ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹
صفحه ۷۷-۶۹

مقایسه‌ی رایانه‌ای دومین ایزوفرم رمزکننده آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکوئلی گیاهی جدا شده از یک گیاه هالوفیت با همتای آن در گندم

عباس عالم‌زاده*[1]

۱- استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alemzadeh@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۹)

چکیده

طی این تحقیق ژن رمزکننده یک آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکوئلی به عنوان دومین ایزوفرم این خانواده ژنی از گیاه هالوفیت *Zostera marina* (seagrass) جدا گردید و توالی آن با استفاده از نرم‌افزارهای رایانه‌ای با ژن همتای آن در گندم به عنوان یک گیاه غیر متحمل زراعی مورد مقایسه قرار گرفت. با استفاده از روش RACE توالی کامل ناحیه رمزکننده این ژن جداسازی گردید. ناحیه رمزکننده این ایزوفرم ۱۶۲۳ جفت باز است و یک پروتئین ۵۴۰ اسید آمینه‌ای را رمز می‌کند که دو اسید آمینه از پروتیین رمز کننده توسط اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه بلندتر است. ناحیه رمز کننده این ژن ۱۸ جفت باز از ناحیه رمز کننده ژن همتای آن در گندم کوتاه‌تر است. با مقایسه توالی اسیدآمینه‌ای پروتیین رمز کننده توسط این ژن با سایر آنتی‌پورترهای گیاهی مشخص گردید که این پروتیین بیشترین شباهت را با اولین ایزوفرم جدا شده از همین گیاه دارد و فاصله فیلوژنتیکی آن با پروتیین رمز کننده توسط ژن همتای آن در گندم نسبتا زیاد می‌باشد. داده‌ها نشان دادند که پروتیین‌های رمز کننده توسط این ایزوفرم و اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه نسبت به پروتیین رمز کننده توسط ایزوفرم جدا شده از گندم درصد بیشتری ترئونین، تیروزین و سرین دارند اما میزان سیستئین بین این ایزوفرم‌ها تفاوت معنی‌داری ندارد. به نظر می‌رسد برهمکنش این آنتی‌پورتر با سایر پروتیین‌ها در گیاه هالوفیت *Z. marina* بیشتر از یک گیاه معمولی مثل گندم باشد.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌پورتر واکوئلی،
بیوانفورماتیک،
جداسازی ژن،
گندم،
Zostera marina

مقدمه

امروزه تقریبا در تمامی نقاط کره زمین تنش شوری سیستم تولیدات گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و سبب کاهش عملکرد گیاهان می‌شود (۱۰، ۱۶). آثار عمده ناشی از شوری در گیاهان بدلیل افزایش غلظت یون‌های سمی در گیاه و ایجاد عدم تعادل یونی همراه با تنش کم آبی در گیاه است (۳). سدیم یکی از یون‌هایی است که با افزایش غلظت آن در سیتوپلاسم گیاهان تحت تنش شوری موجب اختلال در فرآیندهای بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی سلول و در نتیجه گیاه می‌شود (۴، ۱۶). در حقیقت افزایش یون سدیم سبب اختلال در جذب و عمل یون پتاسیم و کاهش نسبت Na^+/K^+ می‌شود که این موضوع اکثر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]

فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۸، ۱۲، ۱۷). بنابراین جهت تحمل تنش شوری، ضروری است گیاه بتواند غلظت یون سدیم را در سیتوپلاسم پایین نگه دارد.

در اثر فعالیت آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکوئلی در گیاهان، یون سدیم به درون واکوئل فرستاده می‌شود و بدین وسیله از آثار مخرب آن بر سیتوزول و آنزیم‌های موجود در آن ممانعت به عمل می‌آید. تحت شرایط تنش شوری، بیان ژن رمز کننده آنتی‌پورترهای واکوئلی افزایش می‌یابد که نشان از اهمیت این پروتئین در مکانیسم‌های تحمل تنش دارد (۷، ۱٤، ۱۵). با تحقیقات انجام شده در گیاهان مشخص گردیده است که آنتی‌پورترهای واکوئلی توسط یک خانواده چند ژنی رمز می‌شوند. برای مثال در ذرت و آریبدوپسیس به ترتیب پنج و شش ایزوفرم برای این ژن شناسایی شده است.

گزارش‌های متعددی دال بر اهمیت آنتی‌پورترهای واکئولی در تحمل تنش شوری وجود دارد که در این میان ژن‌های رمز کننده این پروتئین در گیاهان هالوفیت جایگاه ویژه‌ای دارند (۱۰، ۱۹، ۲۰). در حقیقت گیاهان هالوفیت قادر هستند در شرایط تنش با کارایی بیشتری یون‌های سدیم را از سیتوزول خارج کنند (۱۰). حال سوال مطرح شده این است که آیا ساختمان آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی در گیاهان هالوفیت با گیاهان معمولی فرق می‌کند و این موضوع سبب افزایش کارایی آن‌ها تحت شرایط تنش می‌شود و یا اینکه ساختار این آنتی‌پورترها در گیاهان هالوفیت به گونه‌ای است که با برهمکنش با سایر عوامل، ساختمان و عمل خود را تحت شرایط تنش حفاظت می‌کنند؟ با بررسی و تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی این ژن‌ها و توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین‌های رمز کننده توسط آنها و مقایسه آنها در گیاهان هالوفیت و معمولی می‌توان به درک بیشتری نسبت به توانائی‌های این آنتی‌پورترها در مکانیسم‌های تحمل دست یافت.

