

کاهش میزان توکوفرول کل از طریق خاموشی ژن HPT در آرابیدوپسیس تالیانا با استفاده از تکنیک RNAi

علیرضا عباسی^۱، ناهید رعنائیان^۲، فریبا ابویی^۳، اوو سونوالد^۴ و لارس فول^۵

۱، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۲، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۳، دانشجوی دکتری مهندسی ژنتیک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۴، استاد، دانشگاه ارلانگن نورنبرگ آلمان، ۵، استادیار، دانشگاه ارلانگن نورنبرگ آلمان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۶/۴)

Reduced Tocopherol Content in *Arabidopsis thaliana* by HPT:RNAi

A. R. ABBASI¹, N. RAANAAN², F. ABOEI³, U. SONNEWALD⁴ AND L. M. VOLL⁵

1, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, Iran; 2, M.Sc. student of Agricultural Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, Iran; 3, Ph. D. of Genetic Engineering, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, Iran; 4, 5, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Biochemie, 91058, Erlangen, Germany
(Received: March 14, 2013 - Accepted: August 25, 2013)

Abstract

Under stress conditions Reactive Oxygen Species (ROS) are produced and accumulate in plant leaves as a result of the oxidation of important cellular components like proteins, chlorophylls and lipids. Vitamin E is the collective term for tocopherols. This lipid-soluble substance accompanied by carotenoids, glutathione and other antioxidants and has an important role in keeping the integrity of photosynthetic membranes. Tocopherols and tocotrienols are amphipathic molecules and are able to detoxify ROS and lipid peroxyl radicals in lipophilic environments. Homogentisate phytyl transferase (HPT) is the key enzyme in the vitamin E biosynthesis pathway. To silence HPT and investigate its role in tocopherol production RNAi technique was used and the results obtained revealed that tocopherol content was decreased in derived lines.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Homogentisate phytyltransferase, Tocopherols, Vitamin E, RNA interference

چکیده

در شرایط تنش، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که از اکسیژن مولکولی مشتق می‌شوند، در برگ‌ها تجمع می‌یابند و سبب اکسیداسیون ترکیبات مهم سلولی از جمله پروتئین‌ها، کلروفیل و لیپیدها می‌شوند. به‌طور کلی توکوفرول‌ها^۱ تحت عنوان ویتامین E مطرح هستند. ویتامین E از ترکیبات محلول در چربی است و در ترکیب با کاروتنوئیدها، آسکوربات، گلوکاتیون و آنتی‌اکسیدان‌های دیگر در نگهداری یکپارچگی غشاهای فتوسنتزی در شرایط تنش نقش مهمی دارد. توکوفرول‌ها و توکوترینول‌ها^۲ مولکول‌های آمفی‌پاتیکی^۳ هستند که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قادر به حذف گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های لیپید پروکسیل در محیط‌های چربی دوست هستند. هموجنتیسات فیتیل ترانسفراز (HPT)^۴ از آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ویتامین E است. در این تحقیق برای بررسی نقش آنزیم HPT در تولید متابولیت توکوفرول، خاموشی این ژن با استفاده از تکنیک RNAi مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان آرابیدوپسیس به‌روش غوطه‌وری گل آذین تراخیخت شدند و گیاهان حاصل با آنتی‌بیوتیک کانامایسین مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند و سپس میزان توکوفرول آن‌ها بررسی شد. در محیط حاوی کانامایسین حدود ۷۰ گیاه به‌دست آمد. ارزیابی میزان توکوفرول در لاین‌های به‌دست آمده نشان داد که میزان توکوفرول در حدود ۲۸ لاین نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار داشته است و در بقیه تفاوت معنی‌داری ملاحظه نشد که در این بین لاین‌های ۴۳، ۶۸، ۶۷، ۷۰ و ۵۸ به‌ترتیب بیشترین کاهش را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: آرابیدوپسیس تالیانا، هموجنتیسات فیتیل ترانسفراز (HPT)، توکوفرول، ویتامین E، تداخل RNA

- | | |
|----------------|--|
| 1. Tocopherols | 2. Tocotrienols |
| 3. Amphipathic | 4. Homogentisate Phytyltransferase (HPT) |

حلقه کرومانول^۲ تمایز داده می‌شوند (Young Sam Seo *et al.*, 2011). در بیشتر گیاهان عالی، آلفا و گاماتوکوفرول فرم غالب هستند (Grusak and DellaPenna. 1999; Young Sam Seo *et al.*, 2011). آلفا-توکوفرول‌ها در برگ‌های گیاهان و گاما-توکوفرول بیشتر در بذور بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند (Grusak and DellaPenna. 1999). در اغلب بذور تک‌لپه‌ای ساختارهای مشابه توکوترینول به‌عنوان فرم اصلی ویتامین E ساخته می‌شود (Young Sam Seo *et al.*, 2011). توکووفرول‌ها شامل یک حلقه کرومانول قطبی و یک زنجیره ۱۵ کربنی پرنیل چربی‌دوست مشتق از هموجنتیسیک‌اسید و فیتیل‌دی‌فسفات هستند (Grusak and DellaPenna. 1999). چون توکووفرول‌ها و توکوترینول‌ها مولکول‌های آمفی‌پاتیک شامل یک حلقه قطبی کرومانول و یک دم چربی‌دوست ایزوپرنیلی هستند، این مولکول‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مهمی مطرح هستند که قادر به حذف گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های لیپید پیروکسیل در محیط‌های چربی‌دوست هستند (Young Sam Seo *et al.*, 2011; Collakova and DellaPenna. 2003a). گیاهان در پاسخ به دامنه‌ای از تنش‌ها از جمله نور شدید، دمای پائین، خشکی و تنش شوری، سطوح توکووفرول خود را تغییر می‌دهند. به‌علاوه در جریان پیری برگ، فرآیندی همراه با تخریب کلروفیل و خسارت اکسیداتیو در غشاهای فتوسنتزی و افزایش تجمع توکووفرول وجود دارد. این بررسی‌ها نشان داده‌اند که سنتز توکووفرول‌ها در جریان رشد و نمو گیاه کنترل می‌شود (Grusak and DellaPenna. 1999). به‌دلیل اهمیت توکووفرول در فیزیولوژی گیاهان و سلامت بشر، مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها در گیاهان عالی و سیانوباکتری‌ها بسیار بررسی شده است و آنزیم‌های این مسیر شناخته شده‌اند (Young Sam Seo *et al.*, 2011). برای دست‌ورزی موفق محتوای توکووفرول و یا ترکیب متفاوت آن در بافت‌های گیاهی، باید آنزیم‌هایی با ضریب تغییرات بالا در مسیر شناخته شود. این موضوع مستلزم کلون کردن آنزیم‌های بیوسنتزی اختصاصی توکووفرول و فهم دقیق و جزئی از تنظیم بیوشیمیایی و مولکولی مراحل اختصاصی مسیر است. در سال‌های اخیر کلون کردن و تشدید بیان ژن‌های متعدد کدکننده آنزیم‌هایی که مستقیم یا غیرمستقیم در بیوسنتز توکووفرول نقش دارند در گیاهان انجام شد تا مشخص شود که آیا در بافت‌های مختلف محدودکننده سنتز توکووفرول هستند

