ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸
صفحه ۱٤٦ - ۱۳۵

واکاوی عمل ژن *AAPT2* در آرابیدوپسیس با استفاده از جهش‌یافته غیرفعال

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

معصومه خسروی[۱]، هومن سالاری*[۱]

۱-به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی کرمانشاه

Khosravi M[1], Salari H[*1]

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

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

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۲٤ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲٦)

چکیده

یکی از ژن‌های کلیدی بیوسنتز فسفاتیدیل‌کولین در آرابیدوپسیس ژن آمینوالکل‌فسفوترانسفراز (*AtAAPT2*) است. برای ارزیابی عمل یکی از دو ایزوفرم این ژن از جهش‌یافته غیرفعال *aapt2* استفاده شد. مقایسه *aapt2* و تیپ وحشی نشان داد این لاین در بیش‌تر صفات مورد ارزیابی با تیپ وحشی تفاوت دارد. بین *aapt2* و تیپ وحشی از نظر صفات روز تا رسیدن به روزت دو، سه، چهار، پنج و شش برگی سایز نهایی روزت، روز تا باز شدن ۱۰ درصد گل‌ها، کامل شدن گلدهی، تفاوت بسیار معنی‌داری مشاهده شد. برای صفات روز تا رسیدن به روزت هشت، نه، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ برگی، مشاهده اولین جوانه گل، باز شدن اولین گل، باز شدن ۳۰ و ۵۰ درصد گل‌ها و شکسته شدن اولین سیلیک تفاوت معنی‌داری بین *aapt2* و تیپ وحشی مشاهده شد. صفات روز تا رسیدن به روزت ۱٤ برگی، روز تا رسیدن روزت به ۲۰، ۵۰ و ۷۰ درصد از سایز نهایی و کامل شدن پیری بین *aapt2* و تیپ وحشی تفاوتی دیده نشد. لذا احتمالا پروتئین رمزگذاری شده توسط ژن *AAPT2* در مراحل نخستین نمو آرابیدوپسیس نقش دارد. *aapt2* و تیپ وحشی از نظر فشار اسمزی تفاوت بسیار معنی‌داری داشتند اما محتوای نسبی آب، میزان کلروفیل a و b، کاروتنوئید، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، مقاومت روزنه‌ای و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II تفاوتی نداشتند. هم‌چنین *aapt2* و تیپ وحشی برای تعداد برگ تفاوت بسیار معنی‌دار و برای وزن تر و خشک برگ تفاوت معنی‌دار داشتند، اما وزن‌تر و خشک ریشه بین *aapt2* و تیپ وحشی تفاوتی نداشت.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس
آمینوالکل‌فسفوترانسفراز
جهش‌یافته غیرفعال
فسفاتیدیل‌کولین

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]

مقدمه

شواهد گسترده نشان می‌دهد که فسفولیپیدها و مولکول‌های مشتق شده از آن‌ها از اجزای حیاتی سلول هستند، به‌طوری که با قرارگیری در ساختار غشا و وزیکول، انتقال پیام و نیز برهم‌کنش با مسیرهای هورمونی مهم در بسیاری از رفتارهای گیاه نقش دارند (Nuccio et al. 1998; Charron et al. 2002; Cruz-Ramírez et al. 2004). فسفاتیدیل‌کولین[1] فراوان‌ترین فسفولیپید در غشای پلاسمایی یوکاریوت‌هاست. این فسفولیپید علاوه بر ایفای نقش در ترکیب غشا، به‌عنوان یک مولکول سیگنالینگ هم فعالیّت دارد (Gibellini et al. 2010). این ماده همچنین از گلیسرولیپیدها در لایه بیرونی غشا پلاسمایی محافظت می‌کند (Wang and Nii 2000; Testerink and Munnik 2010). به‌علاوه فسفاتیدیل‌کولین می‌تواند پیش‌ماده فعالیت چندین آنزیم برای تولید فسفاتیدیک‌اسید[2]، لیزوفسفاتیدیک‌اسید[3]، لیزو فسفاتیدیل‌کولین[4] و دی آسیل‌گلیسرول[5] باشد که در مسیرهای سیگنالی ایجاد شده در تنش‌های محیطی مثل شوری، خشکی و سرما نقش دارند (Testerink and Munnik 2010). در آرابیدوپسیس، تولید فسفاتیدیل‌کولین به‌عنوان کانال اصلی برای ساخت کولین عمل می‌کند. در یک جهش‌یافته آرابیدوپسیس به‌نام (T365) که در آن ژن فسفواتانول‌آمین‌ان- متیل‌ترانسفراز[6] (PEAMT) با استفاده از سیستم RNA سنس و آنتی‌سنس غیرفعال شده بود، فنوتیپ‌های مختلف مورفولوژیکی از قبیل برگ‌های رنگ پریده، پیری زودرس و نر عقیمی مشاهده شد. این جهش‌یافته همچنین به دما حساسیت داشت و به شوری حساسیت فوق‌العاده‌ای نشان داد. نشان داده شده‌است که جهش‌یافته T365، کولین خیلی کمی تولید کرده است. این مشاهدات مشخص می‌کند که بیوسنتز کولین در ویژگی‌های مورفو-فیزیولوژیک گیاه مؤثر است و در مقاومت در برابر تنش های محیطی هم نقش دارد (Mou et al. 2002). در یوکاریوت‌ها فسفاتیدیل‌کولین می‌تواند از طریق دو مسیر متفاوت کندی[7] و متیلاسیون[8] سنتز شود (شکل ۱). در مسیرکندی، کولین آزاد مستقیماً توسط کولین‌کیناز برای تولید فسفوکولین[9] (P Cho) فسفوریله می‌شود و سپس فسفوکولین توسط آنزیم سی‌تی‌پی-فسفوکولین سیتیدیل‌ترانسفراز[10] (CCT) به سیتیدیل‌فسفات‌کولین[11] (CDP-Cho) تبدیل می‌شود. این ماده پیش‌ماده فعالیت آنزیم آمینوالکل‌فسفوترانسفراز[12] (AAPT) است که سیتیدیل‌فسفات‌کولین را به فسفاتیدیل‌کولین تبدیل می‌کند. مسیر دوم برای سنتز فسفاتیدیل‌کولین، از فسفواتانول‌آمین[13] (PEA) یا فسفاتیدیل‌اتانول‌آمین[14] (PtdEA) شروع می‌شود. شایان گفتن است متیلاسیون مستقیم فسفاتیدیل‌اتانول‌آمین تاکنون برای گیاهان گزارش نشده است، در حالی‌که مسیر متیلاسیون فسفواتانول‌آمین در گیاهان وجود دارد. مسیر مذکور با متیله شدن فسفواتانول‌آمین توسط فسفواتانول‌آمین‌ان- متیل‌ترانسفراز (PEAMT) شروع می‌شود و فسفومونومتیل‌اتانول‌آمین[15] (PMMEA)، فسفودی‌متیل اتانول‌آمین (PDMEA) و فسفوکولین را تولید کرده و در نهایت فسفوکولین باز هم از طریق مسیر کندی منجر به تولید فسفاتیدیل‌کولین می‌شود (Boyes et al. 2001). فسفومونومتیل‌اتانول‌آمین و فسفودی‌متیل‌اتانول‌آمین هم‌چنین می‌توانند از طریق مسیر فسفاتیدیل پایه منجر به بیوسنتز فسفاتیدیل‌کولین شوند (Smith et al. 2000). در این مسیر فسفومونومتیل‌اتانول‌آمین و فسفودی‌متیل‌اتانول‌آمین به‌ترتیب به فسفاتیدیل‌مونومتیل‌اتانول‌آمین[16] (PtdMMEA) و فسفاتیدیل‌دی متیل‌اتانول‌آمین[17] (PtdDMEA) و نهایتا به فسفاتیدیل‌کولین تبدیل می‌شوند (Bolognese and McGraw 2000).

