

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

سمیه الهی^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 Allahi¹, Mohammad Mehdi Sohani², Hassan Hasani³

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)

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 addition, 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).

چکیده

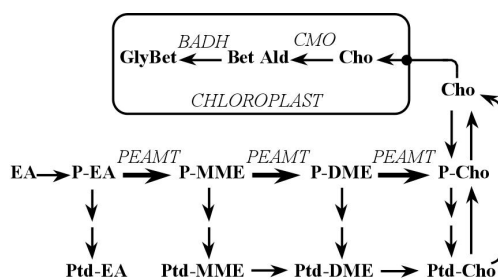
یکی از مکانسیم‌های مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی تولید محلول سازگار گلیسین بتائین است. کولین پیش‌ساز این متابولیت مهم و همچنین یک ترکیب اصلی در حفظ یکپارچگی و سیگنالینگ غشای سلولی است. در گیاهان مهم‌ترین مرحله تولید کولین را آنزیم سیتوپلاسمی فسفاتانول آمین N-متیل ترانسفراز (PEAMT; EC 2.1.1.103) کاتالیز 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 PBI121^{GUS-9}:PEAMT 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 طول‌تر، ریشه‌های فرعی گسترده‌تر و رشد رویشی بهتری داشته‌اند. اندازه‌گیری متابولیت گلیسین بتائین و آنزیم پراکسیداز نیز نشان داد که گیاهان تراریخته دارای محتوای گلیسین بتائین بیشتر و فعالیت آنزیم پراکسیدازی بالاتری نسبت به گیاهان شاهد داشته‌اند.

واژه‌های کلیدی: غوطه‌ورسازی گل آذین، فسفاتانول آمین N-متیل ترانسفراز (PEAMT)، کولین، گلیسین بتائین.

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 کمیت 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^۱ هستند که ویژگی آن‌ها کوچک بودن، حلالیت بسیار بالا در آب و غیرسمی در غلظت‌های بالا است (Chen and Chen and, 2011). گلاسیسین بتائین^۲ (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^۳ 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 فسفاتانول آمین^۴ (P-EA) و تولید فسفومونومیتیل اتانول آمین اتانول آمین^۵ (P-MME) است، دو مرحله بعدی متیلاسیون می‌تواند در سطح فسفوکولین^۶ (P-Cho)، فسفاتیدیل کولین^۷ (Ptd-Cho) یا ترکیبی از دو مسیر رخ دهد که به گونه گیاه بستگی دارد (شکل ۱).



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

سه مرحله متیلاسیون فسفاتانول آمین به منظور تشکیل فسفوکولین را آنزیم فسفاتانول آمین N-متیل ترانسفراز (PEAMT; EC 2.1.1.103) کاتالیز می‌کند، که یک مرحله بیوشیمیایی مهم در سنتز فسفولیپیدها و فسفاتیدیل کولین در گیاهان، نماتدها، باکتری‌ها، پشه مالاریا پارازیت انسانی و ... است (Zhang *et al.*, 2010). در گیاه اسفناج و چغندرقد 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.

3. Choline
4. Phospho-ethanolamine
5. Phospho-monomethyl-ethanolamine
6. Phospho-choline
7. Phosphatidyl-choline

1. Compatible solute
2. Glycinebetaine

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 چغندر قند (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 چغندر قند 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 گلاسیسین 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 فرایان ژن کلیدی بیوسنتز کولین *PEAMT* به همراه دو ژن دیگر بیوسنتز گلاسیسین 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 ردوکتاز، آسکوربات

در گیاهان بیوسنتز کولین در هر یک از سه مسیر که رخ دهد، مرحله آغازین متیلاسیون بر روی فسفاتانول آمین و توسط آنزیم *PEAMT* صورت می‌گیرد. در گیاه اسفناج و چغندر قند مقادیر زیادی از کولین جهت تولید محافظت‌کننده 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 مهارى فسفوکولین بر روی آنزیم *PEAMT* و دیگری اثر مهارى 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 فسفولیپید 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