مقدمه

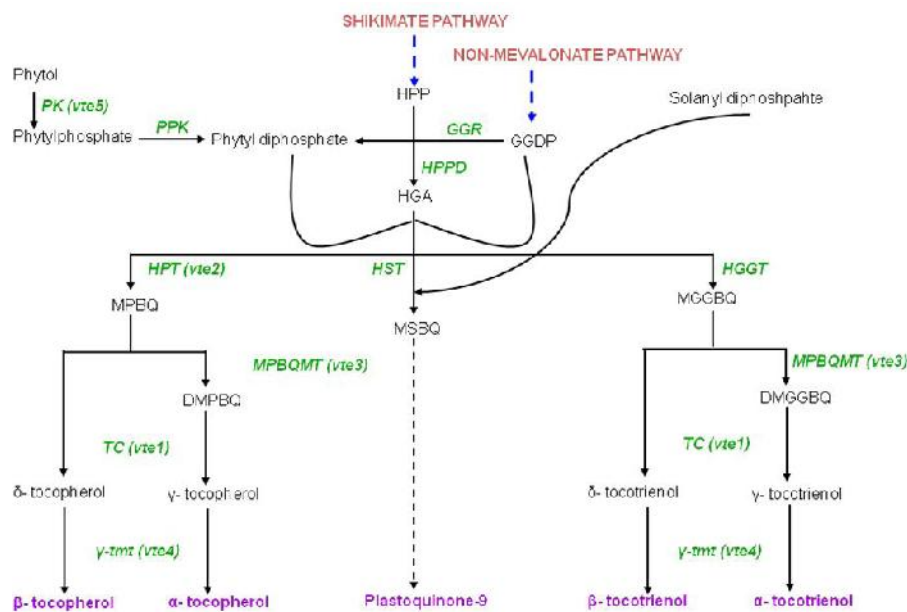
در شرایط طبیعی گیاهان در معرض دامنه متنوعی از تنش‌های زنده و غیرزنده شامل پاتوژن‌ها، دماهای غیرقابل تحمل، خشکی، شوری و نور شدید قرار دارند. در شرایط تنش، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) حاصل از اکسیژن مولکولی، در برگ‌ها تجمع یافته و به اکسیداسیون ترکیبات مهم سلولی از جمله پروتئین‌ها، کلروفیل و لیپیدها منجر می‌شوند. اکسیژن منفرد، هیدروژن پراکسید، آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسی رایج‌ترین گونه‌های فعال اکسیژن هستند (Alscher *et al.*, 2002; Dat *et al.*, 2000). برای مقابله با تنش اکسیداتیو، دو مکانیسم عمومی محافظتی در گیاه وجود دارد که شامل دفع مسمومیت از طریق آنزیم از جمله آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و مسیر غیرآنزیمی شامل آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و محلول در چربی است (Alscher *et al.*, 2002; Dat *et al.*, 2000). گلوکوتایون و آسکوربات ترکیبات محلول در آب هستند که با فراوانی پائین‌تر دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان عالی هستند (Noctor *et al.*, 1998). ویتامین E که از ترکیبات محلول در چربی است در ترکیب با کاروتنوئیدها، آسکوربات، گلوکوتایون و آنتی‌اکسیدان‌های دیگر در نگهداری یکپارچگی غشاهای فتوسنتزی در شرایط تنش نقش مهمی ایفا می‌کند (Munne-Bosch *et al.*, 2002). در شرایط تنش مقادیر متفاوتی از آنتی‌اکسیدان‌ها به‌شدت افزایش یافته و منجر به افزایش ظرفیت پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Noctor *et al.*, 1998; Collakova and DellaPenna. 2003b). از توکوکرمانول‌های^۱ وابسته، از جمله توکووفرول‌ها و توکوترینول‌ها از نظر ساختمانی تحت عنوان ویتامین E مطرح هستند (Schneider. 2005; Grusak and DellaPenna. 1999). سنتز این گروه از ویتامین‌ها به موجودات فتوسنتزکننده شامل گیاهان، جلبک‌ها و بعضی از سیانوباکتری‌ها محدود است و در پلاستید یا در غشای تیلاکوئیدها مکان‌یابی شده‌اند (Grusak and DellaPenna. 1999). توکووفرول‌ها به چهار دسته آلفا، بتا، گاما و دلتا توکووفرول تقسیم شده (Grusak and DellaPenna. 1999; Young Sam Seo *et al.*, 2011) و از طریق تعداد و محل گروه‌های متیل موجود در

می‌یابد. بتا و گاما توکوفرول در اغلب گیاهان خیلی فراوان نیستند، بنابراین آلفا توکوفرول همراه با آنتی اکسیدان‌های هیدروفیل گلوکاتایون و آسکورات، به‌عنوان سم‌زدای گونه‌های فعال اکسیژن پیشنهاد شده است (Foyer and Noctor, 2003). طبق نظر Foyer and Noctor (2005)، تعادل آنتی‌اکسیدان‌ها و گونه‌های فعال اکسیژن در نهایت تعیین‌کننده این است که سلول‌ها با سازگاری و سخت‌شدن یا با مرگ برنامه‌ریزی‌شده به تنش آب پاسخ می‌دهند. در مجموع آلفا توکوفرول در اندام‌های رویشی توتون تجمع می‌یابد درحالی‌که بافت‌های زایشی به‌خصوص وقتی که آبیگری شده‌اند مانند پرچم و بذور، غنی از گاما توکوفرول هستند.