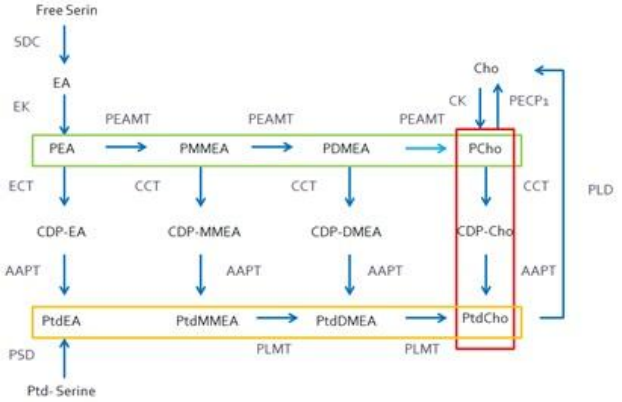
نقش آنزیم آمینوالکل‌فسفوترانسفراز در آخرین مرحله از مسیر کندی کاملا مشخص است. این آنزیم همچنین در مسیر

[1] Phosphatidylcholine
[2] Phosphatidic acid
[3] Lyso-phosphatidic acid
[4] Lyso- Phosphatidylcholine
[5] Diacylglycerol
[6] phosphoethanolamine N- methyltransferase

[7] Kennedy Pathway
[8] Methylation Pathway
[9] Phospho- choline
[10] CTP-phosphocholine cytidylyltransferase
[11] cytidyldiphosphate choline
[12] aminoalcoholphosphotransferase
[13] Phosphoethanolamine
[14] Phosphatidylethanolamine
[15] Phosphomonomethylethanolamine
[16] Posphatidylmonomethylethanolamine
[17] Posphatidyldimethylethanolamine

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]

فسفاتیدیل پایه برای تولید فسفاتیدیل‌کولین نقش دارد (شکل ۱). بر اساس اطلاعات موجود در تارنمای TAIR[1] برای ژن رمزگذار آنزیم آمینوالکل‌فسفوترانسفراز (AAPT) در آرابیدوپسیس دو ایزوفرم *AAPT1*[2] و *AAPT2*[3] گزارش شده‌است.



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

این دو ژن از نظر توالی آمینواسیدی حدود ۸۸ درصد مشابهت دارند. داده‌های میکروواری و RNA-seq نشان داده‌اند که *AAPT1* تقریباً در همه بافت‌های گیاهی بیان می‌شود. هم‌چنین گزارش شده‌است *AAPT2* در بذر بالغ و دانه گرده بیش‌تر و در برگ‌های روزتی کمتر از *AAPT1* بیان می‌شود (Yu et al. 2015).

تعیین کامل توالی ژنوم آرابیدوپسیس، زمینه مناسبی را برای روش‌های ژنتیک معکوس به‌منظور درک عملکرد ژن‌ها هموار کرده است. جستجوی همولوژی‌ها، آنالیز میکروواری برای بیان ژن‌ها و مطالعات متابولیکی احتمالاً برخی از اطلاعات مربوط به عملکرد ژن را فراهم می‌کنند. با این‌حال در بیش‌تر موارد، برای گزارش دقیق عملکرد یک ژن باید بتوان اثر آن ژن را در فنوتیپ و در سطح ارگانیسم شناخت (Boyes et al. 2001). تولید جهش یافته‌های غیرفعال[4] که در آن یکی از ژن‌های شناخته شده ارگانیسم‌ها بی‌فعالیت شده‌است ابزار قدرتمندی برای منظور بالاست. در فناوری تولید جهش یافته‌های غیرفعال مکان ژن در کروموزوم دچار اختلال می‌شود (Reski 1998). از آنجایی که اینترون‌های آرابیدوپسیس کوچک هستند و همین‌طور مواد بین ژنی کمی دارند وارد کردن قطعه T-DNA به‌طول ۵ Kb تا ۲۵ Kb عموماً سبب ایجاد اختلال چشمگیر در عملکرد یکی از ژن‌ها شده و جهش‌یافته غیرفعال تولید می‌شود. همانطور که پیشتر اشاره شد ژن *AAPT* که رمزگذار آنزیم آمینوالکل‌فسفوترانسفراز است، نقشی اساسی در مسیر بیوسنتزی فسفاتیدیل‌کولین دارد. بنابراین، مطالعه آن از اهمیت زیادی برخوردار است. بررسی عملکرد ایزوفرم *AAPT2* با استفاده از جهش‌یافته غیرفعال هدف گزارش حاضر است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: جهش‌یافته‌های غیرفعال آرابیدوپسیس از اکوتیپ Columbia-0 بود که از مؤسسه سالک[5] تهیه شدند. کد کد دسترسی جهش‌یافته مورد استفاده SALK-123095 بود. بذور تیپ وحشی پیشتر در دانشگاه رازی کرمانشاه تهیه شد (Zangishei and Salari 2015). بذور مطابق روش پیشنهادی Weigel and Glazebrook (2001) ضدعفونی شدند. سپس بذور به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرمادهی

