سیکل شامل سه مرحله متوالی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. در پایان و به منظور دستیابی به منحنی ذوب، آغازگرها در محدوده دمایی ۹۵-۶۰ درجه سانتی گراد 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 چرخه آستانه (CT) به روش Fit Point توسط نرم‌افزار دستگاه (rotor-gene_1_7_87) و براساس منحنیهای استاندارد تولید شده، تعیین شد. در وارد کردن داده‌ها و انجام تجزیه‌های آماری، میانگین مقادیر CT حاصل از ۳ تکرار فنی برای هر نمونه به کار گرفته شد. از میانگین ژئومتریک مقادیر CT سه ژن مرجع *AtPDF2*، *AtUBC9* و *AtYLS8* برای نرمال کردن داده‌ها، استفاده شد (۶). دو روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان $2^{-\Delta\Delta CT}$ (۱۳) با کمک نرم افزار آفیس ۲۰۱۰ در محیط اکسل و روش مبتنی بر تصحیح راندمان پافل در نرم افزار REST 2009 (۲۱) جهت آنالیز داده ها مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج

نتایج بررسی به روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان $2^{-\Delta\Delta CT}$ در شکل ۳ نشان داده شده است. بررسی بیان ژن *AtNMT1* در اندامهای مورد مطالعه نشان داد که ۱۲ روز قطع آبیاری بیان این ژن را در برگهای درحال توسعه و

www.SID.ir

Archive of SID

توسعه یافته به صورت معنی‌دار و به ترتیب به میزان ۸۰ و ۹۰ درصد (۰/۲ و ۰/۱ برابر) نسبت به شرایط بدون تنش- شاهد- کاهش داده است.

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)
AtNMT1-qPCR-F01	*AtNMT1*	GCCCCAAAACTCCATCTGCT	59.4	100
AtNMT1-qPCR-R01		CCAGCGTCTTTTAGCATCTGTC	60.3	
AtNMT2-qPCR-F01	*AtNMT2*	ATCCAGACTCGCCGTTGAAG	59.4	114
AtNMT2-qPCR-R02		TCTTCCTTGTATGGTGTCGCC	59.8	
AtNMT3-qPCR-F01	*AtNMT3*	ACAGTCATCTCCGTCTCGAA	57.3	127
AtNMT3-qPCR-R01		TTTCACGCTCCTCGCCATA	56.7	
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	

برخلاف اندامهای هوایی، ۱۲ روز قطع آبیاری موجب افزایش تقریباً ۵ برابری بیان ژن *AtNMT1* در ریشه در مقایسه با شرایط بدون تنش شده است. رفتار این ژن در اندامهای مورد مطالعه پس از افزایش زمان تنش قطع آبیاری از ۱۲ روز به ۱۶ روز تغییر کرد. دوره ۱۶ روزه قطع آبیاری در برگهای درحال توسعه به افزایش حدوداً ۳ برابری بروز ژن *AtNMT1* نسبت به شاهد منجر شد که افزایش بسیار چشمگیری را در مقایسه با ۱۲ روز تنش نشان می‌دهد. اما مقایسه بروز این ژن در دوره‌های تنش ۱۲ روزه و ۱۶ روزه در برگهای توسعه یافته تفاوتی را نشان نمی‌دهد، اگر چه بروز این ژن کاهش بسیار چشمگیری را نسبت به شاهد نشان داده است. نکته قابل توجه کاهش معنی‌دار بیان این ژن در ۱۶ روز قطع آبیاری درمقایسه با ۱۲ روز قطع آبیاری و برگشت بیان به سطح شاهد در ریشه است. به نظر می‌رسد که افزایش مدت قطع آبیاری رابطه نسبی بیان این ژن بین برگهای درحال توسعه و ریشه را معکوس می‌کند (شکل ۳-الف).