گیاه seagrass با نام علمی *Zostera marina* یک گیاه تک لپه‌ای دریائی است که قادر است در شوری ۳ –۵ درصد آب دریا به خوبی رشد نموده و چرخه رشد خود را کامل کند (۱۱، ۱۸). با جداسازی ژن‌هایی که محصول آن‌ها در تحمل به شرایط تنش نقش دارند از این گیاه و مقایسه توالی و ساختار پروتیین‌های رمز کننده توسط آن‌ها با توالی ایزوفرم‌های گیاهان معمولی می‌توان به تفاوت‌ها و شباهت‌های موجود پی برد و به بسیاری از سوالات در این زمینه پاسخ داد.

در این مقاله نحوه جداسازی یک ایزوفرم جدید رمز کننده آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی از گیاه seagrass و نتایج تجزیه و تحلیل رایانه‌ای توالی اسیدآمینه پروتئین رمز شده توسط آن گزارش گردیده است. توالی اسید آمینه‌ای این پروتیین با پروتیین‌های رمز شده توسط اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه و TaNHX۱، ایزوفرم جدا شده از گندم، توسط برنامه‌های رایانه‌ای مورد مقایسه قرار گرفته و رابطه فیلوژنتیکی آن با سایر آنتی‌پورترهای گیاهی تعیین گردیده است.

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

با استفاده از برنامه ClastalW (http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html) توالی آنتی‌پورترهای واکوئلی گیاهان موجود در بانک ژن هم‌ردیف گردیدند. نواحی حفاظت شده در ژن‌های مذکور مشخص گردید و بر اساس آن یک جفت آغازگر هرز طراحی گردید. DNA ژنومی به روش سقایی معروف و همکاران (۱۹۸٤) از برگ‌ها استخراج گردیده و به ترتیب با استفاده از فنل، فنل: کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل و کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل خالص گردید و توسط اتانل مطلق رسوب داده شد. عمل تکثیر با استفاده از آغازگرهای هرز و DNA ژنومی به عنوان الگو (در حجم ۵۰ میکرولیتر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۱۰ mM تریس، ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۱/۵ mM کلرید منیزیم، ۲۰۰ µM از هر یک از dNTP، ۰/۲ µM از هر کدام از آغازگرها، ۱ واحد آنزیم دی‌انآ پلیمراز و ۱ µM از DNA ژنومی) تحت چرخه حرارتی ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ٦۰ ثانیه انجام شد. ۳۰ بار این چرخه تکرار گردید و بعد از آن قطعات برای تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در۷۲ °C قرار داده شدند.

قطعه تکثیر شده در مرحله قبل، از روی ژل جدا گردید، در ناقل T easy همسانه‌سازی و سپس توالی‌یابی گردید. با تعیین توالی

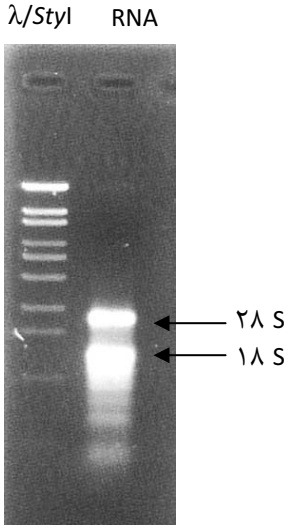
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]

قطعه فوق مشخص گردید که این قطعه مربوط به یک آنتی‌پورتر واکئولی می‌باشد. با استفاده از توالی این قطعه یک جفت آغازگر اختصاصی جهت انجام عمل RACE طراحی گردید و با استفاده از کیت (GeneRacer^{TM} Kit, invitrogene) نواحی ′۳ و ′۵ ژن تکثیر و توالی‌یابی گردید.

استخراج RNA و تهیه cDNAs

با استفاده از روش لیتیم کلرید تغییر یافته (۱) RNA کل از برگ‌های گیاه seagrass استخراج و به ترتیب با استفاده فنل، فنل: کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل و کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل خالص گردید و توسط اتانل مطلق رسوب داده شد. به منظور تعیین کیفیت RNA استخراج شده، ۳ میکرولیتر از آن روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید (شکل۱). با استفاده از کیت ReverTra Ace (Toyobo, Japan)، از روی RNA استخراج شده cDNAs تهیه گردید. با استفاده آغازگرهای اختصاصی که برای ناحیه بالا دست و پایین دست ژن طراحی شده بود ناحیه رمز کننده ژن از cDNAs جداسازی و توالی‌یابی گردید. ناحیه رمز کننده ژن به درون ناقل مناسب الحاق و سپس به درون باکتری *Escherichia coli* سویه JM109 منتقل گردید.



