

## تجزیه و تحلیل منابع EST در گندم، بونج، پنبه و فستوکا تحت تنش

### خشکی به منظور برسی بیان ژن و ژنومیکس عملکردی

پیوند حیدری<sup>\*</sup>، بهرام ملکی زنجانی<sup>۲</sup>، شادی حیدری<sup>۳</sup>

۱ و ۲- فارغ التحصیل کارشناس ارشد، استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، ایران

۳- فارغ التحصیل کارشناس ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: peyvand\_heiday@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۷- تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹)

### چکیده

تشخیص از مواد اصلی در تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود. این تحقیق به منظور شناسایی ژن‌های دخیل در به کمک تجزیه و تحلیل اطلاعات EST کتابخانه گیاهان گندم، بونج، پنبه و فستوکا انجام شد. اطلاعات اولیه چهار کتابخانه از بانک اطلاعاتی دانشگاه هاروارد جمع‌آوری شدند. در بررسی شباهت بین کتابخانه‌ها، همه توالی‌های EST با استفاده از نرم افزار EGassembler هم‌گذاری شدند. سپس همه کاتئیک‌ها به وسیله جستجوگر بلاست X توسط نرم افزار CLC Protein Workbench در مقابل پروتئین‌های غیرتکراری بانک ژن با  $\leq 1 \times 10^{-5}$  E-value تجزیه شدند. در شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها، نرم افزار IDEG6 مورد استفاده قرار گرفت. ژن‌های لیپید ترانسفراز، گلوتاتیون اس ترانسفراز، دهیدرین، متالوتیونین، فسفاتازها، پروتئین‌های فراوان در اوخر جنین زائی از جمله ژن‌های مهم دخیل در پاسخ به تنش خشکی در چهار کتابخانه بونج، گندم، پنبه و فستوکا محسوب می‌شوند. چهار کتابخانه در گروه‌های کارکردی فتوستتر، مسیر اکسایشی پتوژ فسفات، انتقال الکترون، دیواره سلولی، متabolیسم اسید آمینه، هورمون‌ها، اکسایش-کاهش، گروه کارکردی متفرق، متabolیسم کربوهیدرات، تنش، متabolیسم نوکلئوتید، متabolیسم ثانویه، پروتئین و علامت دهی اختلافات معنی‌دار داشتند که نشان دهنده این است که این چهار گیاه با بکار گیری گروه‌های کارکردی متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهد.

### واژه‌های کلیدی

گروه‌های کارکردی،  
ژنومیکس کارکردی،  
تشخیص،  
بیان ژن،  
.EST

### مقدمه

صفات چند ژنی همچون مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، به سختی قابل اصلاح هستند به خصوص زمانی که در ترکیب با هم باشند (Neerinckx and Leunissen 2005). ژنومیکس علم مطالعه ژنوم است. در مطالعات ژنومیکس تعداد بسیار زیادی ژن به طور همزمان با استفاده از ابزارهای خودکار مطالعه می‌شوند. ژنومیکس شامل تجزیه و تحلیل داده‌ها و اطلاعات ژنتیکی، بخصوص ژنوم موجودات است (Naghavi et al. 1388).