[1] www.arabidopsis.com
[2] AT1G13560
[3] AT3G25585

[4] T-DNA insertion mutant
[5] SALK (Ohio State University- ABRC)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]

شدند. از گلدان‌هایی به قطر۹/۵ و ارتفاع ۷/۵ سانتی‌متر و با گنجایش تقریبی ۱۷۰ گرم خاک استفاده شد. در مرکز هر گلدان یک عدد بذرکشت شد. خاک مورد استفاده نسبت مساوی حجمی از ورمیکولایت سایز ۳-۰ (کاندیس- ایران) و پیت ماس (ای دی فری پیت- هلند) بود. از کود آماده آگرویت[1] (آگلوکن- آلمان) به میزان دو گرم به ازای هر لیتر خاک استفاده شد.گلدان‌های آماده شده در سینی‌هایی به ابعاد ۵۰×۲۵×۹ سانتی‌متر قرار داده شدند. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده اتاق رشد در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۳۰ درصد، شدت نور ۱۲۰ میکرو انیشتن (لامپ فلوئورسنت سفید) و طول روز ۱۰ ساعت که در اواخر رشد به تدریج به ١٤ ساعت رسانیده شد، نگهداری شدند. آبیاری هر چهار روز یکبار از کف و با آب شرب شهری تا رسیدن به ظرفیت زراعی انجام شد.

غربالگری لاین‌های دارای T-DNA: به منظور جداسازی لاین‌ها از نظر عدم درج، درج و هموزیگوت بودن برای T-DNA درج شده به‌ترتیب از سه روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2] (PCR)، استفاده از آنتی‌بیوتیک و همردیفی توالی ژن *AAPT2* درلاین‌های *aapt2* در برابر توالی ژن *AAPT2* در تیپ وحشی استفاده شد.

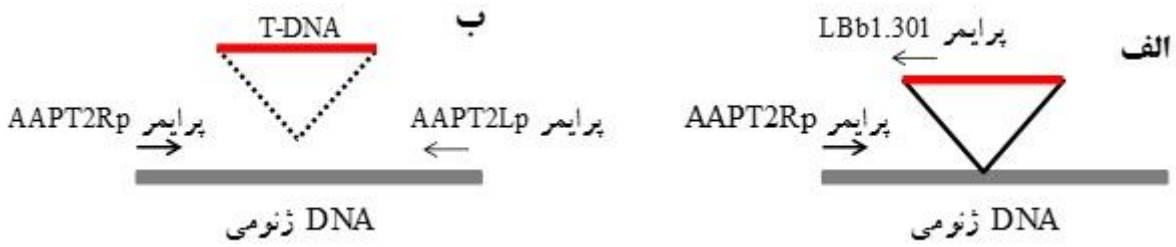
استخراج DNA از برگ آرابیدوپسیس براساس روش Dellaporta et al. (1983) صورت گرفت. جهت اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد که با محلول اتیدیوم بروماید تیمار شده بود استفاده شد. پرایمرهای مستقیم (AAPT2Rp) و معکوس (AAPT2Lp) برای ژن *AAPT2*، از طریق نمایه SIGNAL iSect Primer Design[2] در سایت SIGNAL[3] طراحی شدند. برای T- DNA از پرایمر معرفی شده در سایت SIGNAL به‌نام LBb1.301 استفاده شد (جدول ۱). به‌منظور غربالگری برای هر لاین دو واکنش مجزا با استفاده از جفت پرایمرهای AAPT2Rp-AAPT2Lp و AAPT2Rp- LBb1.301 انجام گرفت (شکل۲).

[1] AGRAVIT

[2] Polymerase Chain Reaction
[2] http://signal.salk.edu/isectprimers.html
[3] Salk Institute Genomic Analysis Labratory

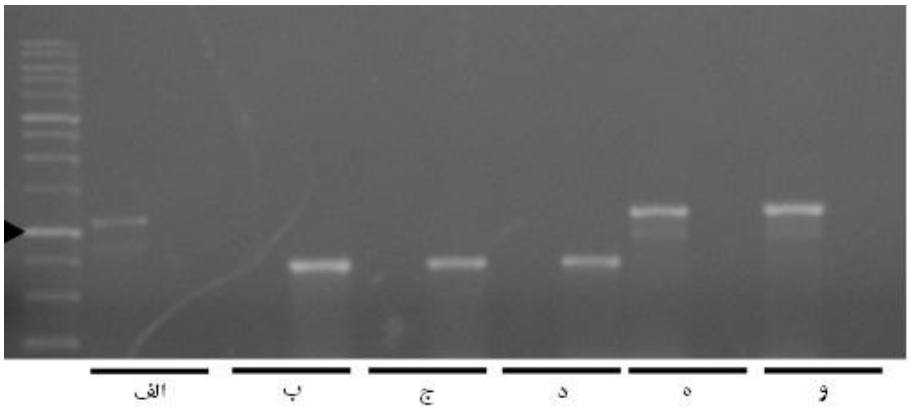
جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	ژن هدف	توالی پرایمر	دمای اتصال °C
AAPT2 Rp	AAPT2	AAGTAAGCCGTGTGCAAAGTG	٥٢/٤
AAPT2 Lp	AAPT2	TCGTTACAGATACGCAAAGCAC	٥٣/٠
LBb1. 301	T-DNA	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	٤٦/٨