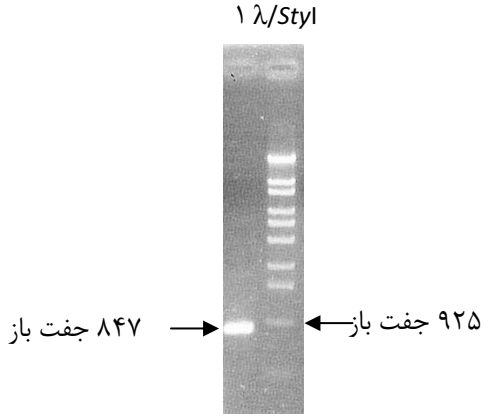
شکل۱- بررسی کیفیت آرانای استخراج شده از برگ *Z. marina* روی ژل آگارز یک درصد

نرم‌افزارهای رایانه‌ای مورد استفاده

با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی National Center for Biotechnology Information (NCBI)، DNA Data Bank of Japan (DDBJ) و ExPASy و نرم‌افزارهای موجود در آنها توالی نوکلئوتیدی ژن جداسازی شده و پروتیین رمز شده توسط آن با سایر توالی‌ها به طور عام و با توالی ژن همتای آن در گندم به طور خاص مقایسه و مورد تجزیه و تحلیل رایانه‌ای قرار گرفت.

نتایج و بحث

با استفاده از آغازگرهای هرز طراحی شده و DNA ژنومی گیاه *Z. marina* به عنوان الگو طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یک قطعه ۸۴۷ جفت بازی تکثیر گردید (شکل۲).

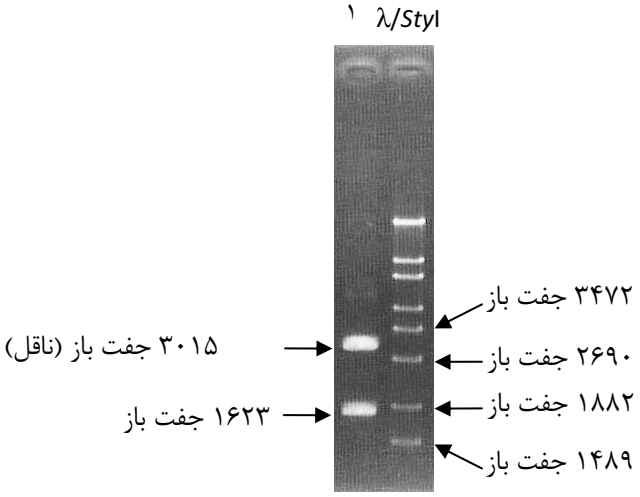


شکل۲- تکثیر یک قطعه ۸۴۷ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای هرز از درون ژنوم گیاه *Z. marina*

با توالی‌یابی این قطعه مشخص گردید که توالی آن مربوط به ژن مورد نظر می‌باشد. بر اساس توالی مذکور دو آغازگر اختصاصی طراحی گردید. با استفاده از آغازگرهای پیش‌رو و ′۳ کیت RACE انتهای ′۳ تکثیر گردید و با استفاده ازآغازگرهای پس‌رو و ′۵ کیت مذکور انتهای ′۵ ژن مورد نظر تکثیر گردید. با توالی‌یابی دو قطعه‌ای تکثیر شده مشخص گردید که آنها مربوط به ژن مورد نظر می‌باشند. با طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه بالادست رمز شروع و پایین‌دست رمز پایان کل ناحیه رمز کننده ژن از درون cDNAs تهیه شده از RNA استخراج شده از برگ جداسازی و در درون ناقل T Easy الحاق و به درون باکتری کلی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]

باسیل سویهJM109 منتقل گردید. با هضم آنزیمی، همسانه‌های مثبت حاوی DNA نوترکیب مشخص و انتخاب گردیدند. این همسانه‌ها حاوی ناحیه رمز کننده ژن بودند (شکل۳).



شکل۳- ناحیه رمز کننده دومین ایزوفرم به طول ۱۶۲۳ جفت باز که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از cDNAs تهیه شده از RNA استخراج شده از برگ *Z marina* تکثیر شده و در ناقل T Easy الحاق یافته است.

با توالی‌یابی قطعه همسانه‌سازی شده مشخص گردید این ایزوفرم دارای یک ناحیه رمز کننده ۱۶۲۳ جفت بازی می‌باشد (شکل٤) که یک پروتئین ٥٤٠ اسید آمینه‌ای را رمز می‌کند. ناحیه رمز کننده این ایزوفرم و پروتیین رمز شده توسط آن به ترتیب ٦ جفت باز و ۲ اسید آمینه بلندتر از اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه است.

توالی ژن رمز کننده آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی جدا شده از گندم به نام TaNHX۱ به شماره دسترسی AY۰٤۰۲٤٥ از سایت NCBI گرفته شد و با توالی ایزوفرم جدید مقایسه گردید. طول ناحیه رمز کننده *TaNHX۱* ۱٦٤۱ جفت باز است و یک پروتیین ٥٤٦ اسید آمینه‌ای را رمز می‌کند که ٦ اسید آمینه بلندتر از ایزوفرم جدید جدا شده از گیاه *Z. marina* می‌باشد.