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده

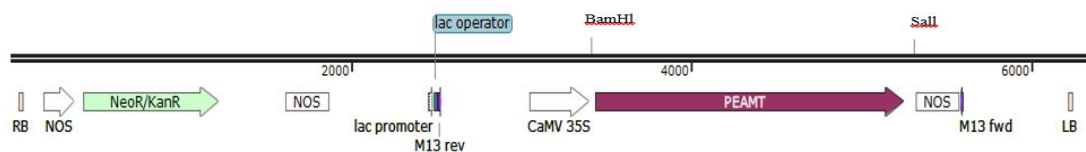
در این پژوهش جهت جداسازی ژن *PEAMT*، بذر گیاه اسفناج بومی ایران تهیه (شرکت پاکان بذر، اصفهان) و در گلدان‌های حاوی ورمی‌کولیت و پیت‌ماس (به نسبت مساوی) در شرایط ۸ ساعت روشنایی با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت تاریکی با دمای ۱۹ درجه سانتی‌گراد کشت و روزانه با محلول هوگلند (0.5 X) آبیاری شدند. به منظور 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 برگ تهیه و جهت استخراج RNA استفاده شدند.

سویه‌های باکتریایی و ناقل‌های مورد استفاده

در این مطالعه *E. Coli* سویه DH5 α 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 پروموتور CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS استفاده شد که از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه شده بود (شکل ۲).

پراکسیداز و ... دیگری از طریق سیستم غیرآنزیمی مانند اسید آسکوربیک، گلوکاتینون، 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 فرایبان 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 نرعیمی 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 بر این، گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های مسیر بیوسنتز GlyBet تحت شرایط تنش دارای فعالیت فتوسنتزی، اسمیلاسیون CO₂ و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به گیاهان شاهد هستند که حاصل آن رشد رویشی بیشتر، گل‌ها و میوه‌های 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 پروموتور 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.



شکل ۲. نمای شماتیک ناقل PBI121^{GUS-9}. ژن هدف (فلش قرمز) تحت کنترل پروموتور 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).

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 T4 لیگاز (Thermo

همسانه‌سازی ژن فسفاتانول 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 *Bam*HI 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.

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 ۱/۲ MS 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 برگ‌های 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 T₁ و T₂ 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 ۱/۲ MS حاوی یک درصد ساکارز کشت و به مدت ۳ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند.

(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 آراییدوپسیس با استفاده از روش غوطه‌ورسازی گل آذین

ابتدا بذور گیاه آراییدوپسیس 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 به ترتیب (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 گل آذین‌های بیشتر این ساقه گل‌دهنده قطع شد. مناسب‌ترین زمان جهت تلقیح زمانی است که هر گیاه علاوه بر داشتن چندین گل آذین 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 ریفامپیسین 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 جنتامایسن 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

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 نو ترکیب 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 نو ترکیب غیرفعال می‌شود بنابراین، فقط سلول‌های باکتری حاوی ناقل نو ترکیب قادر به تشکیل کلونی هستند و از تشکیل کلونی‌های حاصل از لایگیشن خودبخودی ناقل بدون درج DNA نو ترکیب 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 موفقیت آمیز بودن ترانسفورماسیون و اطمینان از درج ژن درون ناقل، واکنش کلونی PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن PEAMT انجام و در اغلب کلونی‌ها یک قطعه ۱۴۸۵ bp تکثیر شد. بعد از تایید حضور ژن در باکتری، از باکتری‌های ترانسفورم شده احتمالی استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *BamHI* و *Sall* 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 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 به دست آمده یک ژن جدید از منشاء اسفناج توده بومی ایران بوده است که با شماره دسترسی KR865952 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد.

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 T₂ 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 این منظور ۰/۵ گرم بافت از گیاهان تراریخت جدا و به خوبی پودر و اندازه‌گیری 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 آماری SAS انجام شد.

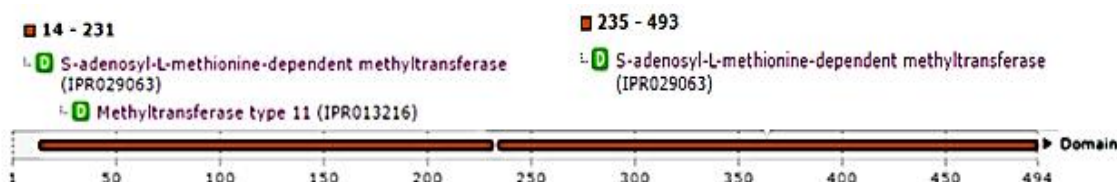
نتایج و بحث

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

دومین متیل ترانسفراز 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).

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



شکل ۳. نمای شماتیک دومین‌های متیل ترانسفراز 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.