مرحله همگذاری، توالی‌های EST درون کانتیگ‌ها (شامل دو یا تعداد بیشتری EST) و سینگلتون‌ها (شامل تنها یک EST) قرار CLC می‌گیرند(Masoudi-Nejad et al. 2006). در نرم افزار protein workbench جستجوی بالاست X در مقابل پروتئین‌های protein workbench غیر تکراری<sup>۸</sup> انجام می‌شود. این نرم افزار برای حل مسائل علمی و تحقیقات آزمایشگاهی بر اساس اصول بیوشیمیایی بکار می‌رود. تجزیه‌ها با  $\leq 1 \times 10^{-5}$  E-value (که ارزش مورد انتظار یا احتمال هم‌دیفی‌های مختلف با امتیاز همارز نامیده می‌شود) انجام می‌شود که انتظار می‌رود در جستجوی پایگاه‌های اطلاعاتی به صورت شناسی رخ داده باشد. با مقدار E کمتر، احتمال معنی‌دار بودن امتیاز بالاتر می‌رود (McGinnis and Madden 2004). در بالاست X توالی DNA تقاضا ابتدا در شش چهارچوب خواندن ترجمه و سپس با یک توالی پروتئینی موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی مقایسه می‌شود(Skuse and Du 2008). برای شناسایی زنها با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها از خروجی نرم افزار CLCbio به عنوان ورودی نرم افزار IDEG6<sup>۹</sup> استفاده می‌شود. استفاده از آزمون کای دو جنرال برای کشف زن‌هایی با بیان متفاوت برای تشخیص مجموعه‌ای از زن‌های مشخص در دو یا چندین شرایط متفاوت برای مدیریت و سازماندهی مقدار زیادی اطلاعات ضروری است (Romualdi et al. 2003). گروه‌های کارکردی کاربردهای متفاوتی دارد که عبارتند از: تفسیر دستی زنوم، تفسیر کارکردی خودکار زن‌های پیش‌بینی شده، تجزیه داده‌های مطالعات زنومیکس بزرگ مقیاس و پروتئومیکس اطلاعاتی متنوعی وجود دارد، سایت موسسه ماکس پلانک (mapman) به صورت آنلاین، یکی از این پایگاه‌ها می‌باشد. برای آزمون تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کارکردی، خروجی نرم افزار mapman به عنوان ورودی نرم افزار IDEG6 استفاده می‌شود (Man et al. 2004). تنش‌های محیطی از قبیل تنش خشکی یکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی در بسیاری از نقاط دنیا به ویژه مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران محسوب

از کاربردهای اصلی زنومیکس می‌توان به تشخیص زن‌هایی که نقش کلیدی را در فرایندهای بیولوژیک ایفا می‌کنند و همچنین روشن کردن نقش بیولوژیک تعداد زیادی از زن‌هایی که عملکرد آن‌ها یا به طور ضعیفی شناخته شده و یا هنوز کاملاً ناشناخته‌اند، اشاره نمود (Lein et al. 2008). زنومیکس، اصلاح گیاهان را به شکل چشم‌گیری تغییر داده است و ما را قادر به دستیابی به فهم زنوتکنیکی وسیع، همراه با جزئیات عملکرد کلی گیاه می‌سازد (Neerincx and Leunissen 2005) به همراه تجزیه و تحلیل منابع EST نشان داده که زن‌های زیادی با عملکردهای متفاوت بوسیله تنش خشکی القاء می‌شوند (Shinozaki and Yamaguchi 2008) برای گندم و جو ایجاد شده که تجزیه و تحلیل آن‌ها موجب شناسایی زن‌های دخیل در فرآینده پاسخ به تنش خشکی شده است (varshney et al. 2008). تجزیه فرآیندهای پیچیده‌ای که مکانیسم‌های مقاومت را رقم می‌زنند، در بازدهی گیاهان زراعی نقش دارند (Neerincx and Leunissen 2005) دستاوردهای مبتنی بر زنومیکس دسترسی به آلل‌های مطلوبی که در مکان‌های زنی صفات کمی<sup>۱</sup> حضور دارند و سبب پاسخ به تنش خشکی می‌شوند را فراهم می‌کند (Tuberosa and Salvi 2006). این تجزیه‌ها می‌توانند با نرم افزارهای مخصوص روی مقادیر بسیار زیادی از داده‌های EST تولید و ذخیره شده در بانک‌های اطلاعاتی و پروژه‌های شاخص زن<sup>۲</sup> مانند وب سایت دانشگاه هاروارد<sup>۳</sup> صورت گیرند (Neerincx and Leunissen 2005) از نرم افزارهایی که در تجزیه EST‌ها بکار می‌رود می‌توان به mapman<sup>۴</sup>، CLC protein workbench<sup>۵</sup>، EGAssembler<sup>۶</sup>، IDEG6<sup>۷</sup> اشاره نمود. EGAssembler به منظور پالایش توالی‌های EST یک مرحله پیش پردازش انجام می‌دهد که این مرحله شامل پاکسازی توالی‌ها، پوشاندن تکرارها، پوشاندن ناقلهای پوشاندن توالی‌های اندامکی و سپس همگذاری<sup>۸</sup> توالی‌ها می‌باشد. در طی