با استفاده از برنامه ClustalW توالی اسیدآمینه‌ای آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی در گیاهان همردیف شدند و بر اساس آن با استفاده از برنامه TreeView 1.66 نمودار فیلوژنتیک رسم گردید (شکل۵). بر اساس این نمودار مشخص گردید که پروتیین رمز شده توسط ایزوفرم جدید از میان آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی گیاهی بیشترین قرابت را با پروتیین رمز شده توسط اولین ایزوفرم جدا شده از همین گیاه دارد (شکل۵). این موضوع نشان دهنده این است که به احتمال زیاد، ژن‌های رمز کننده این دو پروتیین در ابتدا یکی بوده‌اند اما طی مسیر تکاملی در اثر مضاعف شدن تبدیل به دو ایزوفرم مختلف در دو ناحیه ژنوم شده‌اند. میزان تشابه این دو پروتیین با پروتیین رمز شده توسط *TaNHX۱* چندان زیاد نیست و بر اساس دندروگرام ترسیم شده در دو دسته جدا از هم قرار می‌گیرند.

با توجه به اینکه فسفریله شدن سه اسیدآمینه ترئونین (T)، تیروزین (Y) و سرین (S) در پروتیین‌ها نقش مهمی در فعالیت پروتیین‌ها و برهمکنش آنها با پروتیین‌های تنظیمی از قبیل ١٤-۳-۳ دارند (۲، ٦)، احتمال فسفریله شدن این سه اسیدآمینه در پروتیین‌های رمز شده توسط ژن مزبور و TaNHX۱ با استفاده از برنامه NetPhos مشخص گردید. بررسی رایانه‌ای نشان داد که در ایزوفرم جدید و TaNHX۱ به ترتیب تیروزین موقعیت ۲۸۸ و ۲۸۹ از ابتدای آمینی به احتمال حدود ٦٦ درصد فسفریله می‌شود. این تیروزین در هر دو پروتیین در توالی حفاظت شده‌ی $V_{۸۷}M_{۱۰}..S_{۱۰}..H_{۱۰}..\underline{Y}_{۸۷}T_{۱۰}..W_{۱۰}..H_{۱۰}..N_{۱۰}..Y_{۱۰}..T_{۱۰}..$ که قبلا برای سایر آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی در گیاهان در موقعیت ۲۸٦ تا ۲۹۲ از ابتدای آمینی گزارش شده است، قرار گرفته است (شکل ٦ الف). قبلا مشخص شده است که در آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی در گیاهان دو اسید آمینه ترئونین پشت سرهم در موقعیت ۲۹۸ تا ۳۰۲ از ابتدای آمینی در توالی حفاظت شده‌ی $V_{۱۰}..T_{۱۰}..E_{۱۰}..S_{۹٦}S_{۱۰}..R_{۱۰}..V_{٦٥}\underline{T}_{۱۰}..\underline{T}_{۹۱}K_{۸۷}H_{۹٦}A_{٥۷}F_{۹٦}A_{۹٦}$ قرار دارند که با احتمال نزدیک ۹٥ درصد فسفریله می‌گردند. این دو اسید آمینه ترئونین در ایزوفرم جدید در موقعیت۳۰۰ و ۳۰۱ از ابتدای آمینی در موتیف VTESSRITTKHTFA و در TaNHX۱ در موقعیت ۳۰۱ و ۳۰۲ از ابتدای آمینی در موتیف VTESSRVTTKHTFA قرار دارند که در هر دو پروتیین به احتمال بیش از ۹۰ درصد فسفریله می‌شوند (شکل ٦ ب). یک اسید آمینه سرین در موقعیت ۱۳ تا ۲۱ اسیدآمینه از انتهای کربوکسیلی اکثر آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی گیاهی در توالی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]

حفاظت شده‌ی $F_{۸۳}G_{۸۴}G_{۸۵}R_{۸۶}G_{۱۰۰}..F_{۸۳}V_{۷۸}P_{۸۳}F_{۹۱}V_{۸۳}P_{۹۶}G_{۸۳}\underline{S}_{۱۰۰}..P_{۱۰۰}$ قرار دارد که با احتمال حدود ۹۵ درصد فسفریله می‌گردد. این اسید آمینه سرین در ایزوفرم جدید در موقعیت ۱۱ از انتهای کربوکسیلی در موتیف FGGRGFVPFIPGSP و در TaNHX۱ در موقعیت ۲۳ از انتهای کربوکسیلی در موتیف FGGRGFVPFVPGSP وجود دارد (شکل ٦ ج). به احتمال زیاد اسیدآمینه‌های فسفریله شده مذکور نقش بسزایی در برهمکنش این پروتیین با سایر پروتیین‌ها و متعاقب آن کنترل فعالیت پروتیین مورد نظر دارد. چنین نقشی در مورد سایر پروتیین‌ها نیز مشاهده شده است برای مثال در پمپ‌های پروتونی غشایی طی تحقیقات مختلف مشخص شده است یک ترئونین نزدیک به انتهای کربوکسیلی نقش بسزایی در تنظیم فعالیت این پمپ‌ها دارد (٦). در این زمینه نیز لازم است تا با انجام تحقیقات بیشتر نقش این اسید آمینه‌های فسفریله شده در تنظیم فعالیت آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی مشخص گردد.

با استفاده از سایت DOS مشخص گردید بر اساس شاخص کیت و دولیت (۹) تعداد دومین‌های درون غشایی برای پروتیین رمز شده توسط ایزوفرم جدید احتمالا ۹ عدد و برای پروتیین رمز شده توسط *TaNHX۱* احتمالا ۱۰ عدد می‌باشد (شکل ۷). تعداد دومین‌های درون غشایی تخمین زده برای سایر آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی گیاهی نیز در همین حدود است.