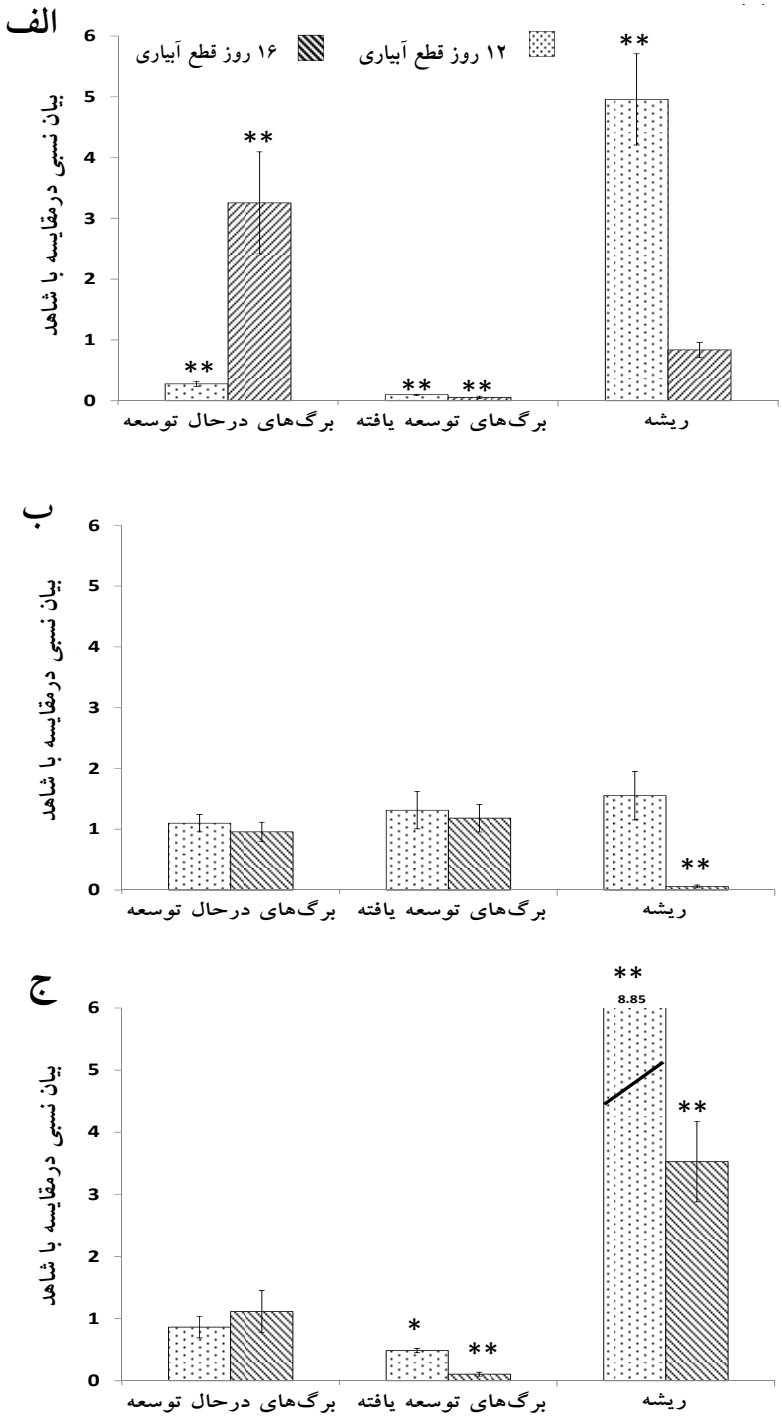
الگوی تغییر بیان ژن *AtNMT2* نشان داد که، ۱۲ روز قطع آبیاری و افزایش این زمان به ۱۶ روز نتوانسته در مقایسه با شرایط بدون تنش تغییر محسوسی را در بیان این ژن در دو اندام هوایی ایجاد کند. ۱۲ روز قطع آبیاری در ریشه همچون اندامهای هوایی موجب تغییر در بیان ژن *AtNMT2* نشد. اما افزایش مدت تنش به ۱۶ روز بیان این ژن را در ریشه در مقایسه با شرایط بدون تنش شدیداً کاهش داده و تقریباً به صفر رسانیده است. بنابراین، علی رغم اینکه بیان این ژن در اندامهای هوایی از تنش و تغییرات شدت/مدت آن متأثر نیست، در ریشه افت بیان در پاسخ به افزایش شدت/مدت خشکی چشم‌گیر است (شکل ۳-ب).