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

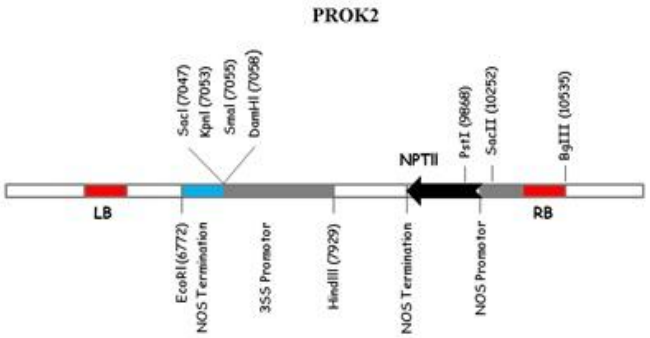
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]



شکل ۳- نتایج حاصل از غربالگری لاین‌های آرابیدوپسیس از نظر درج یا عدم درج T-DNAدر ژل الکتروفورز. الف: تیپ وحشی ب، ج و د: لاین هموزیگوت برای درج T-DNA در ژن *aapt2*. ه، و: لاین بدون درج T-DNA در ژن *aapt2*. برای تمامی لاین‌ها چاهک های اول و دوم به‌ترتیب تکثیر با پرایمرهای AAPT2 Lp – AAPT2 Rp. و AAPT2 Rp–LBb1. 301 در تصویر باند ۱۰۰۰bp مشخص شده‌است.

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

برای اطمینان از صحت هموزیگوت بودن لاین‌هایی که براساس غربالگری به‌وسیله PCR انتخاب شده بودند از غربالگری به وسیله کاناماسین استفاده شد. در T-DNA وکتور مورد استفاده برای ایجاد جهش‌یافته‌های غیرفعال، ژن مقاومت به کاناماسین *NPTII* قرار داده شده‌است (شکل ٤). غربالگری ابتدایی با غلظت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کاناماسین (دخفا بیوشیمی- هلند)[1] انجام شد. غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر برای انجام غربالگری نهایی انتخاب شد. برای انتخاب روش غربالگری مناسب، دو روش متداول با اعمال تغییرات و روش سریع بررسی شدند (Harrison et al. 2006). براساس نتایج، روش متداول با اعمال تغییرات، برای غربالگری نهایی انتخاب گردید. به این منظور ابتدا بذور لاین‌هایی که در مرحله پیشین به‌عنوان هموزیگوت شناخته شده بودند – به‌همراه بذور- تیپ وحشی بعد از استریل کردن به مدت دو روز در محیط تاریک سرمادهی شدند.



شکل٤- ساختار T-DNA در وکتور prok2. این وکتور برای ایجاد جهش‌یافته غیرفعال در آرابیدوپسیس مورد استفاده قرار می‌گیرد. (HTTP://SIGNAL.SALK.EDU/CGI-BIN/TDNAEXPRESS)

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]

سپس روی محیط کشت $\frac{1}{2}$MS (دخفا بیوشیمی- هلند[1]) حاوی ۵۰mg/l آنتی بیوتیک کانامایسین کشت شدند و به مدت ۱۰ روز با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی رشد داده شدند. جوانه‌های مقاوم به کانامایسین بعد از ۱۰ روز تشخیص داده شد. غربالگری با آنتی بیوتیک صحت غربالگری به‌وسیله PCR را تایید کرد (شکل ۵).

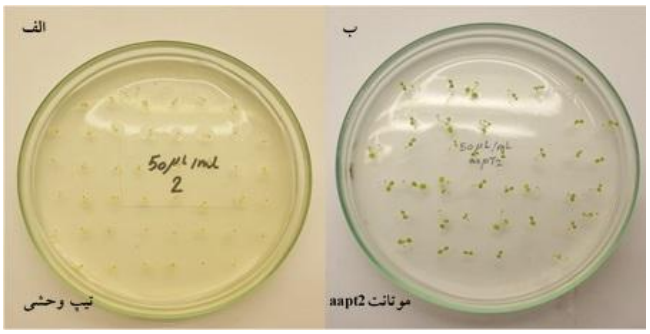
غربالگری با استفاده از همردیفی توالی‌ها: به‌منظور تایید نهایی هموزیگوت بودن لاین‌های انتخاب شده، از هم‌ردیفی توالی ژن *AAPT2* در لاین‌های هموزیگوت غربال شده (*aapt2*) در مقابل توالی تیپ وحشی ژن *AAPT2* (با کد دسترسی AF 360151.1) به‌وسیله نرم‌افزار Seq Man از مجموعه نرم‌افزارهای DNA STAR، استفاده شد. ژن *AAPT2* با استفاده از پرایمر AAPT2Rp توالی‌یابی شد (شرکت بایونیر، کره جنوبی به‌واسطه شرکت تکاپوزیست، ایران). در هم‌ردیفی توالی به‌دست آمده برای ژن *AAPT2* در لاین‌های *aapt2* و توالی همان ژن در تیپ وحشی درج T-DNA در ژن مورد نظر تایید شد. مکان این درج در اگزون شماره یک و نوکلئوتید شماره ۵۷ بود (شکل ٦). شایان گفتن است نخستین نوکلئوتید کدون آغاز نوکئوتید شماره ۱ در نظر گرفته شده بود.

اندازه‌گیری پارامترهای فنولوژیکی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی: در بررسی پارامترهای فنولوژیکی سه لاین مستقل *aapt2* در چهار تکرار بیولوژیک و دو لاین مستقل تیپ وحشی در دو تکرار بیولوژیک در نظر گرفته شد. هر تکرار بیولوژیک شامل یک گیاه مستقل بود. از مقیاس BBCH[2] برای بررسی‌های فنولوژیک استفاده شد (Boyes et al. 2001). جدول ۲ مراحل فنولوژیک مورد بررسی را نشان می دهد. بدین منظور ضمن یادداشت برداری، هر هفت روز یکبار عکس‌برداری توسط دوربین (کانن، د ۷۰۰- لنز ۱۸-۵۵)[3] انجام گرفت.