میزان اسید آمینه‌های سرین، ترئونین و تیروزین در پروتیین رمز شده توسط ایزوفرم جدید به ترتیب ۱۰، ۷/٤ و ۲/٤ درصد است در حالیکه در TaNHX۱ به ترتیب برابر ۷/۹، ٦/٦ و ۲/۲ است (جدول۱). با توجه به اینکه این اسید آمینه‌ها فسفریله می‌شوند و پس از فسفریله شدن در برهمکنش با سایر پروتیین‌ها دخالت دارند از اهمیت خاصی برخوردار هستند (۲، ٦). بررسی توالی دو پروتیین رمز شده توسط این دو ایزوفرم نشان می‌دهد که درصد این سه اسید آمینه در ایزوفرم جدید بیشتر از گندم است (جدول۱). این می‌تواند بدین مفهوم باشد که پروتیین رمز شده توسط ایزوفرم جدید برهمکنش بیشتری با سایر پروتیین‌ها دارد که بعضی از این پروتیین‌ها ممکن است نقش حفاظت کننده از آنتی‌پورتر رمز شده در برابر غلظت‌های بالای نمک را به عهده داشته باشند و بدین طریق در افزایش تحمل گیاه هالوفیت در برابر تنش شوری دخالت داشته باشند. موضوع دیگری که سبب قوت بیشتر این احتمال می‌شود بالا بودن درصد این سه اسید آمینه در پروتیین رمز شده توسط اولین ایزوفرم جدا شده از این گیاه هالوفیت در مقایسه با ایزوفرم گندم می‌باشد. میزان اسید آمینه‌های سرین، ترئونین و تیروزین در پروتیین رمز شده توسط اولین ایزوفرم به ترتیب برابر ۹/۵، ۷/٦ و ۲/٤ است (جدول۱).

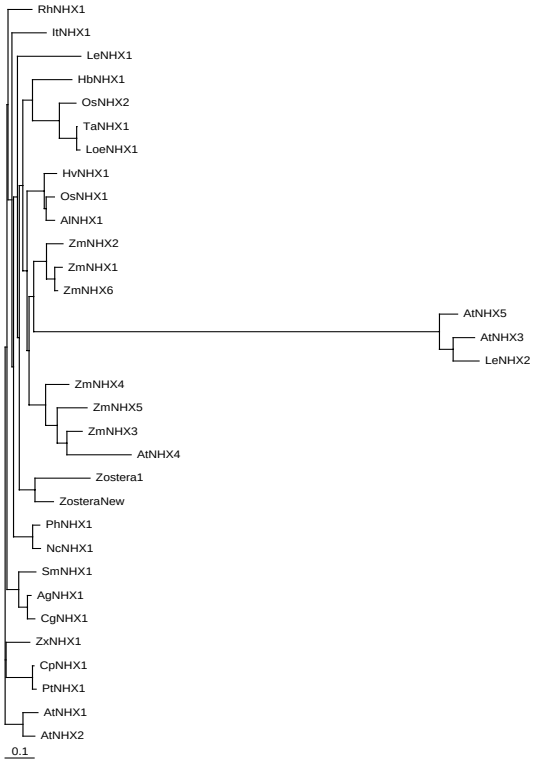
تحقیقات نشان داده است که ایجاد پیوندهای دی‌سولفید بین اسید آمینه‌های سیستئین (Cys) در یک رشته پلی‌پپتیدی و تشکیل سیستین سبب افزایش مقاومت پروتیین به تنش‌های محیطی می‌شود (۵) اما به نظر می‌رسد که تشکیل چنین پیوندهایی در آنتی‌پورترهای واکئولی هالوفیت‌ها سبب استحکام و مقاومت آنها در برابر تنش شوری نمی‌شود زیرا میزان سیستئین در پروتیین‌های رمز شده توسط *TaNHX۱* و دو ایزوفرم جدا شده از گیاه هالوفیت تفاوت معنی‌داری ندارند (جدول۱).

با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که ساختمان اول آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی در گیاهان هالوفیت تفاوت مشخصی با گیاهان معمولی ندارد که سبب استحکام آن‌ها در برابر تنش شوری گردد، بلکه در گیاهان هالوفیت احتمالا پروتیین‌های خاصی وجود دارند که با برهمکنش با آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی از ساختمان آن‌ها در برابر تنش محافظت می‌کنند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]