یا خیر. اولین مرحله‌ای که به بیوسنتز توکوفرول و توکوترینول منجر می‌شود پرنیلاسیون هموجنتیسات اسید به‌وسیله فیتیل دی‌فسفات یا جرانیل جرانیل دی‌فسفات^۱ است که به‌ترتیب به ۲-متیل ۶-فیتیل بنزوکوئینون^۲ یا متیل جرانیل جرانیل بنزوکوئینون^۳ منتهی می‌شود. این واکنش‌ها با هموجنتیسات فیتیل ترانسفراز (HPT) و هموجنتیسات جرانیل جرانیل ترانسفراز کاتالیز می‌شوند (Abbasi *et al.*, 2007).

در گیاهان، ترکیب توکوفرول بین گونه‌های مختلف و بافت‌های مختلف یک گونه با هم تفاوت دارد (Grusak and DellaPenna, 1999). معمولاً بذور غنی از گاما توکوفرول هستند، درحالی‌که در برگ‌ها آلفا توکوفرول تجمع

1. Geranylgeranyl diphosphate
2. 2-methyl-6-phytyl benzoquinone
3. Methyl geranylgeranyl benzoquinone



شکل ۱- مسیر شیکیمات و بیوسنتز توکوفرول

(Collakova and DellaPenna, 2001; Savidge *et al.*, 2002). با تأثیر آنزیم توکوفرول سیکلاز (TC) این ماده به گاما توکوفرول تبدیل شده (Porfirova *et al.*, 2002; Sattler *et al.*, 2003) و در نهایت با دخالت آنزیم گاما توکوفرول متیل ترانسفراز (TMT-) آلفا توکوفرول ساخته می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم HPPD یا HPT در گیاهان ترانس ژنیک به افزایش محتوای توکوفرول در بذور و برگ‌های آراییدوپسیس منجر شد، همچنین فعالیت HPPD و HPT تحت تنش روشنایی القا می‌شود (Collakova and DellaPenna, 2003b) و افزایش فعالیت HPPD یا

p-هیدروکسی فیتیل پیروات از طریق مسیر شیکیمات در بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک سنتز شده و سپس از طریق آنزیم p-هیدروکسی فیتیل پیروات داکسیژناز (HPPD) به هموجنتیسات تبدیل می‌شود (شکل ۱) (Norris *et al.*, 1998). ترکیب اخیر با اضافه‌شدن فیتیل دی‌فسفات و پیوستگی زنجیره جانبی آب‌گریز توسط آنزیم هموجنتیسات فیتیل ترانسفراز به ۲-متیل ۶-فیتیل بنزوکوئینون تبدیل می‌شود (Cheng *et al.*, 2003; Van Eenennaam *et al.*, 2003). سپس در اثر متیلاسیون بعدی این ترکیب ۲ و ۳ دی‌متیل ۵-فیتیل ۱-۴-بنزوکوئینون تشکیل می‌شود

GGATCCTACAGGTTTTCTAGGCCTCAT
ACAGT-3'

و پرایمر اختصاصی برگشتی

5'-

GTCGACGGTATATCCTTAAACAATGC
AATAACGACA-3'

که در ابتدای خود به ترتیب دارای سایت برشی *Bam*HI و *Sal*I بودند در دمای ذوب ۶۵ درجه ساخته شد.

ساخت سازه pBin:HPT:RNAi و انتقال به اگروباکتریوم

قطعه PCR تکثیرشده در ناقل پی سی آر ۲.۰ که دارای انتهای صاف می‌باشد ساب کلون و به باکتری *Escherichia coli* سویه DH5 منتقل شد. از کلونی‌های مثبت حاوی این ناقل، استخراج پلاسمید صورت گرفت و با آنزیم‌های برشی موجود در دو سر پرایمرها هضم شد. قطعه حاصل به صورت سنس در ناقل pUC18 وارد و ناقل به باکتری *E. coli* سویه DH5 منتقل شد. سپس در مرحله بعد ناقل با آنزیم‌های برشی *Xho*I و *Bg*III هضم و قطعه تکثیرشده اولیه به صورت آنتی سنس وارد ناقل شد. سازه حاصل (pUC18:RNAi) که حاوی قطعه سنس و اینترون و آنتی سنس است توسط آنزیم *Pst*I هضم و بین پروموتور ۳۵S و وروس موزایک گل کلم (CaMV35S promoter) و ترمیناتور OCS وارد شد (شکل ۴). *Agrobacterium tumefaciens* حاوی سازه خاموشی ژن موردنظر در محیط مایع و تحت دمای ۲۸ درجه به صورت شبانه کشت داده شد تا به OD حدود ۰/۸ برسد. محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در محلول ۵ درصد ساکارز حل و به OD حدود ۰/۸ رسید.

انتقال ژن به آراییدوپسیس

بذور جوانه زده آراییدوپسیس که به گلخانه منتقل شده بودند به مدت ۳ هفته در شرایط رشد رویشی قرار گرفتند. بعد از سه هفته گیاهانی با رشد رویشی مناسب، در شرایط رشد زایشی قرار گرفتند تا گلدهی یکنواخت در گیاهان ایجاد شود. قبل از باز شدن گل‌ها، تلقیح گیاهان با اگروباکتری حاوی سازه خاموشی ژن انجام شد، به این ترتیب که به مدت ۲۰ ثانیه کل اندام‌هوایی گیاهان آراییدوپسیس در داخل محلول باکتری قرار داده شد (شکل ۲). پس از آن جهت حفظ رطوبت، پوششی روی گیاهان تلقیح شده قرار گرفت و به مدت ۲ روز در تاریکی قرار گرفتند. بعد از ۲ روز پوشش روی گیاهان برداشته شد و گیاهان در شرایط نرمال رشد قرار گرفتند تا بذردهی کامل گردد. بذور رسیده جمع‌آوری و جهت انتخاب گیاهان تراریخت