آنالیز شد. توالی‌های پروتئینی PEAMT (1000) 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 آراییدوپسیس 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 آراییدوپسیس 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

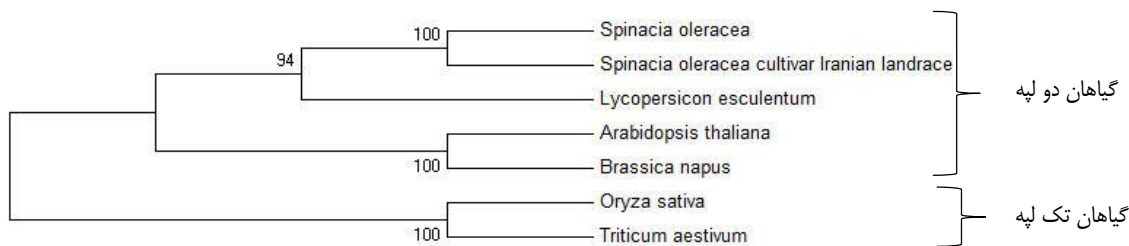
پس از آنالیز و تایید با توالی یابی، ژن PEAMT با آنزیم‌های برشی *BamHI* و *SaI* (Thermo Fisher) هضم و در درون ناقل بیانی GUS^{-9} PBI121 کلون شد. صحت درج ژن PEAMT درون ناقل بیانی با واکنش کلونی PCR و هضم آنزیمی دوگانه اثبات شد. ناقلین دوتایی به طور گسترده در انتقال ژن به گیاهان به‌واسطه *Agrobacterium*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

آنزیم‌های PEAMT براساس ساختار اولیه و توزیع دومین‌های کاتالیکی به چهار گروه تقسیم بندی می‌شوند. گروه یک شامل آنزیم‌های مالاریا (به طول ۲۶۳-۲۶۶ اسید آمینه) و پروتئوباکتری‌ها (به طول ۱۶۴ اسید آمینه) و دارای یک دومین متیل ترانسفراز می‌باشد. گروه دوم شامل آنزیم‌های دو قسمتی دارای ۴۵۰-۵۸۰ اسید آمینه و دو دومین متیل ترانسفراز می‌باشند. این گروه شامل آنزیم‌های PEAMT گیاهان، *P. infestans* zebrafish، *frogs*، lancelet Florida و *C. elegans* شامل آنزیم‌های PEAMT از *C. briggsae* که از نظر اندازه دوبرابر آنزیم مالاریا است اما شامل یک دومین کاتالیکی متیل ترانسفراز در سمت N-ترمینال (گروه ۳) و یا 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 ترانسفراز 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 Bootstrap Maximum Likelihood با آزمون

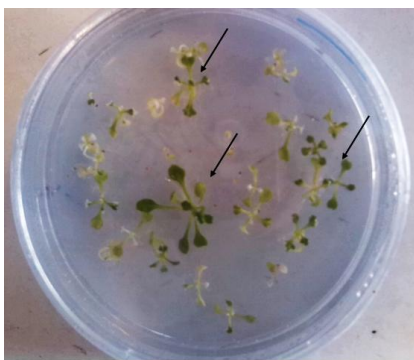
با مشکل مواجه می‌شود. در این راستا از ناقل بیانی مهندسی شده $PBI121^{GUS-9}$ دارای نه جایگاه برشی منحصر به فرد آنزیم‌های برشی اهدایی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری استفاده شد (Esfahani and Salmanian, 2013).

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



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

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.

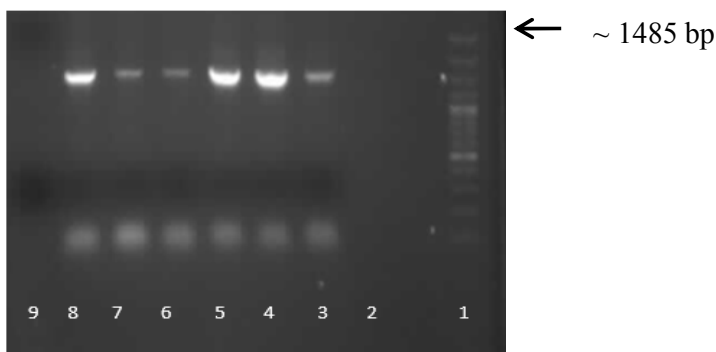
گیاهچه‌های مقاوم به گل‌دان انتقال داده شدند، از گیاهچه‌های سبز و زنده DNA استخراج و واکنش

عوامل متعددی می‌تواند در بهبود کارایی تراریخت مؤثر باشند که از جمله انتخاب روش تراریخت 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 تراریخت 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 آنجایی که 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 تراریخت، بذور گیاهان بر روی محیط کشت انتخابی $MS \frac{1}{2}$ حاوی کانامیسین ($50 \mu g/ml$) کشت

وجود نداشت. این غربالگری بر روی تمامی گیاهان تراریخته احتمالی نسل‌های T₁ و T₂ نیز انجام شد (شکل ۶).