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

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

[3] Canon d700- Lens 18~55



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



شکل ٦- هم‌ردیفی توالی cDNA برای ژن AAPT2 با کد دسترسی AF 360151.1 در مقابل توالی T-DNA وارد شده در لاین aapt2 با کد SALK - 123095 .T- DNA در نوکلئوتید شماره ۵۷ به ژنوم وارد شده شده‌است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]

جدول ۲- صفات فنولوژی مورد بررسی براساس مقیاس BBCH

توسعه برگ	مرحله ۱ رشد اصلی
روزت ۲ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۰۲
روزت ۳ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۰۳
روزت ٤ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۰٤
روزت ٥ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۰٥
روزت ٦ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۰٦
روزت ۷ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۰۷
روزت ۸ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۰۸
روزت ۹ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۰۹
روزت ۱۰ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۱۰
روزت ۱۱ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۱۱
روزت ۱۲ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۱۲
روزت ۱۳ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۱۳
روزت ۱٤ برگی > طول ۱ میلی‌متر	۱,۱٤
رشد روزتی	مرحله ۳ رشد اصلی
روزت ۲۰٪ از سایز نهایی است	۳,۲۰
روزت ۵۰٪ از سایز نهایی است	۳,۷۰
روزت ۷۰٪ از سایز نهایی است	۳,۹۰
ظهور گل‌آذین	مرحله ٥ رشد اصلی
مشاهده اولین جوانه گل	٥,۱۰
گلدهی	مرحله ٦ رشد اصلی
باز شدن اولین گل	٦,۰۰
۱۰٪ از گل‌های تولید شده باز شده‌اند	٦,۱۰
۳۰٪ از گل‌های تولید شده باز شده‌اند	٦,۳۰
۵۰٪ از گل‌های تولید شده باز شده‌اند	٦,٥۰
تکمیل گلدهی	٦,۹۰
رسیدن سیلیک	مرحله ۸ رشد اصلی
شکسته شدن اولین سیلیک	۸,۰۰
پیری	مرحله ۹ رشد اصلی
کامل شدن پیری: آماده برای برداشت بذر	۹,۷۰

در مطالعات پارامترهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نیز از سه لاین مستقل *aapt2* و سه لاین مستقل تیپ وحشی استفاده شد. تعداد تکرار بیولوژیک برای هر دو لاین سه تکرار بود. مطالعه صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در زمان رسیدن گیاهان به مرحله ظهور اولین جوانه گل (۵/۱۰) انجام شد (شکل۷) (Bolognese and McGraw 2000).

تعداد برگ، متوسط وزن تر و خشک تک برگ، وزن تر و خشک ریشه به‌عنوان پارامترهای مورفولوژیکی اندازه‌گیری شدند. برای پارامتر تعداد برگ، کلیه برگ‌های گیاه جدا شدند و شمارش شدند. برای محاسبه وزن‌های تر و خشک، گیاهان مدنظر، ۳ ساعت پس از آغاز دوره نوری برداشت شدند. برگ‌ها از ریشه گیاه جدا شدند و بلافاصله وزن تر تمامی برگ‌ها توسط ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.



شکل۷- مرحله رشدی (۵/۱۰)، ظهور اولین جوانه گل

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]

برای به‌دست آوردن متوسط وزن تر تک برگ، وزن کل به‌دست آمده بر تعداد برگ‌ها تقسیم شد. وزن تر ریشه‌ها پس از آبشویی با ترازوی پیش‌تر گفته اندازه‌گیری شد. برای به‌دست آوردن وزن‌های خشک، نمونه‌ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٧٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس با ترازوی اشاره شده توزین شدند. متوسط وزن خشک تک برگ مجدداً از تقسیم وزن به‌دست آمده بر تعداد برگ‌ها حاصل شد.

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

۱) Chlorophyll a (mg/gFw) = 12.21 (A663) – 2.81 (A646)

۲) Chlorophyll b (mg/gFw) = 20.13 (A646) – 5.1 (A663)