HPT در گیاهان ترانس ژنیک به افزایش محتوای توکوفرول در بذور آراییدوپسیس می‌انجامد (Tsegaye *et al.*, 2002; Collakova and DellaPenna, 2003a). در مجموع از این بررسی‌ها مشخص شد که تغییرات توکوفرول به طور برجسته‌ای از طریق HPPD و HPT کنترل می‌شود در حالی که مراحل بعدی پایین دست در مسیر بیوسنتز توکوفرول محدودکننده نیستند (Collakova and DellaPenna, 2003a). در این تحقیق به منظور بررسی نقش آنزیم HPT در تولید متابولیت توکوفرول، خاموشی این ژن با استفاده از تکنیک RNAi مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

بذور گیاهان آراییدوپسیس تالیانا وارسته کلمبیا-۲ در گلدان کاشته شد و جهت شکستن خواب‌بذر به مدت ۲ روز در تاریکی و سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. یک هفته بعد از جوانه‌زنی، گیاهچه‌های یکسان به گلدان‌های جداگانه منتقل شدند و به منظور رشد رویشی در مدت ۳ هفته در اتاقک‌های رشد با شرایط کنترل شده تحت شرایط ۸ ساعت نور و ۱۶ ساعت تاریکی قرار گرفتند. جهت تغییر از فاز رویشی به زایشی، رژیم نوری به ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی تغییر یافت.

محیط کشت گیاه

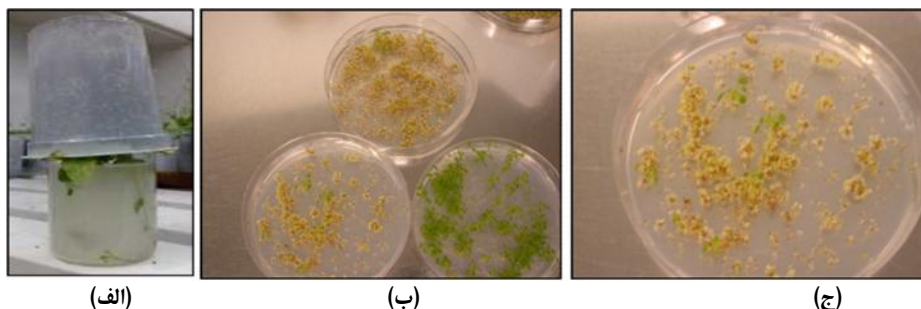
برای کشت بافت گیاه جهت جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه‌های آراییدوپسیس تالیانا از محیط MS نیم برابر با افزودن ویتامین‌ها و ۲ درصد ساکارز و ۰/۷۵ درصد آگار استفاده شد و pH آن روی ۵/۸ تنظیم شد. جهت تهیه محیط انتخابی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین به محیط کشت مذکور اضافه شد.

استخراج RNA

برگ‌های آراییدوپسیس با ازت مایع فریز و سپس پودر شدند. پودر حاصله در بافر استخراج RNA (Abbasi *et al.*, 2007) هموژن و سپس با فنل/کلروفرم/ایزوامیل‌الکل استخراج شد. RNA موجود در محلول حاصل با ۲ حجم اتانول رسوب داده شد. رسوب حاصل در آب تیمار شده با DEPC حل و در ۸۰- درجه نگهداری شد. برای حذف آلودگی DNA ژنومی تیمار با DNaseI انجام شد. رشته اول cDNA طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز با استفاده از پرایمر الیگو دی تی ۳۰ نوکلئوتیدی و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس ساخته شد. رشته دوم با استفاده از پرایمر اختصاصی پیشرو

5'-

از آن‌ها استفاده شد.



(الف)

(ب)

(ج)

شکل ۲- الف) اجرای روش غوطه‌وری گل‌آذین و به‌دست‌آوردن گیاهان تراریخت
ب و ج) انتخاب اولیه گیاهان تراریخت با استفاده از محیط کانامایسین

تکثیر قطعه‌ای از ژن *HPT*

پرایمر پیشرو از جفت باز شماره ۳۰۱ ژن *HPT* به گونه‌ای انتخاب شد که دارای توالی آنزیم برشی *Bam*HI باشد

(5'-
GGATCCTACAGGTTTTCTAGGCCTCAT
ACAGT-3')

و پرایمر برگشتی از جفت باز شماره ۸۷۵ ژن *HPT* نیز به‌نحوی انتخاب شد که دارای توالی آنزیم برشی *Sal*I باشد

(5'-
GTTCGACGGTATATCCTTAAACAATGC
AATAACGACA-3').

پس از استخراج RNA و ساخت cDNA از آراییدوپسیس، این دو پرایمر جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن *HPT* مورد استفاده قرار گرفتند. همان‌گونه که در شکل ۳- الف نشان داده شده است واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از این دو پرایمر منجر به تکثیر یک قطعه ۵۷۵ جفت بازی می‌شود و تقریباً از وسط ژن موردنظر تکثیر شده است. ژن *HPT* در آراییدوپسیس دارای ۱۱۸۴ جفت باز است اما از آنجا که برای خاموشی از تکنیک RNAi استفاده می‌شود نیازی به تکثیر کل قطعه نیست، بنابراین از وسط ژن مذکور تکثیر صورت می‌گیرد تا بتواند RNA به‌صورت دو رشته درآید و همچنین با کوچک‌تر بودن این قطعه انتقال ژن هم آسان‌تر صورت گیرد.

ساخت سازه *pBin:HPT:RNAi*

قطعه تکثیرشده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، به ناقل حدواسط PCR ۲-۱ منتقل و سپس به باکتری انتقال داده شد. استخراج پلاسمید از کلون‌های منتخب انجام و هضم آنزیمی انجام شد. انتظار بر این بود که هضم آنزیمی *Bam*HI/*Sal*I قطعات ۵۷۵ جفت بازی را نشان دهد. همان‌طور که در شکل ۳- د نشان داده شده است یک قطعه ۵۷۵ جفت بازی در ردیف‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۹، ۱۰ و

انتخاب گیاهان تراریخت در محیط کشت

بذور گیاهان تراریخت و شاهد آراییدوپسیس با استفاده از محلول ۱۰ درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شد. جهت حذف هیپوکلریت سدیم بذور ضدعفونی‌شده سه مرتبه با آب دوبار تقطیر استریل شستشو و سپس بذور در فضای زیر هود خشک شدند. بذور ضدعفونی‌شده در محیط $\frac{1}{2}$ MS به همراه ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت شدند. دو هفته بعد از جوانه‌زنی بذور گیاهچه‌های شاهد از تراریخت قابل تفکیک بودند.