درخصوص ژن *AtNMT3* مشاهده شد که ۱۲ روز قطع آبیاری در مقایسه با شرایط بدون تنش تغییری را در بیان این ژن در برگهای توسعه یافته ایجاد نکرد. در برگهای درحال توسعه بیان ژن *AtNMT3* تا حدود ۵۰ درصد (۰/۵ برابر) در مقایسه با شاهد کاهش یافت. نکته قابل توجه آن است که رفتار این ژن در پاسخ به قطع آبیاری در ریشه کاملاً متفاوت بود. اعمال تنش ۱۲ روزه موجب افزایش نزدیک به ۹ برابری بیان ژن *AtNMT3* در ریشه در مقایسه با شرایط بدون تنش شد. افزایش مدت تنش به ۱۶ روز همچنان تغییر معنی‌داری را در بیان ژن *AtNMT3* در برگهای درحال توسعه نسبت به شاهد ایجاد نکرد، اما بیان آن را در برگهای توسعه یافته کاهش داد و تقریباً میزان بیان به صفر رسید. ۱۶ روز قطع آبیاری موجب کاهش نسبتاً

www.SID.ir

Archive of SID

چشمگیر بیان این ژن نسبت به مدت ۱۲ روز قطع آبیاری در ریشه شد، اما همچنان میزان بیان آن ۳/۵ برابر شاهد بود (شکل ۳–ج). به طور کلی، می‌توان گفت که رفتار سه ژن خانواده *AtNMT* در مواجهه با قطع آبیاری متفاوت است (شکل ۳).

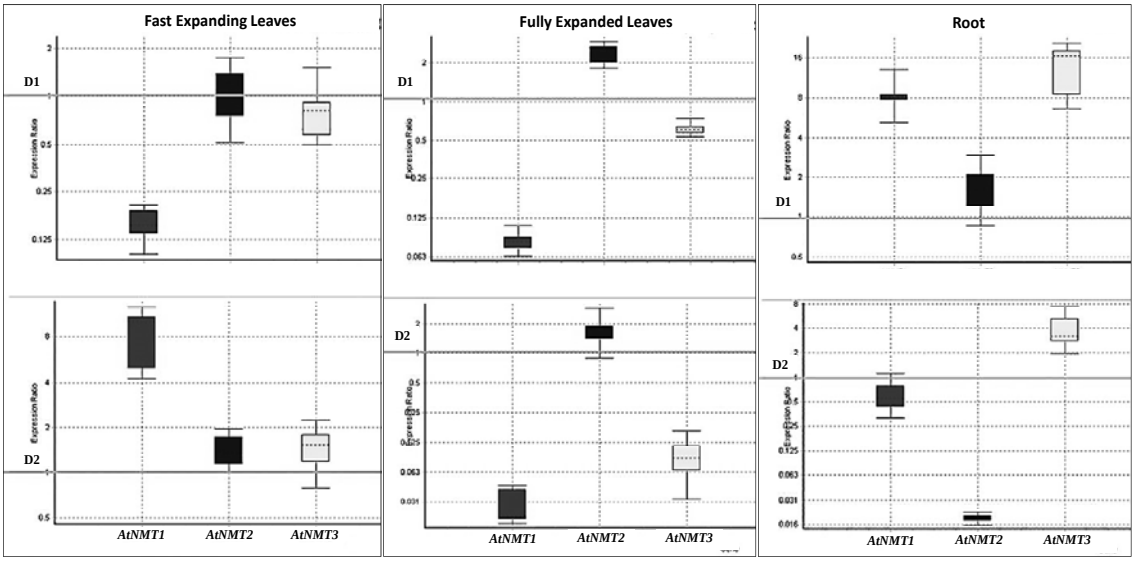


شکل ۳- الگوی تغییر بیان کمی ژنهای خانواده *AtNMT* در پاسخ به خشکی در دو بازه زمانی ۱۲ و ۱۶روزه. الف: *AtNMT1*. ب: *AtNMT2*. ج: *AtNMT3*. **= تفاوت بسیار معنی‌دار نسبت به شاهد، *= تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد.