۳) Carotenoids (mg/gFw) = [1000 (A470) – 3.27 (Chl a)] – 104 (Chl b)/227

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

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

نتایج و بحث

نتایج بررسی صفات فنولوژیک با استفاده از آزمون t جفت نشده نشان داد (شکل ۸). *aapt2* و تیپ وحشی برای صفات روز تا رسیدن به روزت دو، سه، چهار، پنج و شش برگی، روز تا باز شدن ۱۰ درصد گل‌ها، و روز تا کامل شدن گلدهی دارای تفاوت بسیار معنی‌دار و از نظر صفات روز تا رسیدن به روزت هشت، نه، ۱۰ ،۱۱، ۱۲ و ۱۳ برگی، روز تا مشاهده اولین جوانه گل، روز تا باز شدن اولین گل، روز تا باز شدن ۳۰ و ۵۰ درصد گل‌ها و روز تا شکسته شدن اولین سیلیک دارای تفاوت معنی‌دار هستند. این مشاهدات نشان می‌دهد *aapt2* در مراحل آغازین رشد نمو سریع‌تری نسبت به تیپ وحشی دارد. با افزایش سن گیاه تفاوت برای ویژگی‌های فنولوژیک *aapt2* وتیپ وحشی به شکل قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، به نحوی که در مراحل پایانی رشد یعنی روز تا رسیدن به روزت ١٤ برگی، روز تا رسیدن روزت به ۲۰، ۵۰ و ۷۰ درصد از سایز نهایی و کامل شدن پیری دیگر تفاوت معنی‌داری بین *aapt2* و تیپ وحشی قابل مشاهده نبود. براساس نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت غیرفعال شدن ایزوفرم *AAPT2* در روند نمو گیاه به‌ویژه در مراحل ابتدایی رشد تغییر ایجاد کرده است و احتمالاً فعالیت آنزیم رمزگذاری شده توسط این ژن مراحل نموی گیاه جوان را به تاخیر خواهد انداخت. استنباط دیگری که از این مشاهدات می‌توان کرد آن است که ایزوفرم دیگر این ژن یعنی *AAPT1* حداقل در مراحل ابتدایی رشد نقش بازدارندگی *AAPT2* را نمی‌تواند بازی کند لذا این دو ایزوفرم نمی‌توانند هم‌عملکرد[2] باشند. هم‌چنین شاید بتوان استنتاج کرد که *AAPT2* در اوائل رشد و نمو گیاه نقش بیش‌تری داشته و این نقش را در مراحل بلوغ گیاه به *AAPT1* واگذار می‌نماید و یا آنکه اساساً آنزیم‌های رمزگذاری شده توسط این دو ایزوفرم در مرحله بلوغ گیاه نقش جدی در نمو ندارند. البته اثبات این استنتاج‌ها نیاز به مطالعه سه‌گانه *aapt1*، *aapt2* و جهش‌یافته دوگانه[3] *aapt1* و*aapt2* دارد. Yu et al. (2015) در بررسی بروز ایزوفرم‌های *AAPT1* و *AAPT2* نشان دادند که *AAPT2* در بذر بروز بیش‌تری از *AAPT1* دارد، در حالی‌که میزان بروز *AAPT1* در برگ بیش از *AAPT2* است. این گزارش شاید بتواند مشاهدات و استنتاج ما مبنی بر نقش بیشتر *AAPT2* در مراحل آغازین رشد را به‌واسطه بروز بیش‌تر در بذر و مراحل جنینی گیاه را توجیه نماید.

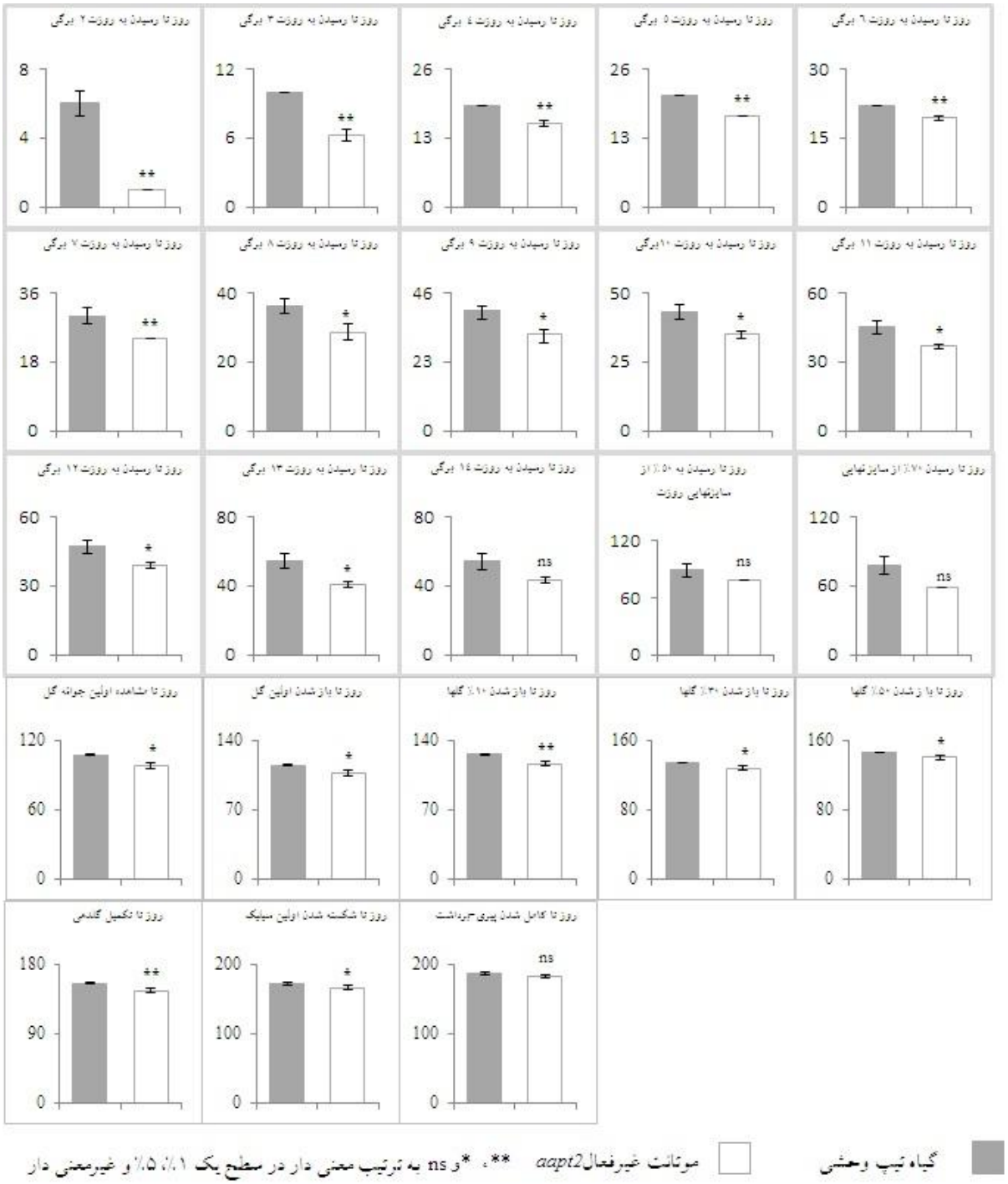
[1] Relative water content

[2] Redundant

[3] Double mutant

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]