استخراج توکوفرول

استخراج توکوفرول به روش *Abbasi et al.* (2007) انجام شد که به‌طور خلاصه به این صورت است: نسبت به میزان بافت مورد استفاده شش تا هشت برابر حجمی آن متانول اضافه گردید و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی برداشته شد و مجدداً ۲ تا ۴ حجم متانول به رسوب اضافه شد و در شرایط مشابه تیمار گردید و با سانتریفیوژ محلول رویی به محلول قبل اضافه گردید و جهت اندازه‌گیری مورد استفاده قرار گرفت.

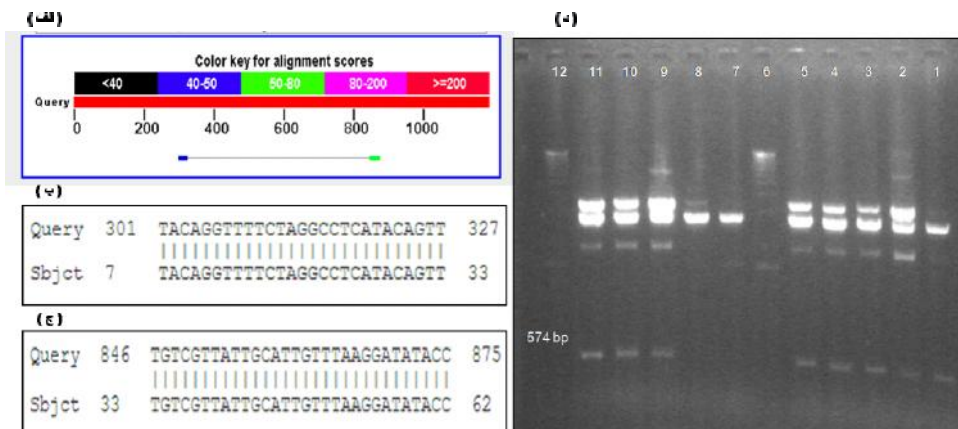
اندازه‌گیری میزان توکوفرول

جهت اندازه‌گیری توکوفرول از دستگاه HPLC و ستون C18 مطابق روش *Abbasi et al.* (2007) استفاده گردید. استانداردهای آلفا و گاما توکوفرول در غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم تهیه شد و پس از تهیه منحنی استاندارد و مقایسه سطوح زیر منحنی نمونه‌ها با سطوح زیر منحنی استانداردها میزان توکوفرول مربوطه محاسبه گردید.

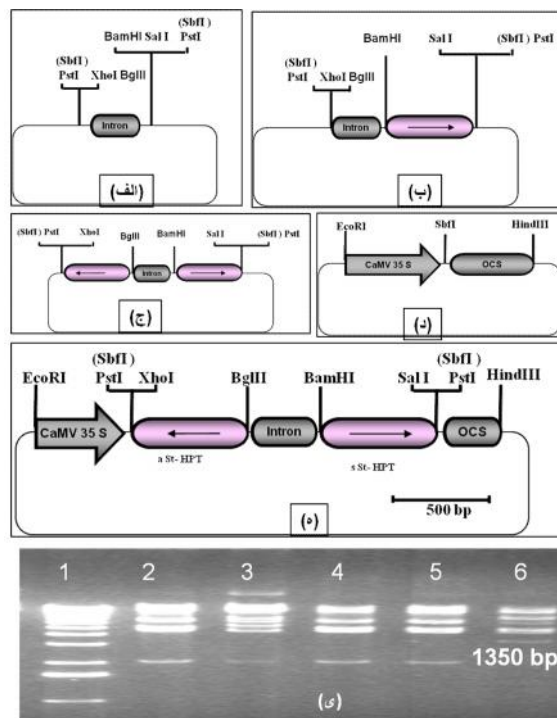
نتایج و بحث

یک قطعه ۱۳۵۰ جفت بازی شد (۵۷۵ جفت باز برای قطعه سنس، ۲۰۰ جفت باز برای اینترون ناقل و ۵۷۵ جفت باز برای قطعه آنتی‌سنس). قطعه ۱۳۵۰ جفت بازی حاصل از هضم آنزیمی *Pst*I از روی ژل جدا و بین پروموتور CaMV35S و ویروس موزائیک کلم و ترمیناتور ocs ناقل بیانی pBin قرار گرفت (۴-ج). ناقل نهایی pBin:HPT:RNAi بود که برای انتقال ژن به آراییدوپسیس به باکتری اگروباکتریوم تومفاشینس سویه C58C1:pGV2260 منتقل شد.

۱۱ دیده می‌شود. قطعه حاصل از روی ژل جدا شد و در جهت سنس (شکل ۴-ب) و سپس در جهت آنتی‌سنس (شکل ۴-ج) در ناقل حدواسط (pUC-RNAi) که دارای یک اینترون ۲۰۰ جفت بازی بود قرار گرفت. ناقل حدواسط که حاوی قطعه سنس، اینترون و آنتی‌سنس بود با آنزیم برشی *Pst*I هضم شد که در صورت مثبت بودن کلون باید قطعه‌ای با اندازه مجموع این قطعات حاصل گردد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، هضم آنزیمی منجر به تولید



شکل ۳- الف) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای *HPT*. آغازگرهای *HPT* منجر به تکثیر یک قطعه ۵۷۵ جفت بازی می‌گردد، ب) محل اتصال آغازگر پیشرو، ج) محل اتصال آغازگر برگشتی، د) نتایج تکثیر با آغازگرهای پیشرو و برگشتی