<sup>1</sup> Quantitative trait loci (QTLs)<sup>2</sup> The gene index project<sup>3</sup> [Http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi](http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi)<sup>4</sup> [Http://egassembler.hgc.jp/](http://egassembler.hgc.jp/)<sup>5</sup> [Http://mapman.mpiimp-golm.mpg.de](http://mapman.mpiimp-golm.mpg.de)<sup>6</sup> [Http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/](http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/)<sup>7</sup> Assembly

شباهتی با پروتئین‌های شناخته شده موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی نداشتند که به عنوان ژن جدید معرفی شدند (Reddy et al. 2008) با وجود این که تشخیص و ارزیابی ژرم پلاسم‌های EST مقاوم به خشکی فرایند بسیار سخت و زمان‌گیر است روش EST یکی از موثرترین روش‌ها برای کشف ژن‌های کارکردی جدید از تمام ژنوم است (Chen et al. 2005). یکی از مؤثرترین راه‌های کاهش خسارت خشکی و اصلاح گیاهان در کشور می‌باشد. امروزه با بکارگیری روش‌های تجزیه و تحلیل EST انجام برنامه‌های تحقیقاتی گسترده با هدف اصلاح گیاهان مقاوم به تنش خشکی در گیاهان مهمن زراعی مانند گندم و برنج با سرعت و دقیق بیشتری امکان‌پذیر می‌باشد (Bausher et al. 2003). با تکمیل پژوهش‌های توالی‌بایی ژنوم در تعدادی از گیاهان، EST‌های فراوانی برای مطالعه سایر گیاهان فراهم شده است. چنانچه یک EST با یک ژن مشخص همانندی قابل قبولی داشته باشد عملکرد بالقوه مشابهی برای آن EST در نظر گرفته می‌شود. تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر EST‌ها با مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، موجب افزایش آگاهی مسیرهای بیوشیمیابی ژن‌های کنترل کننده مقاومت می‌شود. با گسترش اطلاعات EST‌ها در بانک‌های اطلاعاتی، امکان شناسایی و جداسازی ژن‌های کاندیدای مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی میسر می‌شود (Hide et al. 1999). در این پژوهش به منظور شناسایی و مقایسه دقیق ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی در چهار گیاه گندم، برنج، پنبه و فستوکا<sup>۱</sup> تجزیه EST‌های موجود در کتابخانه تحت تنش این چهار گیاه انجام شد.

## مواد و روش‌ها

اطلاعات اولیه چهار کتابخانه پنبه تحت تنش با ۱۰۷۲ EST، فستوکا تحت تنش با ۴۹۷۲ EST، کتابخانه برنج تحت تنش با ۵۵۰۴ EST و گندم تحت تنش با ۱۰۲۶ EST تجزیه و تحلیل شد. اطلاعات از بانک اطلاعاتی دانشگاه هاروارد<sup>۲</sup> جمع‌آوری شدند و توالی‌های EST در فرمت FASTA بود.

بيان ژن

<sup>۱</sup> [Http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi](http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi)

می‌شود. برنج<sup>۳</sup> و گندم<sup>۴</sup> مهم‌ترین غلاتی هستند که بطور وسیع در سیستم‌های متنوع اکولوژیکی کاشته می‌شود و تنش خشکی یکی از بزرگ‌ترین علت ناپایداری عملکرد این دو گیاه در مناطق مختلف کشت این دو محصول می‌باشد (Mostajeran and Rahimi-Eichi 2009). ژنومیکس عملکردی شناسایی مبانی ژنتیکی و مولکولی فرایندهای بیولوژیک در گیاهان را فراهم آورده است (Gorantla et al. 2005). موقیت در شناسایی ژن‌های دخیل در تنش خشکی موجب کمک به اصلاح ژنتیکی برای افزایش توانمندی گیاه در تولید محصول می‌باشد. تاکید اصلی روی شناسایی ژن‌های جدید پاسخ به تنش خشکی در گونه‌های مختلف و نقش آن‌ها در سازگاری است که به اصلاح تحمل به خشکی محصولات حساس کمک خواهد کرد و Reddy et al. 2008 بازده اقتصادی آن بخاطر هزینه بالای مرتبط با رشد پنبه بسیار مهم می‌باشد. بنابراین هر چند که پنبه گیاهی مقاوم به خشکی است برای تولید بالای محصول به آب کافی نیاز دارد، بنابراین تشخیص ژن‌های دخیل در مکانیسم مقابله با تنش خشکی از اهمیت زیادی برخوردار است (Pospisilova et al. 2000). گیاهان گونه فستوکا<sup>۵</sup> فستوکا<sup>۶</sup> یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای فصل سرما و گراس‌های چمنی مناطق معتدل هستند. علوفه‌های فصل سرما یا گونه‌های گراس‌های چمنی اغلب از خشکی زیان می‌بینند (Sheffer et al. 2001). در آزمایشی حدود ۲۵۰۰ EST از کتابخانه تحت تنش نخود فرنگی توالی‌بایی شد و تجزیه مقایسه‌ای از ژن‌های با بیان متفاوت انجام شد، نتایج بدست آمده در فهم اساس مولکولی ژن‌های متتحمل به خشکی در نخود فرنگی مفید بود (Gao et al. 2008). در آزمایش دیگری برای توصیف ژن‌های شرکت کننده در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در نوعی لوبیا EST ۱۰۵۰ جداسازی و توالی‌بایی شد و نتایج نشان داد که ۵۳۱ توالی منحصر به فرد بودند و ۳۰ درصد از آن‌ها هیچ