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز داده‌ها به روش مبتنی بر تصحیح راندمان پافل نتایج حاصل از روش غیرمبتنی بر تصحیح راندمان 2^-ΔΔCT را کاملاً تأیید نمود (شکل ۴).



شکل ۴- بیان کمی سه ژن *AtNMT1*، *AtNMT2* و *AtNMT3* در برگهای درحال توسعه (Fast Expanding Leaves)، برگهای توسعه یافته (Fast Expanded Leaves) و ریشه (Root)، در دو بازه زمانی ۱۲(D1) و ۱۶(D2) روزه پس‌از قطع آبیاری، به روش مبتنی بر تصحیح راندمان پافل. باکسها نشان‌دهنده ۵۰ درصد مشاهدات، خطوط نقطه‌چین نشان‌دهنده میانه بیان ژن، و خطوط دنباله نشان‌دهنده ۲۵ درصد بیشینه و ۲۵ درصد کمینه مشاهدات هستند. بیان ژنها در کالیبراتور (شاهد) معادل ۱ درنظرگرفته می‌شود، که به‌وسیله خط مبنا مشخص شده‌است.

بحث

در این مطالعه بررسی سطوح تجمع رونوشتها، که به وسیله تعداد سیکلهای مورد نیاز جهت رسیدن به نقطه CT (ΔCT) تعیین شد، نشان داد که میزان بیان ژن *AtNMT2* در همه اندامهای مورد بررسی و در شرایط بدون تنش- شاهد- علی رغم وجود تنوع بروز در اندامهای مختلف زیاد است (شکل ۵). همان طور که پیش تر گفته شد، رخ دادن تنش و افزایش شدت/مدت آن تغییر محسوس و معنی‌داری را در بیان ژن *AtNMT2* در اندامهای هوایی ایجاد نکرد. همچنین تنش اثری در رفتار این ژن پس از ۱۲ روز قطع آبیاری در ریشه نداشت اما افزایش شدت/مدت تنش بیان این ژن را نسبت به حالت بدون تنش در این اندام شدیداً کاهش داد (شکل ۳-ب). این مشاهده با نتیجه آزمایش تاسوا و همکاران (۲۰۰۴) که اثر تنشهای غیرزنده را بر گیاهچه آرابیدوپسیس مطالعه کرده‌اند و نشان داده‌اند که ژن *AtNMT2* در پاسخ به سطوح گوناگون تنش سرما و سطوح اولیه تنشهای شوری و اسمتیک عکس‌العملی را نشان نمی‌دهد، ولی با افزایش شدت/مدت دو تنش اخیر بیانش کاهش می‌یابد، تا حدودی تطابق نشان می‌دهد (۳۰). همچنین سالاری در سال ۲۰۰۸ نشان داده است که در میان ژنهای خانواده *AtNMT* ژن *AtNMT2* ایزوفرم غالب ریشه است، بنابراین تفاوت رفتار این ژن در اندامهای هوایی و ریشه شاید مرتبط با اختصاصی بودن این ایزو فرم برای ریشه باشد (۲۶). به طور کلی ممکن است بتوان گفت بروز زیاد این ژن در شرایط غیر تنش به علت نقش مهم‌تر و احتمالی این ژن در سایر مسیرهای متابولیکی است که نیازمند مطالعه دیگری است. همچنین ممکن است عدم تغییر معنی‌دار بیان این ژن به اعمال تنش بدان دلیل باشد که با توجه به بروز نسبتاً چشمگیر این ژن در شرایط بدون تنش، پس از نسبی سازی بروز آن در شرایط تنش نسبت به شرایط بدون تنش، علی رغم تغییر قابل ملاحظه مطلق بروز، در مقام قیاس با شرایط بدون تنش ناچیز می‌نماید.