شکل ۴- ساخت سازه pBin:HPT:RNAi (الف) طرح ناقل pUC18:RNAi مورد استفاده حاوی قطعه اینترون ۲۰۰ جفت بازی، ب) قرارگیری ژن در وضعیت سنس در ناقل pUC18:RNAi، ج) قرارگیری نسخه دیگری از ژن در وضعیت آنتی‌سنس در ناقل pUC18:RNAi، د) طرح ناقل بیانی pBin، ه) طرح سازه pBin:HPT:RNAi حاوی قطعه سنس، اینترون و آنتی‌سنس ژن موردنظر ی) هضم آنزیمی به تولید یک

قطعه ۱۳۵۰ جفت بازی منجر شد (۵۷۵ جفت باز برای قطعه سنس، ۲۰۰ جفت باز برای اینترون ناقل و ۵۷۵ جفت باز برای قطعه آنتی-سنس). قطعه ۱۳۵۰ جفت بازی حاصل از روی ژل جدا و بین پروموتور ۳۵S و پروموتور ocs ناقل بیانی pBin (شکل د) قرار داده شد.

PDP^۱ برای تشکیل اولین پیرینیل کوئینول حدواسط در مسیر بیوسنتز توکوفرول استفاده می‌کند (Collakova and DellaPenna, 2003a). چون HGA و PDP در سنتز پلاستوکوئینون، فیلوکوئینون و کلروفیل نیز استفاده می‌شوند و HPT که در نقطه انشعاب این مسیرها قرار دارد، آنزیمی کلیدی در مسیر توکوفرول به‌شمار می‌آید (Collakova and DellaPenna, 2003a).

برای مشخص کردن نقش ژن در یک مسیر بیوسنتزی یکی از راه‌ها تشدید بیان ژن و بررسی اثر آن روی میزان متابولیت نهایی می‌باشد. راه دیگر در جهت تأیید نقش ژن در مسیر بیوسنتزی این است که خاموشی ژن صورت گیرد و در صورت کاهش میزان متابولیت و یا عدم تولید آن نقش ژن در مسیر بیوسنتزی مشخص گردد. در اکثر پژوهش‌ها، تشدید بیان HPT مورد بررسی قرار گرفته و تأثیر آن را در گیاه بررسی کرده‌اند. در برگ‌ها بیشتر آلفا توکوفرول تجمع می‌یابد (Collakova and DellaPenna, 2003b). بررسی با هدف تشدید بیان *TMT-35S::HPT1/35S* منجر به افزایش ۳/۲ برابری فعالیت ویتامین E در برگ‌ها گردیده است (Collakova and DellaPenna, 2003b). در بذور بالغ آرابیدوپسیس نیز گاما توکوفرول فرم غالب به‌شمار می‌رود اما در آرابیدوپسیس تراریخته *TMT-35S::HPT1/35S* میزان توکوفرول آلفا غالب بوده و نسبت به شاهد ۱۲ برابر افزایش ویتامین E مشاهده گردیده است. آنزیم HPT به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز توکوفرول محسوب می‌شود و به‌نظر می‌رسد که بتواند جریان را به نفع توکوفرول تغییر دهد (Collakova and DellaPenna, 2003b). در پژوهشی که توسط Young Sam Seo et al., (2011) انجام شد، بیان اکتوپیک ژن هموجنتیسات فتیل ترانسفراز سبب در گوجه‌فرنگی اجرا شد و سبب افزایش توکوفرول در برگ‌ها و میوه گوجه‌فرنگی شد. آنزیم HPT بیوسنتز توکوفرول (ویتامین E) بسیار اهمیت دارد. در این بررسی همولوگ HPT از میوه سبب جدا (MdHPT1) شد. تشدید بیان mdHPT1 در گوجه‌فرنگی انجام شد. برگ‌های تراریخته نسل T₁ حاوی ۱/۸ تا ۳/۶ برابر و ۱/۶ تا ۲/۹ برابر بیشتر آلفا و گاما توکوفرول را نسبت به گیاه شاهد به‌ترتیب دارا بودند (Young Sam Seo et al., 2011). بیان ترانس‌ژنیک هموجنتیسات فتیل ترانسفراز HPT و