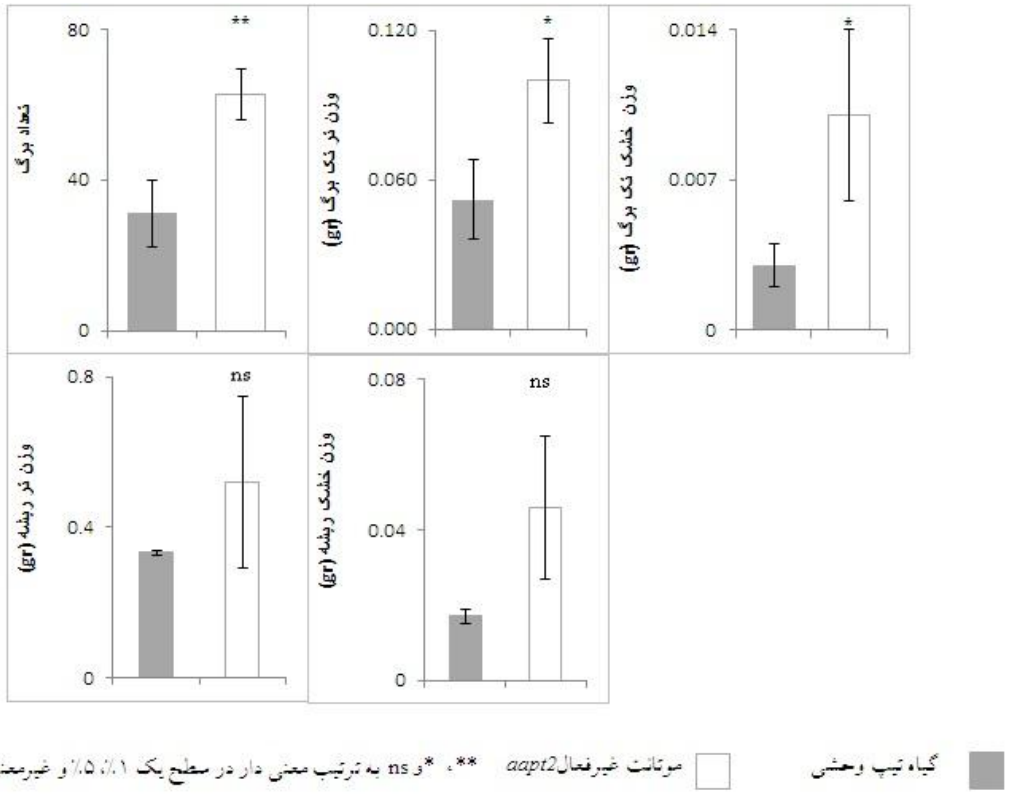


شکل ۸ – مقایسه لاین *aapt2* و گیاهان تیپ وحشی از نظر صفات فنولوژیک

نتایج حاصل از آزمون t جفت نشده برای صفات فیزیولوژی (شکل۹) نشان داد که تیپ وحشی به‌صورت بسیار معنی‌داری پتانسیل اسمزی منفی‌تری در مقایسه با *aapt2* دارد. این بدان معنی است که گیاهان تیپ وحشی قابلیت جذب آب بهتری نسبت به *aapt2* دارند. اما در شرایطی که هیچ گونه تنش رطوبتی وجود نداشته و به تبع آن آب کافی در اختیار گیاهان قرار دارد تفاوتی در درصد محتوای نسبی آب *aapt2* و تیپ وحشی مشاهده نشده است. منفی‌تر بودن معنی دار مقدار پتانسیل اسمزی تیپ وحشی در مقایسه با *aapt2* نشان دهنده آن است که مقدار املاح در عصاره برگ‌های تیپ وحشی در مقایسه با این لاین بیشتر شده

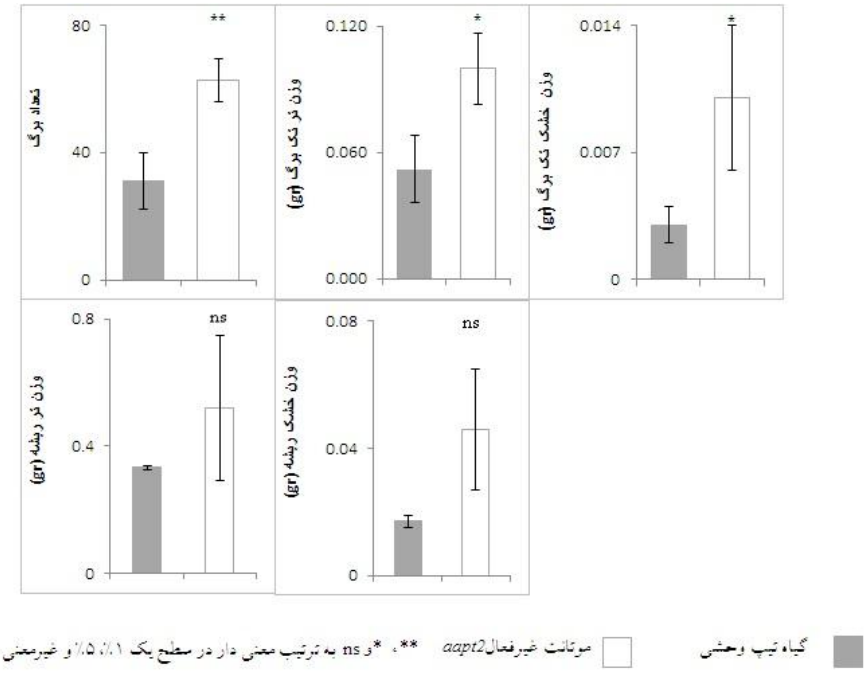
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]