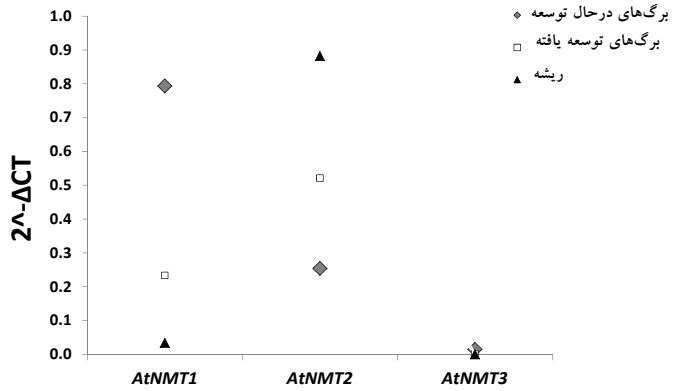
www.SID.ir

Archive of SID

بیان ژن *AtNMT3* در نمونه‌های مربوط به شرایط بدون تنش–شاهد– بسیار کم و نزدیک به صفر بود؛ به نحوی که مقادیر CT متناظر با این ژن معمولاً در محدوده سیکلهای ۲۸ تا ۳۲ قرار داشت (شکل ۳–ج). لذا امکان دخالت این ژن در سایر مسیرهای متابولیکی در شرایط بدون تنش کم به نظر می‌رسد. تغییر چشمگیر بروز نسبی این ژن در ریشه به هنگام مواجه شدن گیاه با تنش این فرضیه را که احتمالاً ژن *AtNMT3* ژن حساس به خشکی برای این مسیر متابولیکی در ریشه است را بسیار تقویت می‌کند. گفتنی است براساس مطالعه سالاری (۲۰۰۸)، *AtNMT3* ایزوفرم غالب در برگ و *AtNMT2* ایزوفرم غالب ریشه بوده است که نتایج این پژوهشگر در توافق با الگوی ارائه شده در سایت http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgibin/efpWeb.cg می‌باشد (۲۶). به نظر می‌رسد نتایج پژوهش حاضر با گزارش پیشتر گفته تفاوت دارد، اما بسیار محتمل است که الگوی بیان این ژن در شرایط تنش با شرایط بدون تنش متفاوت باشد. از سوی دیگر چون بررسی حاضر در مرحله رشدی دیگری صورت پذیرفته است، مرحله رشدی نیز می‌تواند علت تفاوت مشاهدات در نظر گرفته شود (۱۰).

با این حال هرگونه اظهارنظر درباره این تفاوت به مطالعه و آزمایشهای بیشتر نیازمند است.

توجه به مقدار بیان ژن *AtNMT1* در شرایط بدون تنش و مقایسه آن با تغییرات بروز آن در شرایط تنش خشکی این فرضیه که ژن *AtNMT1* به هنگام مواجه گیاه با تنش خشکی نقش دارد را تقویت می‌نماید (اشکال ۳–الف و ۵). با این حال تشخیص یک الگوی منسجم متأثر از شدت/مدت تنش و اندامهای مورد بررسی برای رفتار این ژن در مواجه با تنش خشکی امکان‌پذیر نیست. به طور کلی شاید بتوان گفت که ژن *AtNMT1* در سطوح اولیه تنش خشکی در ریشه تحریک شده و نقش ایفاء می‌نماید، ولی با شدت گرفتن تنش این وظیفه را در برگهای درحال توسعه دنبال می‌کند. همچنین با توجه به نتایج مطالعات پیشین محتمل است ژن *AtNMT1* با افزایش سطح تنش خشکی نقش بیشتری نسبت به سایر ژنهای این خانواده در گیاه ایفاء نماید. راستی آزمایی چنین فرضیه‌ای به بررسی موتانتها و لاینهای ترانسژنیک ژنهای خانواده *AtNMT* نیاز دارد.



شکل ۵– بیان کمی سه ژن *AtNMT1*، *AtNMT2* و *AtNMT3* در برگهای درحال توسعه، برگهای توسعه یافته و ریشه در شرایط بدون تنش (شاهد) برحسب مقادیر Δ-^2.