ارزیابی میزان توکوفرول در لاین‌های انتخاب‌شده از روی محیط‌گزینشی کانامایسین‌دار

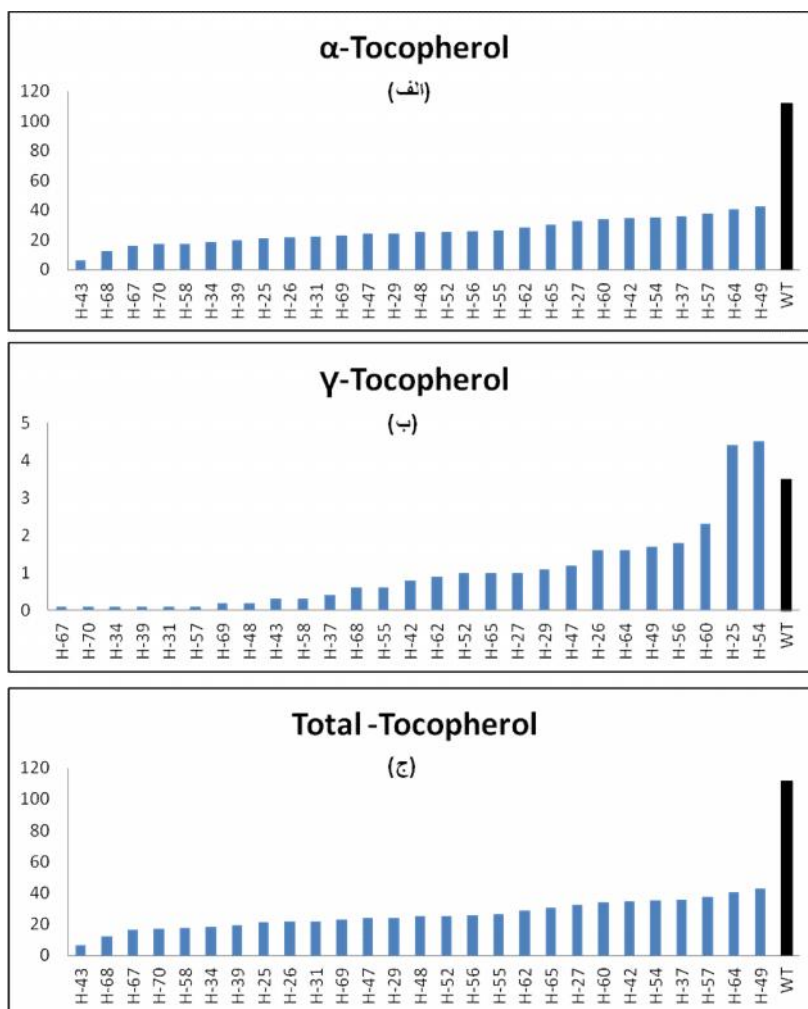
در این بررسی بذوری که در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک رشد کردند احتمالاً واجد سازه pBin:HPT:RNAi می‌باشند که هم ژن مقاومت به کانامایسین را دارا می‌باشد (شکل ۲ مقایسه گیاهان شاهد و تراریخت مؤید این مطلب می‌باشد) و هم حاوی ژن دخیل در مسیر بیوسنتز ویتامین E هستند. چون ژن HPT در مسیر بیوسنتزی ویتامین E مؤثر است و انتقال این سازه باعث خاموشی این ژن می‌گردد، لذا برای تأیید تراریختی این گیاهان میزان ویتامین E گیاهان حاصل مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی همان‌طور که در شکل ۵ (الف، ب و ج) نشان داده شده است، مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۵-الف نشان داده شده است میزان الفا توکوفرول در گیاهان رشد کرده بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین در لاین‌های ۴۳، ۶۸، ۶۷، ۷۰، ۵۸، ۳۴، ۳۹، و ۲۵ به‌ترتیب بیشترین کاهش را در مقایسه با شاهد نشان داده‌اند. همان‌طور که در شکل ۵-ب نشان داده شده است در گیاهان رشد کرده بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین میزان گاما توکوفرول در لاین‌های ۶۷، ۷۰، ۳۴، ۳۹، ۳۱، ۵۷، ۶۹، ۴۸، ۴۳ و ۵۸ نیز به‌ترتیب بیشترین کاهش را در مقایسه با شاهد به خود اختصاص دادند. در مجموع تراریختی گیاه با ژن HPT منجر به بیشترین کاهش در میزان توکوفرول کل به‌ترتیب در لاین‌های ۴۳، ۶۸، ۶۷، ۷۰، ۵۸، ۳۴ و ۳۹ در مقایسه با گیاهان شاهد گردید (شکل ۵-ج).

گیاه آرابیدوپسیس به‌عنوان یک گیاه مدل اهمیت زیادی داشته و در تحقیقات مسیر سنتز ویتامین E مورد توجه قرار داشته است (Collakova and DellaPenna, 2003b). آنزیم HPT در بیوسنتز توکوفرول (ویتامین E) بسیار اهمیت دارد. طبق بررسی‌های انجام‌شده بیان ترانس‌ژنیک هموجنتیسات فتیل ترانسفراز (HPT) و هموجنتیسات جرانیل جرانیل ترانسفراز (HGGT) که به‌ترتیب اولین مرحله بیوسنتز در دولپه و تک‌لپه‌ای‌ها را انجام می‌دهند، موجب افزایش توکوفرول و توکوئرینول تا ۱۵ برابر در بذور و برگ‌های آرابیدوپسیس، ذرت و کاهو شده است (Young Sam Seo et al., 2011). HPT از HGA^۱ و

1. Homogentisate

2. Phytyl diphosphate

هموجنتیسات جرانیل‌جرانیل ترانسفراز که اولین مرحله بیوسنتزی در دولپه و تک‌لپه‌ای‌ها را به ترتیب انجام می‌دهند باعث افزایش توکوفرول و توکوترینول تا ۱۵ برابر در بذور و برگ‌های آراییدوپسیس ذرت و کاهو شده‌اند (Young Sam *et al.*, 2011).



شکل ۵- نمودارهای مربوط به میزان توکوفرول در گیاهان انتخاب‌شده از روی محیط کاناماسین و رشدیافته در گلدان. توکوفرول از برگ‌های گیاهان آراییدوپسیس تراخیخت احتمالی که از روی محیط گزینشی کاناماسین انتخاب شده بودند در حال رشد رویشی در گلدان بودند و همچنین از گیاهان شاهد در همان مرحله جداسازی گردید. مقایسه میزان آلفا و گاما توکوفرول (α -Toc و γ -Toc) و همچنین توکوفرول کل نشان می‌دهد که میزان توکوفرول در غالب گیاهان انتخاب شده نسبت به شاهد کاهش داشته است.

توکوفرول در تیپ وحشی‌های تنش‌دیده، همبستگی معنی‌داری با افزایش سطوح HPT mRNA و فعالیت اختصاصی HPT نسبت به کنترل‌های غیرتنشی داشت (Collakova and DellaPenna, 2003b). تحقیقات بسیار کمی در جهت خاموشی ژن HPT گزارش شده است تنها گزارش مربوط به خاموشی این ژن از طریق جهش می‌باشد که جهت مطالعات تأثیر ویتامین E در گیاه مناسب نیست چون بذور این گیاهان موتانت قابلیت جوانه‌زنی بسیار

برای تعیین اینکه آیا فعالیت HPT برای سنتز توکوفرول تحت تنش محدودکننده است یا نه، گیاهان تیپ وحشی و 35S::HPT1 مورد تنش قرار گرفته و آنالیز شدند. در ۱۵ روز تنش، هر دو برگ‌های تیپ وحشی و 35S::HPT1 تجمع توکوفرول کل نسبت به کنترل‌های مرتبط غیرتنشی دیده شد. سطوح توکوفرول برگ‌های 35S::HPT1 تحت تنش ۲ تا ۴ برابر بیشتر از کنترل در طول ۱۵ روز بود. افزایش