<sup>1</sup> *Oryza sativa*

<sup>2</sup> *Triticum aestivum*

<sup>3</sup> *Gossypium hirsutum*

<sup>4</sup> *Festuca spp*

## نتایج و بحث

به منظور بررسی دقیق پروفایل بیان ژن و گروههای کارکردی، ابتدا مقایسه بصورت دو به دو بین کتابخانه گندم و بونج، پنبه و فستوکا انجام شد. سپس پروفایل بیان ژن هر چهارگیاه به صورت توام بررسی شد. در دستیابی به گروههای کارکردی و نقش سلولی آنها از دو کتابخانه تحت تنش خشکی گندم و بونج بعد از EST هم‌گذاری ۵۵۰۴ EST، در کل ۷۴۰ کانتیگ و ۲۲۸۸ سینگلتون در کتابخانه تحت تنش بونج با استفاده از نرم افزار EGassembler تشکیل شد و در کتابخانه تحت تنش گندم تعداد ۷۵ کانتیگ و ۸۱۵ سینگلتون بعد از هم‌گذاری ۱۰۲۶ EST تشکیل شد. نتایج تجزیه در جدول یک آمده است.

جدول ۱- تعداد ESTهای موجود در هر کتابخانه و تعداد کانتیگ و سینگلتون‌های هر کتابخانه بر اساس خروجی نرم افزار EGassembler

| کتابخانه                          | گندم تحت<br>تنش خشکی | کتابخانه                          | بونج تحت<br>تنش خشکی |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|
| تعداد کل ها                       | ۵۵۰۴                 | تعداد کل ها                       | ۱۰۲۶                 |
| تعداد کانتیگ ها                   | ۷۴۰                  | تعداد کانتیگ ها                   | ۷۵                   |
| تعداد EST در کانتیگ               | ۳۲۱۶                 | تعداد EST در کانتیگ               | ۲۱۱                  |
| تعداد سینگلتون                    | ۲۲۸۸                 | تعداد سینگلتون                    | ۸۱۵                  |
| کانتیگ‌هایی که hit مشخصی ندارند   | ۱۹۷                  | کانتیگ‌هایی که hit مشخصی ندارند   | ۲۵                   |
| سینگلتون‌هایی که hit مشخصی ندارند | ۱۱۹۶                 | سینگلتون‌هایی که hit مشخصی ندارند | ۳۱۵                  |

با استفاده از نرم افزار CLCBio، بلاست موضعی (بلاست در برابر بانک اطلاعاتی آراییدوپسیس) کانتیگ‌ها و سینگلتون‌ها انجام شد و تبدیل رمزهای ژنتیکی کانتیگ‌ها و سینگلتون‌های دو کتابخانه به رمزهای ژنتیکی گیاه آراییدوپسیس صورت گرفت. از آنجا که گروههای کارکردی گیاه آراییدوپسیس به طور کامل شناخته شده است تبدیل این رمزها به رمزهای ژنتیکی گیاه آراییدوپسیس به منظور تعیین گروههای کارکردی کتابخانه‌های گندم و بونج تحت تنش خشکی انجام شد. گروههای کارکردی هر دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman به ۳۴ دسته طبقه بندی شد. مقایسه گروههای کارکردی دو کتابخانه در شکل یک نمایش داده شده است. در تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروههای کارکردی دو کتابخانه گندم و بونج تحت تنش خشکی از نرم افزار IDEG6 استفاده گردید. بیان ۷ گروه کارکردی (جدول ۲) بین این دو کتابخانه اختلاف معنی‌داری داشتند که بیانگر این حقیقت است که گیاه گندم و