است. با توجه به نقش حیاتی آنزیم *AAPT2* در مسیر سنتز فسفاتیدیل‌کولین، غیر فعال کردن ایزوفرم *AAPT2* احتمالاً باعث شده‌است مسیر به سمت کمتر تولید شدن کولین و شاید گلایسین بتائین جهت‌گیری کرده باشد. عدم تغییر معنی‌دار در مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا (میزان مالون دی آلدهید) در مقایسه تیپ وحشی و *aapt2* مشاهده شد که نشان می‌دهد احتمالاً ژن *AAPT* و یا حداقل ایزوفرم *AAPT2* در این فرآیند نقشی ندارد، اگرچه این مشاهده می‌تواند با تفسیر کاهش احتمالی مقدار گلایسین بتائین هم‌خوان نباشد. برای بررسی این تفاسیر اندازه‌گیری مقادیر کولین و گلایسین بتائین در *aapt2* و تیپ وحشی توصیه می‌شود. ویژگی فیزیولوژیک دیگری که بین *aapt2* و تیپ وحشی تفاوت بسیار معنی‌دار نشان داد درصد نفوذپذیری نسبی غشا بود. غشا در برگ‌های *aapt2* نسبت به تیپ وحشی نفوذپذیری بیش‌تری نشان داد. این مشاهده نیز با توجه به نقش آنزیم رمزگذاری شده توسط ژن *AAPT* در سنتز فسفاتیدیل‌کولین قابل توجیه است. به‌نظر می‌رسد احتمالاً بی‌فعالیتی ژن *AAPT2* در غشا تغییراتی ایجاد کرده که این تغییرات به نفوذپذیری بیشتر غشا کمک کرده است. این رخداد احتمالاً از طریق تغییر در فسفاتیدیل‌کولین رخ داده است که نیازمند بررسی جداگانه‌ای است. سایر صفات فیزیولوژیک مورد بررسی شامل میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها، مقاومت روزنه‌ای و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II تفاوتی را بین *aapt2* و تیپ وحشی نشان ندادند که با توجه به مسیری که ژن *AAPT* در آن دخالت دارد قابل پیش‌بینی بود. مقایسه برخی از ویژگی‌های مورفولوژی بین *aapt2* و تیپ وحشی در شکل ۱۰ نشان داده شده‌است. *aapt2* و تیپ وحشی برای تعداد برگ تفاوت بسیار معنی‌دار و برای میانگین وزن تر و وزن خشک تک برگ تفاوت معنی‌دار داشتند.



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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]



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

این در حالی است که وزن تر و وزن خشک ریشه بین *aapt2* و تیپ وحشی تفاوتی نشان نداد. تاثیر معنی‌دار بی فعالیت کردن ژن *AAPT2* برای صفات مرتبط با مورفولوژی برگ نشان می‌دهد که ایزوفرم مورد بررسی برای این صفت نقش حیاتی داشته و احتمالاً ایزوفرم دیگر نتوانسته است نقش پروتئین رمزگذاری شده توسط ایزوفرم *AAPT2* را در برگ جبران کند. *aapt2* و تیپ وحشی برای صفت اندازه‌گیری شده وزن ریشه تفاوت معنی‌داری نداشتند. اگر چه صفات مرتبط با ریشه و نقش احتمالی این ژن در معماری ریشه نیازمند مطالعه جداگانه‌ای است اما ممکن است با توجه به اهمیت مسیری که ژن *AAPT* در آن دخالت دارد بتوان گفت ایزوفرم *AAPT1* در وزن ریشه نقش بیشتری داشته است. برای بررسی این استنتاج‌ها نیز نیازمند مطالعه سه‌گانه *aapt1*، *aapt2*، و جهش‌یافته دوگانه *aapt1* و *aapt2* هستیم.

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد ایزوفرم‌های *AAPT1* و *AAPT2* هم‌عملکرد نیستند و ایزوفرم *AAPT2* در فنولوژی، فیزیولوژی و مورفولوژی گیاه نقش دارد. با توجه به نتایج این آزمایش و نیز مسیری که ژن *AAPT* در آن نقش دارد (شکل ۱) به‌نظر می‌رسد مطالعه نقش ایزوفرم *AAPT2* در تنش‌های غیر زیستی در آرابیدوپسیس دارای اهمیت است.

منابع

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

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

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth stage–based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. The Plant Cell 13: 1499-1510.

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

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.

Gibellini F, Smith TK (2010) The Kennedy pathway de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. IUBMB life 62: 414-428.

Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A (2006) A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation. Plant Methods 2: 19.

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transaction 603: 591-592.

Liu Y, Wang G, Wang X (2015) Role of aminoalcoholphosphotransferases 1 and 2 in phospholipid homeostasis in Arabidopsis. The Plant Cell 27: 1512-1528.

Mou Z, Wang X, Fu Z, Dai Y, Han C, Ouyang J, Bao F, Hu Y, Li J (2002) Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in Arabidopsis. The Plant Cell 14: 2031-2043.

Nuccio ML, Russell BL, Nolte KD, Rathinasabapathi B, Gage DA, Hanson AD (1998) The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase.The Plant Journal 16: 487-496.

Reski R (1998) Physcomitrella and Arabidopsis: the David and Goliath of reverse genetics.Trends in Plant Science 3: 209-210.

Ritchie SW, Nguyen HT, Holaday AS (1990) Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop science 30: 105-111.

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

Tang L, Kim MD, Yang KS, Kwon SY, Kim SH, Kim JS , Yun DJ, Kwak SS, Lee HS (2008) Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. Transgenic Research 17: 705-715.

Testerink C, Munnik T (2011) Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. Journal of Experimental Botany 62: 2349-2361.

Wang Y, Nii N (2000) Changes in chlorophyll, ribulose bisphosphate carboxylase- oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in Amaranthus tricolor leaves during salt stress. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 75: 623-627.

Weigel D, Glazebrook J (2002) Arabidopsis: a laboratory manual. CSHL Press.

Zangishei Z, Salari H (2015) Monitoring the Expression Pattern of Genes encoding S-adenosyl- L-methionine:phosphoethanolamine N-methyltransferase (PEAMT) enzyme in Arabidopsis under Drought Stress. Journal of Cellular and Molecular Researches 28: 539-550. (In farsi).

Zhang J, Nguyen HT, Blum A (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. Journal of Experimental Botany 50: 291-302.

Zhao Y, Aspinall D, Paleg LG (1992) Protection of membrane integrity in Medicago sativa L. by glycinebetaine against the effects of freezing. Journal of Plant Physiology 140: 541-543.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.5.1]