از طرف دیگر چون موتانت‌های آرابیدوپسیس *vte2*، که در آن‌ها ژن *HPT* موتانت شده بود، فاقد هر گونه توکوفرول بودند بذور حاصل از این موتانت‌ها دارای مشکلاتی جهت جوانه‌زنی بودند (Sattler *et al.*, 2003, 2004) جهت رفع این مشکل از این سیستم خاموشی استفاده گردید. همان‌طور که در شکل ۵-ج نشان داده شده است گیاهان ۶۸، ۶۷، ۴۳، ۵۲، ۵۴، ۶۴ و ۴۹ به ترتیب دارای ۶، ۱۰، ۱۴، ۲۵، ۳۵، ۴۰ و ۴۲ درصد توکوفرول کل گیاه شاهد می‌باشند که نشان می‌دهد می‌توان با این سیستم خاموشی، گیاهانی حاوی درصد‌های متفاوت ویتامین E به‌دست آورد و در بررسی‌های فیزیولوژیکی بعدی مورد استفاده قرار داد تا مشکل موتانت‌های آرابیدوپسیس *vte2* حاصل از جهش با استفاده از مواد شیمیایی در گیاه آرابیدوپسیس (Sattler *et al.*, 2003, 2004) نیز برطرف گردد.

سپاسگزاری

از گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران که امکانات و فضای آزمایشگاهی مناسب جهت انجام این تحقیق را در اختیار گذاشتند، قدرانی می‌گردد.

REFERENCES

- Abbasi AR, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll L (2007) Specific Roles of α - and γ -Tocopherol in Abiotic Stress Responses of Transgenic Tobacco. *Plant Physiology*. 143: 1720-1738.
- Alscher RG, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal Experimental Botany*. 53: 1331-1341.
- Cheng Z, Sattler S, Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D (2003) Highly divergent met hyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in *Cyanobacteria* and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell*, 15: 2343-2356.
- Collakova E, DellaPenna D (2001) Isolation and Functional Analysis of Homogentisate Phytoltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 127: 1113-1124.
- Collakova E, DellaPenna D (2003a) Homogentisate phytoltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 131: 632-642.
- Collakova E, DellaPenna D (2003b) The role of homogentisate phytoltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol*. 133: 930-940.
- Dat JV, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Molecular Life Science*. 57: 779-795
- Estevez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, Leon P (2001) 1-Deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem*. 276: 22901-22909
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant*. 119: 355-

پایین داشتند لذا جهت رفع این مشکل در این تحقیق خاموشی ژن به کمک سیستم RNAi مورد استفاده قرار گرفت تا نقش این ژن در مسیر بیوسنتزی ویتامین E مورد بررسی قرار بگیرد. در این تحقیق گیاهان انتخاب‌شده در محیط کانامایسین به گلدان منتقل شدند و از این گیاهان آرابیدوپسیس و گیاهان شاهد که در حال رشد در فیتوترون بودند در مرحله رشد رویشی نمونه گرفته شد و از آنجایی که گیاهان دارای سن یکسان بودند و از بافت یکسانی جهت نمونه‌برداری مورد استفاده قرار گرفته بود و همچنین میزان مواد اولیه استفاده‌شده برای شاهد و تراریخت احتمالی برابر بود. نتایج حاصل از آنالیز میزان توکوفرول نشان می‌دهد که این سازه به گیاه انتقال داده شده است. کاهش میزان توکوفرول کل در مقایسه با شاهد و همچنین نتایج کارهای تشدید بیان ژن در کارهای اشاره‌شده در فوق نشان می‌دهد که این ژن در مسیر بیوسنتزی ویتامین E در گیاه مؤثر می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۵-ج نشان داده شده است در گیاهان انتخاب شده ۴۳، ۶۸، ۶۷، ۷۰، ۳۴ و ۳۹ میزان توکوفرول در حدود ۹۶، ۹۰، ۸۶، ۸۵، ۸۴ و ۸۲ درصد نسبت به گیاه شاهد کاهش نشان داده است که نشان‌دهنده تأثیر این ژن در مسیر بیوسنتزی ویتامین E می‌باشد و از طرف دیگر نشان می‌دهد که این سیستم کارایی بالایی در خاموشی این ژن در گیاه آرابیدوپسیس نشان می‌دهد.

- 364.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homogenization and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17: 1866-1875.
- Grusak MA, DellaPenna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 133-161.
- Munne-Bosch S, Alegre L (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 31-57.
- Munne-Bosch S, Alegre L (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct. Plant Biol.* 31:203-216.
- Munne-Bosch S, Weiler E, Alegre L, Muller M, Duchtig P, Falik J (2007) - Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta* 225: 681-691.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. *Anal. Biochem.* 264: 98-110.
- Norris SR, Shen X, DellaPenna D (1998) Complementation of the *Arabidopsis* pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* 117: 1317-1323.
- Porfirova S, Bergmueller E, Trof S, Lemke R, Doormann P (2002) Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 12495-12500.
- Sattler SE, Cahoon EB, Coughlan SJ, DellaPenna D (2003) Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria: evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol.* 132: 2184-2195.
- Sattler SE, Cheng Z, DellaPenna D (2004) From *Arabidopsis* to agriculture: engineering improved Vitamin E content in soybean. *Trends Plant Sci.* 9: 365-367.
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lunback M, Pollard M, DellaPenna D (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*, 16: 1419-1432.
- Sattler SE, Mene-Saffrane L, Farmer EE, Krishke M, Mueller MJ, DellaPenna D (2006) Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell.* 18: 3706-3720.
- Savidge B, Weiss JD, Wong YH, Lassner MW, Mitsky TA, Shewmaker CK, Post-Beittenmiller D, Valentin HE (2002) Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* p. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 321-332
- Schneider C (2005) Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 7-30.
- Tsegaye Y, Shintani DK, DellaPenna D (2002) Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 913-920.
- Van Eenennaam AL, Lincoln K, Durrett TP, Valentin HE, Shewmaker CK, Thorne GM, Jiang J, Baszsis SR, Levering CK, Aasen ED, Hao M, Stein JC, Norris SR, Last RL (2003) Engineering vitamin E content: from *Arabidopsis* mutant to soy oil. *Plant Cell.* 15: 3007-3019
- Young Sam S, Soo Jin K, Chee HH, Woo TK (2011) Ectopic expression of apple fruit homogentisate phytyltransferase gene (MdHPT1) increases tocopherol in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) leaves and fruits. *Phytochem.* 72: 321-329.