در مطالعه شباهت بین دو کتابخانه، همه توالی‌های EST با استفاده از نرم افزار EGassembler هم‌گذاری شدند. سپس همه کانتیگ‌ها به وسیله جستجوگر بلاست X توسط نرم افزار CLC protein workbench در مقابل پروتئین‌های غیر تکراری بانک ژن تجزیه و تحلیل شدند. برای شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها، نرم افزار<sup>۱</sup> IDEG6 مورد استفاده قرار گرفت. الگوریتم این نرم افزار با آزمون کای دو جنرا برای شناسایی ژن‌ها با بیان متفاوت به ما کمک می‌کند (Romualdi et al. 2003).

## تجزیه کارکردی

در تعیین هم‌دیفی و ادغام توالی‌های رونوشت ژن (EST)، نرم افزار EGassembler مورد استفاده قرار گرفت. این روش برای هم‌گذاری توالی‌های EST با ضریب درصد همپوشانی<sup>۲</sup>  $N \geq 95$  و حذف دیگر گزینه‌ها از قبیل فرایندهای پوشاندن اندامک‌ها و روشن سازی توالی، پوشاندن تکرارها و پوشاندن ناقل‌ها استفاده شد. نرم افزار EGassembler یکسری EST را در فرمت FASTA می‌پذیرد. توالی‌های مربوط به فایل‌های کانتیگ و سینگلتون از هر کتابخانه به وسیله نرم افزار CLC protein workbench و برنامه BLASTX ( $E \leq 1 \times 10^{-5}$ ) در برابر پایگاه اطلاعاتی آراییدوپسیس که از منبع اطلاعاتی آراییدوپسیس<sup>۳</sup> TAIR دانلود شد مورد تجزیه قرار گرفت. برای طبقه بندی گروههای کارکردی، ابزار طبقه بندی کارکردی و مقایسه‌ای<sup>۴</sup> mapman موسسه مکس پلانک<sup>۵</sup> به صورت آنلاین استفاده شد. خروجی‌های mapman برای توصیف کاتالوگ‌های متفاوت در بین کتابخانه‌ها که می‌تواند گروههای کارکردی را در آزمایشات نمونه‌ای چندگانه کشف کند مورد استفاده قرار گرفت. در اینجا از تست کای دو جنرا برای تشخیص گروههای کارکردی متفاوت استفاده شد. سپس برای یافتن گروههای کارکردی متفاوت بین دو کتابخانه از نرم افزار IDEG6 استفاده گردید.

<sup>1</sup> [Http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/](http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/)

<sup>2</sup> Overlap percent identity cutoff  $N \geq 95$

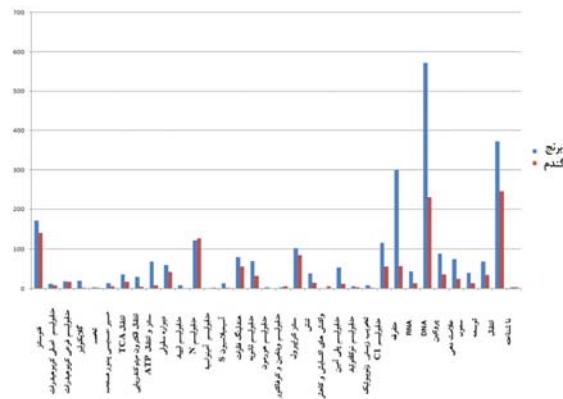
<sup>3</sup> [Ftp://ftp.arabidopsis.org](http://ftp.arabidopsis.org)

<sup>4</sup> [Http://mapman.mpiimp-golm.mpg.de](http://mapman.mpiimp-golm.mpg.de)