به طور کلی و براساس نتایج بدست آمده می‌توان گفت که ژن *AtNMT2* از تنش خشکی و تغییرات شدت/مدت آن متأثر نیست. براساس این نتایج و شواهدی همچون عدم تولید موتان بدون عملکرد برای ژن *AtNMT2* (۲۶)، به نظر می‌رسد که این ژن در مسیرهای متابولیکی احتمالاً حیاتی و متفاوت از پاسخ به تنشها دخالت داشته باشد. با پذیرش این فرضیه و کنار گذاشتن ژن *AtNMT2* به عنوان عضوی از خانواده ژنی دخیل در مسیر بیوسنتز فسفوکولین و

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده الگوی مشابه کاهش در بیان دو ژن *AtNMT1* و *AtNMT3* در پاسخ به سطوح مختلف تنش خشکی در برگهای توسعه یافته، به نظر می‌رسد که مسیر بیوسنتز فسفوکولین در این اندام از مکانیسمهای اصلی مواجه با تنش خشکی نباشد. با این حال شواهد ژنتیکی که بتواند مستقیماً این فرضیه را تأیید کند، در دست نیست. در عین حال دیده می‌شود که بیان دو ژن *AtNMT1* و *AtNMT3* در پاسخ به اولین سطح تنش خشکی در ریشه به شدت افزایش می‌یابد. همچنین می‌توان گفت دلیل رفتار متفاوت ریشه با اندامهای هوایی می‌تواند بدان جهت باشد که ریشه نخستین اندامی است که با تنش مواجه می‌شود. نتایج حاضر همچنین نشان می‌دهد که اگرچه ژن *AtNMT1* درسطوح اولیه تنش خشکی در ریشه –اولین اندام متأثر از تنش– تحریک می‌شود، اما با تشدید تنش و احتمالاً رسیدن سیگنالهای القایی ناشی از آن به بخشهای هوایی، به عنوان ایزوفرم غالب در برگهای درحال توسعه عمل می‌کند. *AtNMT3* احتمالاً ژن حساس به خشکی در ریشه است. به عبارت دیگر، به نظر می‌رسد که بیان دو ژن *AtNMT1* و *AtNMT3* در میان اندامها تاحدودی از الگوی القای مختص به بافت پیروی می‌کند. همچنین دیده شد که افزایش شدت/مدت خشکی بیان این دو ژن در ریشه را در مقایسه با ۱۲ روز خشکی کاهش داده است (اشکال ۳–الف و ج). این مشاهده براساس گزارشات پیشین درخصوص حساسیت آنزیم PEAMT به بازخورد منفی فسفوکولین توجیه پذیر است (۱۶). این مسئله همچنین می‌تواند ناشی از این باشد که با افزایش تنش گیاه از مکانیسمهای جایگزین استفاده کرده و نقش این مسیر بیوسنتزی در پاسخ به شرایط موجود در حال کم اثر شدن است. به عبارت دیگر، ممکن است که مسیر متابولیکی تولید فسفوکولین که محصول این ژنها در آن دخالت دارد، در شرایط تشدید عدم دسترسی به آب چندان فعال نبوده یا کم فعالیت گردد. همین روند در مطالعه پیش تر صورت گرفته توسط این تیم تحقیقاتی بر روی ژنهای خانواده *BADH* که در بیوسنتز گلایسین بتائین –به عنوان یکی از فرآورده‌های پایین دستی مسیر بیوسنتزی فسفوکولین– نقش دارند مشاهده شد؛ یافته‌ای که می‌تواند به فرضیه فوق قوت بیشتری ببخشد (۱). با توجه به نتایج این آزمایش و مطالعات قبلی به نظر می‌رسد که دو ژن *AtNMT1* و *AtNMT3* ایزوفرم *NMT* مفروض مؤثر در مواجهه با تنش خشکی در آرابیدوپسیس هستند. بر این اساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیمهای کدشده توسط این ژنها و محتوای درونی فرآورده‌های آنها در شرایط مشابه با شرایط این آزمایش، و همچنین ارزیابی بیان این ژنها در شرایط رفع تنش (آبیاری مجدد) ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

۱. زنگیشه‌ای ز. و سالاری ه. ۱۳۹۴. اثر تنش خشکی بر بیان ژن‌های رمزگذارآنزیم‌های خانواده بتائین‌آلدهیددهیدروژناز (BADH) در آرابیدوپسیس. ژنتیک نوین. در دست چاپ.