ATGGATTTGGGTGTGATTACGGAGATGGCAAATCAAGTGACGGTCTCCACCTCCGACCATGCTTCGGTAT
CGTCGATAAGCTTGTTCTCGGCTCTTCTGTGCGGCTGCATTGTGATTGGTCATCTGTTGGAAGAGAACCG
ATGGGTCAACGAATCCATCACCGCACTTCTCATTGGGTTGGTTACCGGAGTTGTCATCCTTCTAACGACA
AAGGGAAAGAGTTCACATATTCTGGTGTTCAGTGAGGATCTGTTCTTCATATACTTACTACCTCCTATTA
TCTTCAACGCTGGGTTCCAAGTCAAGAAGAAGCAGTTTTTCAGAAATTTCATGACCATCACGTTATTTGG
CGCAGTCGGCACATTGATATCATTTTCAATTATTTCATTTGGCGCTATTATTCTGCTTAAAAATGGACGT
AGCCTCACTGATATCGGAGATTACCTAGCCACTGGAGCCATCTTTGCAGCTACAGATTCTGTATGCACTT
TACAGGTTCTTAATCAAGATGAGACTCCTCTGCTTTACAGTTTGGTGTTTGGAGAAGGTGTGGTCAATGA
TGCTACTTCAGTTGTGCTGTTCAATGCAATCCAGAACTTCGATCTTGTTCACATAGACGGCACTATTGCC
CTGAAATTTTTCGGAAACTTTCTCTATCTGTTTCTTGCTAGCACCGTTCTTGGTGTTGCAACTGGATTAT
TAAGTGCTTTCGTCATCAAGAAATTGTACTTCGGCAGGCATTCTACAGACCGTGAAGTTTCTTTAATGAT
GCTCATGGCCTACCTCTCCTACTTGCTGGCAGAGTTATTCTATCTGAGTGGTATACTGACTGTGTTCTTC
TGTGGGATTGTAATGTCTCACTACACATGGCACAATGTAACAGAGAGTTCAAGAATAACAACCAAGCATA
CTTTCGCAACACTGTCATTTATCGCTGAAATCTTCATCTTTCTGTATGTTGGGATGGATGCATTGGATAT
CGACAAGTGGAGATTCATCAGTGATAGTCCAGGAAAATCGATCGGAATAAGCTCCATTCTGCTGGGATTG
GTTATGGTAGGAAGGGCAGCATTCGTGTTTCCACTGTCATTTCTGTCCAACTTGTCCAAGAAATTCTCAC
ATGAAAAAATTGAATTCAAGCAGCAGGTTACAATATGGTGGGCGGGACTAATGAGAGGTGCAGTATCAAT
GGCACTTGCTTACAATCAGTTTACCAGCGCAGGTCATACGGAATTACCCGCAAATGCAATTATGATAACC
AGTACCATAACAGTTGTTCTTTTCAGCACAAGTGTATTTGGATTGCTGACTAAACCCTTGGTATTTCTTT
TACTTCCTCACAAGGGATTAAAGCAGCAGATGAGCAGTATTGATGACCCAACAAGTCCAAAATCATTTCT
AGCTGCACTCCTGGGGAGTGTGCATGGGTCTGAAATTGAAGAACCCACTAGTATTCCTCGACCGTCCAGT
CTACGTCTACTCGTCACTTCACCTACTCGCGCCGTGCATTACTATTGGCGCAAATTTGATGACGCAGTCA
TGAGACCTATGTTTGGTGGTAGAGGTTTTGTTCCATTTATTCCAGGATCACCAACAGAGGAACCAAGTGT
GCATCCATTTTAG

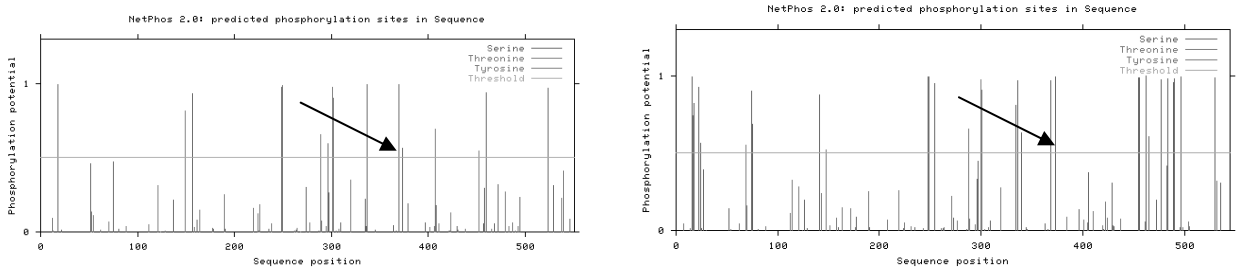
شکل٤- توالی ناحیه رمز شونده دومین ایزوفرم رمز کننده آنتی‌پورتر واکئولی از گیاه دریایی *Z. marina* که ١٦٢٣ جفت باز می‌باشد.