<sup>5</sup> MapMan Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology

ژن‌ها در دو کتابخانه تحت تنش خشکی است. رونوشت‌های مربوط به گروه‌های کارکردی بیوستزر پلی‌آمین‌ها در دو کتابخانه گندم و برنج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. رابطه بین بیوستزر پلی‌آمین‌ها و تحمل خشکی اولین بار در گیاه جو نشان داده شد (Richards and Coleman 1952). در آزمایشی نشان داده شده که با دست کاری ژنتیکی در بیوستزر پلی‌آمین‌ها در گیاهان می‌توان ژرم پلاسم مقاوم به خشکی ایجاد کرد (Capell et al. 2004). بیان ژن‌های رمز کننده پلی‌آمین‌ها در گیاه گندم تحت تنش خشکی بیشتر بود که نشان دهنده این است که گندم در بکارگیری سترز پلی‌آمین‌ها در مکانیسم تحمل به خشکی نسبت به برنج کارآمدتر می‌باشد. ژن‌های دخیل در متابولیسم اسیدهای آمینه نیز در دو کتابخانه بیان متفاوتی داشتند. از این نتایج ما به شناسایی بخشی از گروه‌های کارکردی دخیل در مکانیسم تحمل به خشکی که نقش مهمی در فهم فرآیند تحمل به خشکی در دو گیاه گندم و برنج ایفا می‌کنند دست یافتیم. دسته‌بندی، هم‌گذاری و جستجوی بلاست توالی‌های EST به منظور بررسی بیان ژن‌های دو گیاه برنج و گندم تحت تنش خشکی نشان داد که در کتابخانه برنج تحت تنش خشکی، EST ۱۹۲۹ (۳۵/۰۴ درصد) و در کتابخانه گندم تحت تنش EST ۳۷۶ (۳۶/۶۴ درصد) سهم خیلی ضعیفی (≤۱۰<sup>-۵</sup> نمره بلاست) در همولوژی با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها داشتند و یا هیچ توالی مشابهی با آن‌ها وجود نداشت و کاندیدای خوبی هستند که به عنوان ژن‌های جدید مد نظر قرار گیرند، در حالی که EST ۳۵۷۵ در کتابخانه برنج تحت تنش و EST ۶۵۰ در کتابخانه گندم، همولوژی بالا یا متوسطی را نشان دادند (<۱۰<sup>-۵</sup> نمره بلاست). بر پایه این نتایج توالی‌هایی که در نشان دادن همولوژی معنی‌دار برای هر پروتئین در پایگاه داده‌های عمومی شکست خورده کاندیدای مناسبی برای ژن‌های داده‌های جدید هستند. به عنوان مثال کانتیگ ۴۴ در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی می‌تواند به عنوان کاندیدای ژنی که هنوز شناخته نشده است جداسازی و توالی‌بایی شود و به عنوان یک ژن جدید در پاسخ به تنش خشکی معرفی گردد و در برنامه‌های انتقال ژن و اصلاح گونه‌های دیگر بکار گرفته شود. در این تحقیق به کمک نرم‌افزار IDEG6 نشان داده شد که از بین ۳۰۶ ژن که بیان متفاوتی در دو کتابخانه برنج و گندم نشان دادند ۱۳ ژن از نظر

برنج تحت تنش خشکی با بکارگیری گروه‌های کارکردی متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند.



شکل ۱- مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman

جدول ۲- نتایج نرم افزار IDEG6 و تعیین گروه‌های کارکردی متفاوت بین دو کتابخانه را نشان می‌دهد

| گروه مای کارکردی متفاوت در دو کتابخانه برنج و گندم | کتابخانه گندم | کتابخانه برنج | کای اسکنر |
|--|---------------|---------------|-----------|
| PS   | 173           | 142           | 0.000004* |
| Cell wall  | 69            | 8             | 0.000016* |
| Amino acid metabolism                              | 122           | 127           | 0*        |
| Polyamine metabolism                               | 0             | 6             | 0.000526* |
| RNA  | 299           | 57            | 0*        |
| not assigned                                       | 372           | 245           | 0.000249* |
| stress   | 103           | 85            | 0.000395* |