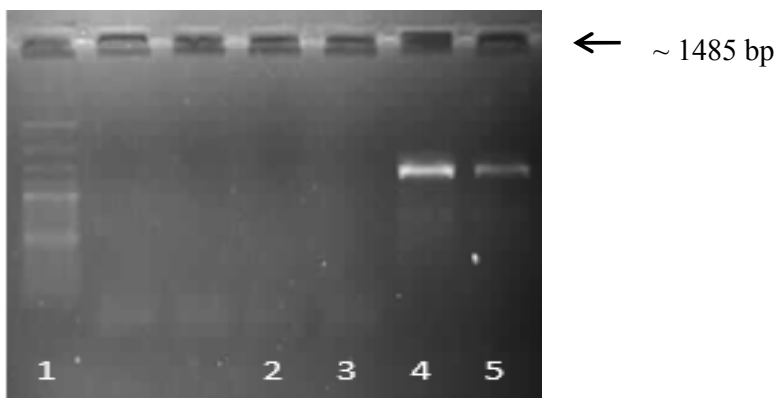
PCR با پرایمرهای اختصاصی *PEAMT* انجام شد. در تعدادی از آنها یک باند به اندازه ۱۴۸۵ bp مشاهده شد در حالی که باند مذکور در گیاهان شاهد



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

تراریخت حاوی باندی به طول حدود ۱۴۸۵ bp بود. این نتایج نشان داد *PEAMT* می‌تواند بخوبی در گیاهان تراریخت آراییدوپسیس رونوشت برداری شود در حالی که گیاهان شاهد فاقد باند مذکور بودند (شکل ۷).

به‌منظور بررسی رونوشت برداری ژن *PEAMT* در گیاهان تراریخته واکنش RT-PCR در لاین‌های تراریخت شماره ۱، ۲ و گیاه شاهد آراییدوپسیس (Col-0) انجام شد. واکنش RT-PCR گیاهان



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

آزمون بررسی رشد ریشه اصلی در شرایط تنش NaCl در گیاهچه‌های 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).

ارزیابی‌های فنوتیپی گیاهان تراریخت *PEAMT* تحت تنش شوری

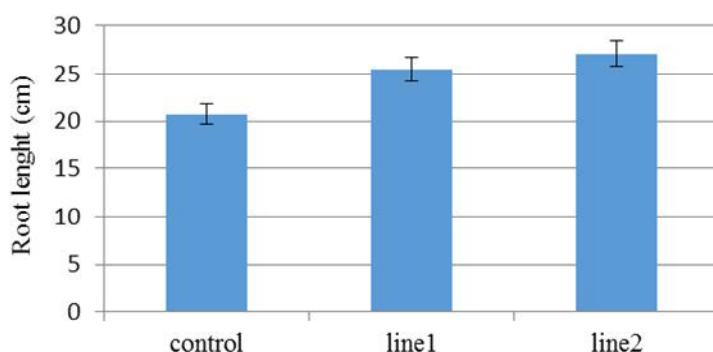
ارزیابی فنوتیپی طول ریشه اصلی در گیاهان تراریخت و شاهد اکوتیپ Col-0 تحت تنش شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار انجام شد. تجزیه واریانس

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.

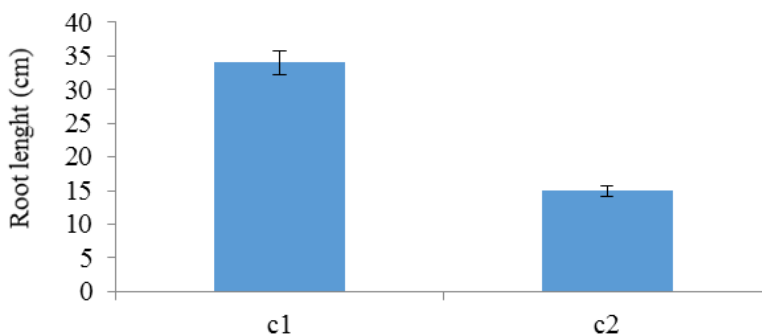
نتایج مقایسه میانگین اثر ساده ژنوتیپ نشان داد که بیشترین مقدار طول ریشه اصلی مربوط به لاین تراریخت شماره ۲ با ۲۷/۰۸ cm و بعد از آن لاین تراریخت شماره ۱ با ۲۵/۵ cm و کمترین مقدار طول ریشه اصلی مربوط به گیاهان شاهد آرابیدوپسیس Col-0 با طول ۲۰/۷ cm بوده است (شکل ۸). تفاوت در میزان رشد در لاین‌های تراریخت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



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

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).