2. Bolognese C. P. and McGraw P. 2000. The isolation and characterization in yeast of a gene for Arabidopsis S-adenosylmethionine: phospho-ethanolamin N-methyltransferase. Plant Physiology. 124: 1800-1813.
3. Botella J., Schlagnhaufer A. and 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.
4. Charron J-B. F., Breton G., Danyluk J., Muzac I., Ibrahim R. K. and Sarhan F. 2002. Molecular and biochemical characterization of a cold-regulated phosphoethanolamine N-methyltransferase from wheat. Plant Physiology. 129: 363-373.
5. Chen THH. and Murata N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible

www.SID.ir

Archive of SID

solutes. Current Opinion in Plant Biology 5: 250–257.
6. 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.
7. Datko A. H. and Mudd S. H. 1988a. Enzymes of phosphatidylcholine synthesis in lemna, soybean, and carrot. Plant Physiology. 88: 1338-1348.
8. Datko A. H. and Mudd S. H. 1988b. Phosphatidylcholine synthesis - Differing patterns in soybean and carrot. Plant Physiology. 88: 854-861.
9. Horvath I. Vigh L. Belea A. and Farkas T. 1980. Hardiness dependent accumulation of phospholipids in leaves of wheat cultivars. Physiologia Plantarum. 49: 117-120.
10. Inatsugi R. Nakamura M. and Nishida I. 2002. Phosphatidylcholine biosynthesis at low temperature: Differential expression of CTP: Phosphorylcholine cytidylyltransferase isogenes in Arabidopsis thaliana. Plant and Cell Physiology. 43: 1342-1350.
11. Kent C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. Annual Review of Biochemistry. 64: 315-343.
12. Kinney A. J. Clarkson D. T. and Loughman B. C. 1987. Phospholipid-metabolism and plasmamembrane morphology of warm and cool rye roots. Plant Physiology and Biochemistry. 25: 774-769.
13. Livak K.J. Schmittgen T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^−ΔΔCT Method. Methods. 25: 402–408.
14. Lynch D. V. and Steponkus P. L. 1987. Plasma-membrane lipid alterations associated with [1] coldacclimation of winter rye seedlings (secale-cereale L-Cv puma). Plant Physiology. 83: 761-767.
15. McNeil S. D. Nuccio M. L. Rhodes D. Shachar-Hill Y. and Hanson A. D. 2000. Radiotracer and computer modeling evidence that phospho-base methylation is the main route of choline synthesis in tobacco. Plant Physiology. 123: 371-80.
16. McNeil S. D. Nuccio M. L. Ziemak M. J. and Hanson A. D. 2001. Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine Nmethyltransferase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98: 10001-10005.
17. Moreau P. Bessoule J. J. Mongrand S. Testet E. Vincent P. and Cassagne C. 1998. Lipid trafficking in plant cells. Progress in Lipid Research. 37: 371-391.
18. Mou Z. L. Wang X. Q. Fu Z. M. Dai Y. Han C. Ouyang J. Bao F. Hu Y. X. and Li J. Y. 2002. Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in Arabidopsis. Plant Cell. 14: 2031-2043.
19. Nuccio M. L. Russell B. L. Nolte K. D. Rathinasabapathi B. Gage D. A. and Hanson A. D. 1998. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. The Plant Journal. 16: 487-496.
20. Nuccio M. L. Ziemak M. J. Henry S. A. Weretilnyk E. A. and Hanson A. D. 2000. cDNA Cloning of phosphoethanolamine N-methyltransferase from spinach by complementation in pombe and characterization of the recombinant enzyme. Journal of Biological Chemistry. 275: 14095-14101.
21. Pfaffl M.W. Horgan G.W. 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.
22. Pical C. Westergren T. Dove S. K. Larsson C. and Sommarin M. 1999. Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in Arabidopsis thaliana cells. Journal of Biological Chemistry. 274: 38232-38240.
23. Ramakers C. Ruijter J.M. Deprez R.H. Moorman A.F. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience Letters. 339: 62–66.
24. Rhodes D. and Hanson A. D. 1993. Quarternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 44: 357-84.
25. Rontein D. Nishida I. Tashiro G. Yoshioka K. Wu W. I. Voelker D. R. Basset G. and Hanson A. D. 2001. Plants synthesize ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme. Journal of Biological Chemistry. 276: 35523-35529.
26. Salari, H. 2008. Characterization of NMT gene family in Arabidopsis. The Australian National University. PhD Thesis.
27. Sikorska E. and Kacperskapalacz A. 1980. Frost-induced phospholipid changes in cold-