مقایسه توزیع گروه‌های کارکردی میان EST‌ها نشان داد که در گروه کارکردی PS یا فتوستزر بین دو کتابخانه گندم و برنج تحت تنش خشکی، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. این امر تفاوت در کارایی سیستم فتوستزری دو گیاه در مقابله با تنش خشکی را نشان می‌دهد. رونوشت‌های مربوط به گروه‌های کارکردی دیواره سلولی و استرس در دو کتابخانه تفاوت معنی‌داری را نشان داد. تعداد زیادی از پروتئین‌های سنتز دیواره سلولی هستند که جز پروتئین‌های دخیل در شرایط استرس هم محسوب می‌شوند این امر به این حقیقت بر می‌گردد که دیواره سلولی گیاهان به عنوان سپر دفاعی است که نقش مهمی را در مکانیسم تحمل به تنش خشکی ایفا می‌کند. با توجه به جدول بالا، ژنهای دسته‌بندی شده در فرایند رونویسی<sup>۱</sup> در دو کتابخانه تفاوت معنی‌داری داشتند که نشان دهنده تفاوت در شدت بیان این

<sup>۱</sup> Transcription

هستند، این دسته از آنزیم‌ها سلول‌ها را در برابر اکسیژن‌های فعال حفاظت می‌کنند. در گیاه فرفیون<sup>۹</sup> رونویسی و فعالیت این آنزیم به طور گسترده‌ای در بافت‌هایی که تحت تنش‌های محیطی هستند افزایش می‌یابد (Anderson and Davis 2003). گلوتاتیون اس‌ترانسفراز نقش مهمی را در حذف کردن اکسیژن‌های واکنش پذیر(ROS)<sup>۱۰</sup> سلول بازی می‌کند. ظرفیت سیستم حذف کردن گلوتاتیون اس‌ترانسفرازها، بستگی به شدت بیان این ژن در گیاهان مختلف دارد (Tausz, 2003). بالابردن سطوح بیان ژن گلوتاتیون اس‌ترانسفراز به نظر می‌رسد که توسط گیاهان مقاوم به تنش خشکی کنترل می‌شود (Chugh and Khurana 2002).

سطوح رونوشت‌های گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی افزایش داشت. از نتایج این مطالعه و نتایج مشابه سایر محققین می‌توان استنباط نمود که در گندم تحت تنش خشکی، گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در محدود کردن آسیب‌های اکسیداتیو و دیگر پاسخ‌ها به تنش‌ها مشارکت می‌کند. این پروتئین‌ها با متابولیسم گیاهی و دفاع در برابر تنش با انواع اکسیژن واکنش‌پذیر مرتبط هستند. در حقیقت ایزوفرم‌های گلوتاتیون اس‌ترانسفراز گروه بزرگ و متنوعی از آنزیم‌های اکسیداتیو، با چندین فعالیت متنوع و الگوهای توالی متفاوت هستند. گیاهان مکانیسم‌های دفاعی موثر متنوعی در برابر صدمات اکسیداتیو استرس‌ها دارند، یکی از آن‌ها گلوتاتیون S-ترانسفراز است که انجام دهنده طیفی از نقش‌های عملکردی با استفاده از تری‌پیتید گلوتاتیون (GSH) به عنوان کوآنزیم است (GSTs) (Lederer and Boger 2005). از ژن دیگری که در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی بیان افزایشی داشت می‌توان به متالوتیونین اشاره نمود. نقش اصلی این ژن این است که به عنوان دفع کننده مسمومیت ناشی از فلزات سنگین عمل می‌کند و در تنظیم متابولیسم فلزات ضروری نقش دارد. اما اخیراً مشخص شده است که متالوتیونین‌ها به عنوان حذف کننده‌های رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و نقش مهمی در تحمل به خشکی ایفا می‌کند (Sato and Bremner 1993).

<sup>9</sup> *Euphorbia esula*<sup>10</sup> Reactive oxygen species

آماری تفاوت معنی‌داری داشتند، این ۱۳ ژن در جدول ۳ مشخص شده است.

جدول ۳- ژن‌های با بیان متفاوت بر حسب تعداد EST‌های هر کانتیگ در دو کتابخانه گندم و برقج تحت تنش خشکی را نشان می‌دهد.