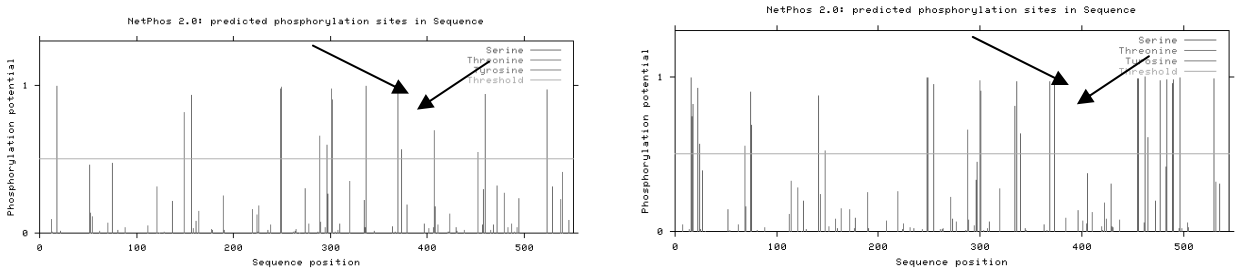
شکل٥- نمودار فیلوژنتیک حاصل از توالی آمینواسیدی ٣٢ آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واکئولی. AlNHX1 (*Aeluropus littoralis*)، AgNHX1 (*Atriplex gmelini*)، AtNHX1~5 (*Arabidopsis thaliana*)، CgNHX1 (*Chenopodium glaucum*)، CpNHX1 (*Citrus paradisi*)، HbNHX1 (*Hordeum brevisubulatum*)، HvNHX1 (*Hordeum vulgar*)، ItNHX1 (*Ipomoea tricolor*)، OsNHX1 و 2 (*Oriza sativa*)، PhNHX1 (*Nierembergia caerulea*)، NcNHX1 (*Lycopersicon esculentum*)، LeNHX1 و 2 (*Lophopyrum elongatum*)، LoeNHX1 (*Petunia hybrida*)، PtNHX1 (*Poncirus trifoliate*)، RhNHX1 (*Roza hybrida*)، SmNHX1 (*Suaeda maritima*)، TaNHX1 (*Triticum aestivum*)، ZmNHX1~6 (*Zea mays*)، Zoster 1 و ZosteraNew (*Z. marina*) و ZxNHX1 (*Zygophyllum xanthoxylum*).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]

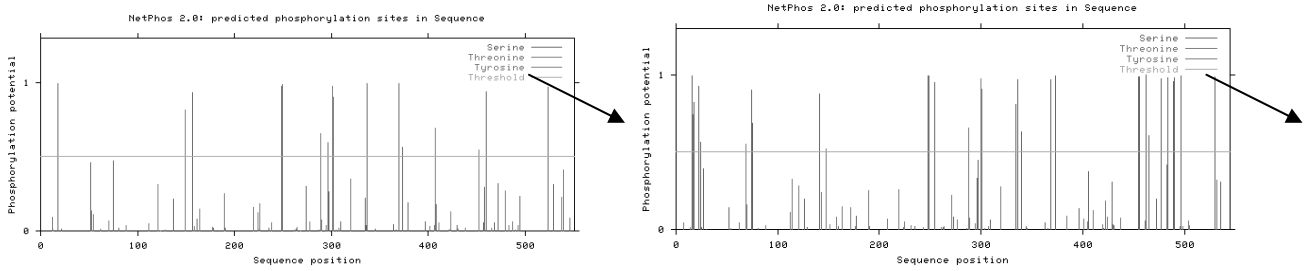
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]



الف) تیروزین موقعیت ۲۸۸ و ۲۸۹ به ترتیب در پروتیین رمز شده توسط ایزوفرم جدید (سمت راست) و TaNHX۱ (سمت چپ) در توالی حفاظت شده VMSHYTWHNYT که به احتمال ٦٦ درصد فسفریله می‌شود.



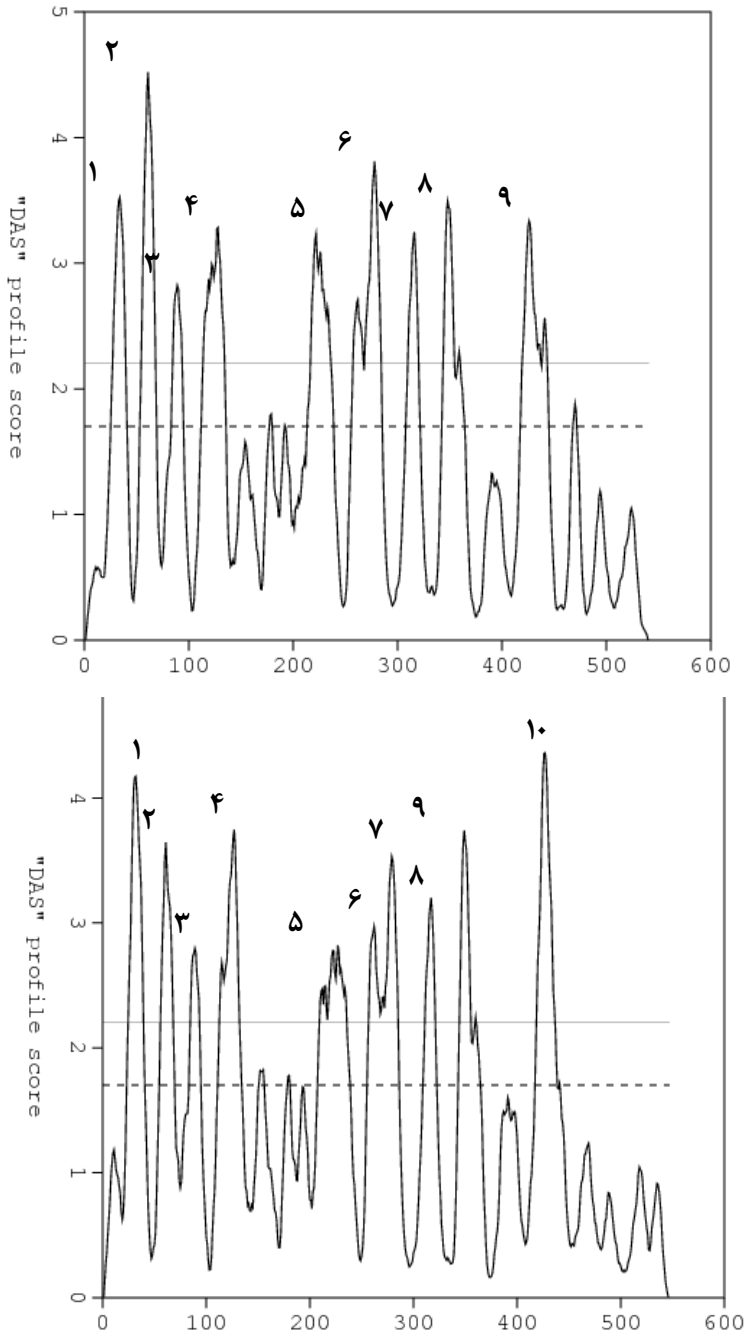
ب) دو ترئونین در پروتیین رمز شده توسط ایزوفرم جدید (سمت راست) در موقعیت‌های ۳۰۰ و ۳۰۱ در موتیف VTESSRITTKHTFA و TaNHX۱ (سمت چپ) در موقعیت ۳۰۱ و ۳۰۲ در موتیف VTESSRVTTKHTFA که به احتمال بیش از ۹۰ درصد فسفریله می‌شوند.