www.SID.ir

Archive of SID

acclimated and non-acclimated rape leaves. Physiologia Plantarum. 48: 201-206.
28. Smith D. D. Summers P. S. and Weretilnyk E. A. 2000. Phosphocholine synthesis in spinach: Characterization of phosphoethanolamine N-methyltransferase. Physiologia Plantarum. 108: 286-294.
29. Summers P. S. and Weretilnyk E. A. 1993. Choline synthesis in spinach in relation to salt stress. Plant Physiology. 103: 1269-1276.
30. Tasseva G. Richard L. Zachowski A. 2004. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in Arabidopsis thaliana. FEBS Letters. 566: 115–120.
31. Weigel D. and Glazebrook J. 2002. Arabidopsis, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
32. Weretilnyk E. A. Smith D. D. Wilch G. A. and Summers P. S. 1995. Enzymes of choline synthesis in spinach - response of phospho-base N-methyltransferase activities to light and salinity. Plant Physiology. 109: 1085-1091.
33. Weretilnyk E.A. Bednarek S. McCue K.F. Rhodes D. Hanson AD. 1989. Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons. Planta. 178: 342–352.
34. 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 Nmethyltransferase gene (*ZmPEAMT1*) in maize (Zea mays L). Molecular Biotechnology. 36: 102–112.
35. Xue H. Chen X. and Li G. 2007. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. Current Opinion in Plant Biology. 10: 483-489.

Monitoring the Expression Pattern of Genes encoding S-adenosyl-L-methionine:phosphoethanolamine N-methyltransferase (PEAMT) enzyme in Arabidopsis under Drought Stress

Zangishei Z.and Salari H.

University College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

In this study we use relative expression analysis *via* quantitative Real-Time PCR to evaluate the effects of drought on the expression pattern of genes coding for the enzyme S-adenosyl-L-methionine: phosphoethanolamine N-methyltransferase (PEAMT) in *Arabidopsis thaliana,* Tissues including fast-expanding leaves, fully expanded leaves, and roots have been considered. PEAMT plays a key role in the biosynthesis of phosphocholine. According to the *Arabidopsis thaliana* genome database (TAIR) there is one known gene At3g18000 (*AtNMT1*) and two putative genes At1g48600 (*AtNMT2*) and At1g73600 (*AtNMT3*) coding for the PEAMT enzyme. The tissue mRNA induction level of *AtNMT1and AtNMT3* genes varied in response to drought levels, while *AtNMT2* gene expression was affected negligibly by these factors. While withholding water for 12 days reduced the expression level of *AtNMT1* in fast expanding and fully expanded leaves by about 0.8 folds, the expression level of the gene increased in roots by about 4.5 folds. In contrast, after 16 days without watering, the expression level of *AtNMT1* rose about 2.5 folds and reduced to the level of control in fast expanding leaves and roots, respectively. The expression pattern of *AtNMT3* suggests that *AtNMT3* may be a drought responsive gene in roots. *AtNMT3* expression in roots increased about 3.5 and 9 folds in response to 12 and 16 days of water deficit, respectively, despite the lack of changes and/or reduction in leaves. We conclude that the genes *AtNMT1* and *AtNMT3* may influence the response to drought stress in *Arabidopsis*.

Key words*: Arabidopsis thaliana*, drought stress, S-adenosyl-L-methionine: phosphoethanolamine N-methyltransferase, phosphatidylcholine, qRT-PCR

www.SID.ir