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



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.

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 حالی که 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 فتوستنز و اسمیلاسیون CO₂ 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 آراییدوبسیس تراریخته حاوی ژن PEAMT اسفناج دارای رشد بهتری نسبت به گیاهان شاهد تحت تنش شوری هستند.

این موتانت XIPOTL1 آراییدوبسیس 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 بیوستز 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 آراییدوبسیس تیمار شده با باکتری *Bacillus subtilis* (GB03) تحت تنش‌های اسمزی در مقایسه با شاهد افزایش یافت. تحقیقات نشان داد که تحت تیمار این باکتری خاکری 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 آراییدوبسیس تحت تنش اسمزی همبستگی داشت. آن‌ها همچنین گزارش کردند که بیان PEAMT در گیاهان آراییدوبسیس 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 بیوستز 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 بیوستز 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

آراییدوبسیس 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 حالی که 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 فتوستنز و اسمیلاسیون CO₂ 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 آراییدوبسیس تراریخته حاوی ژن PEAMT اسفناج دارای رشد بهتری نسبت به گیاهان شاهد تحت تنش شوری هستند.

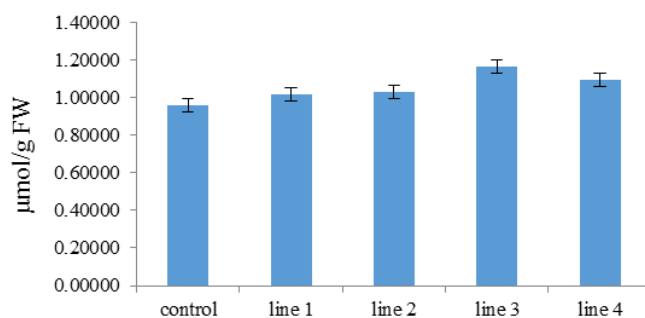
این موتانت XIPOTL1 آراییدوبسیس با درج T-DNA در لوکوس At3g18000- ژن کدکننده آنزیم PEAMT- تولید شد (Cruz-Ramírez et al., 2004).

ژن کلیدی مسیر بیوستنز کولین و پیش ماده بیوستنز 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 گلاسیسین بتائین در گیاهان ۴ هفته‌ای شاهد و تراریخت

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

** معنی داری در سطح ۱٪.



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

میان خانواده گیاهان عالی است. پراکسیدازها نقش‌های مختلفی مانند لیگنینی‌شدن، 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

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

متابولیت GlyBet به دو طریق باعث افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود. ۱- تجمع مقادیر زیاد این متابولیت در گیاهانی مانند اسفناج و چغندر قند 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

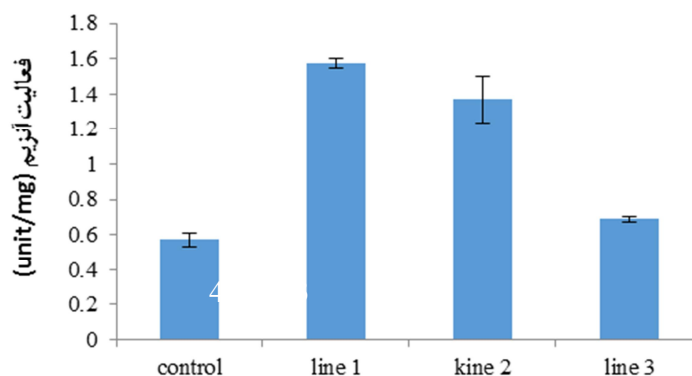
جدول ۳. تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان ۴ هفته‌ای شاهد و تراریخت

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

** معنی‌داری در سطح ۱٪.

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).



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

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 غیرزیستی 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

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 آنتی‌اکسیدانی 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 باکتریایی *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

برنج و گندم را تحت تنش شوری افزایش داد.

می‌توان مقاومت و عملکرد گیاهان زراعی مهم مانند

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 homeopeptide 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.

- 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.