ج) سرین در موقعیت‌های ۱۱ از انتهای کربوکسیلی در پروتیین رمز شده توسط ایزوفرم جدید (سمت راست) در موتیف FGGRGFVPFIPGSP و در TaNHX۱ (سمت چپ) در موقعیت ۲۳ از انتهای کربوکسیلی در موتیف FGGRGFVPFVPGSP که به احتمال بیش از ۹۵ درصد فسفریله می‌شوند.

شکل٦- آسید آمینه‌های تیروزین (الف)، ترئونین (ب) و سرین (ج) در توالی‌های حفاظت شده که به احتمال زیاد فسفریله شده و با سایر پروتیین‌های تنظیمی برهمکنش دارند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]



شکل۷- نمودار هیدروپتی آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ واکئولی رمز شده توسط دومین ایزوفرم جدا شده از گیاه *Z. marina* (بالا) و *TaNHX1* (پایین) نواحی که احتمالا درون غشاء کشیده می‌شوند با شماره نشان داده شده‌اند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]

منابع

1. Alemzadeh A, Fujie M, Usami S and Yamda T (2005) Isolation of high-quality RNA from high-phenolic tissue of eelgrass (*Zostera marina* L.) by keeping temperature low. Plant Mol Bio Rep, 23: 421a-421l.

2. Bentem SF and Hirt H (2009) Protein tyrosine phosphorylation in plants: more abundant than expected? Trends Plant Sci, 14: 71-76.

3. Blumwald E, Aharon GS and Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. Biochim Biophys Acta, 1465: 140-151.

4. Cruwel MLH, Rauw VL, Loewen M and Abrams SR (2001) Effects of sodium chloride on plant cells; a ^{31}P and ^{23}Na NMR system to study salt tolerance. Plant Scie, 160: 785-794.

5. Cumming RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH and Schubert (2004) Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. J Biol Chem, 279: 21749-21758.

6. Fuglsang AT, Visconti S, Drumm K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen ON, Aducci P and Palmgren MG (1999) Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H^+-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr^{946}-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr^{947}. J Biol Chem, 274: 36774-36780.

7. Fukuda A, Nakamura A and Tanaka Y (1999) Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene *Oryza sativa*. Biochim Biophys Acta, 1446: 149-155.

8. Khan MA and Abdullah Z (2003) Salinity-sodicity induced changes in reproductive physiology of rice (*Oriza sativa*) under dense soil conditions. Environ Exp Bot, 49: 145-157.

9. Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol, 157: 105-132.

10. Parida AK and Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotox Environ Safe, 60: 324-349.

11. Plus M, Deslous-Paoli JM and Dagault F (2003) Seagrass (*Zostera marina* L.) bed recolonisation after anoxia-induced full mortality. Aquat Bot, 77: 121-134.

12. Rejili M, Vadel AM, Guetet A and Neffatti M (2007) Effect of NaCl on the growth and ionic balance K^+/H^+ of two populations of *Lotus certicus* (L.) (Papilionaceae). S Afr J Bot, 73: 623-631.

13. Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA and Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc Natl Acad Sci USA, 81: 8014-8018.

14. Sattosanto JB, Saranga Y and Blumwald E (2007) Impact of AtNHX1, a vacular Na^+/H^+ antiporter, upon gene expression during short- and long-term salt stress in *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biolog, pp. 18.

15. Shi H and Zhu JK (2002) Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. Plant Mol Biol, 50: 543-550.

16. Tester M and Davenport R (2003) Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Ann Bot, 91: 503-527.

17. Volkov V and Amtmann A (2006) The lungiella, a salt-tolerant relative of Arabidopsis thaliana, has specific root ion-channel features supporting K^+/Na^+ homeostasis under salinity stress. Plant J, 48: 342-353.

18. Ye CJ and Zhao KF (2003) Osmotically active compounds and their localization in the marine halophyte eelgrass. Biol. Plantarum, 46: 137-140.

19. Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM and Pardo JM (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response. Plant J, 30: 529-539.

20. Zhang HX, Hodson JN, Williams JP and Blumwald V (2005) Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. Proc Natl Acad Sci USA, 98: 12832-12836.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.7.2]
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-03-29]