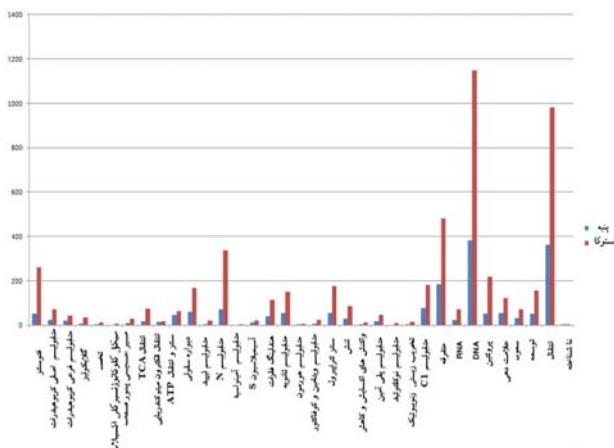
| ژن‌ها   | تعداد EST در کتابخانه گندم | تعداد EST در کتابخانه برقج |
|---|----------------------------|----------------------------|
| lipid transfer protein precursor                              | ۶                          | ۴                          |
| lipid transfer protein 7α2b                                   | ۴                          | ۴                          |
| dehydrin  | ۷                          | ۵                          |
| ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform        | ۷                          | ۶                          |
| Oxygen-evolving enhancer protein 2                            | ۶                          | ۶                          |
| ribulose-bisphosphate carboxylase activase                    | ۶                          | ۶                          |
| metallothionein   | ۶                          | ۶                          |
| ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit | ۶                          | ۶                          |
| stress responsive protein kinases                             | ۶                          | ۶                          |
| Contig 44   | ۱۰                         | ۷                          |
| putative acid phosphatase                                     | ۷                          | ۷                          |
| ADP-ribosylation factor 1                                     | ۶                          | ۶                          |
| glutathione s-transferase                                     | ۶                          | ۶                          |

تلاش شد که ژن‌هایی که در تحمل به تنش خشکی نقش دارند را در دو گیاه برقج و گندم شناسایی کنیم و بیان آن‌ها را در دو کتابخانه مورد مقایسه قرار دهیم. محصولات ژن‌های القا شده تحت تنش به طور وسیعی در دو گروه طبقه بندی می‌شوند. محصولات ژن‌های گروه اول به طور مستقیم سلول را در برابر تنش حمایت می‌کند مانند چاپرون‌ها<sup>۱</sup>، پروتئین‌های LEA<sup>۲</sup>، پروتئین‌های حفاظت کننده در برابر تنش‌های اسمزی<sup>۳</sup>، آنزیم‌های دخیل در دفع مواد سمی از گیاه<sup>۴</sup>، حذف کننده‌های رادیکال‌های آزاد<sup>۵</sup> و پروتئازهای مختلف (Iuchi et al. 2007)، گروه دوم شامل فاکتورهای رونویسی، پیغامبرهای ثانویه و فسفاتازها و کینازها مانند کینازهای فعال کننده تقسیم سلول<sup>۶</sup> و پروتئین‌های وابسته به کلسیم<sup>۷</sup> و کینازهای وابسته به رشد و تمایز سلول<sup>۸</sup> که بیان ژن‌های Kovtun et al. (2000) در پاسخ به تنش خشکی را تنظیم می‌کنند (Kovtun et al. 2000). فعالیت آنزیم‌های فتوستترزی و آنتی‌اکسیدان در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی افزایش معنی‌داری را نشان داد. از دسته اول می‌توان به گلوتاتیون اس‌ترانسفرازها اشاره نمود. گلوتاتیون اس‌ترانسفرازها جز گروه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

<sup>1</sup> Chaperons<sup>2</sup> Late embryogenesis abundant proteins<sup>3</sup> Osmoprotectant<sup>4</sup> Detoxifying enzymes<sup>5</sup> Free radical scavengers<sup>6</sup> Mitogen-activated kinases (MAPKs)<sup>7</sup> Calcium dependent protein kinases (CDPKs)<sup>8</sup> SoS kinases

جدول ۴- تعداد EST‌های موجود در هر کتابخانه و تعداد کانتیگ و سینگلتون‌های هر کتابخانه بر اساس خروجی نرم افزار EGassembler

| کتابخانه                          | کتابخانه پنبه | کتابخانه فستوکا | تحت تنش |
|-----------------------------------|---------------|-----------------|---------|
| تعداد کل EST‌ها                   | ۱۰۷۲          | ۴۹۷۲            |         |
| تعداد کانتیگ‌ها                   | ۱۰۵           | ۵۳۹             |         |
| تعداد EST در کانتیگ               | ۳۷۷           | ۱۷۱۳            |         |
| تعداد سینگلتون                    | ۶۹۵           | ۳۲۵۹            |         |
| کانتیگ‌هایی که hit مشخصی ندارند   | ۱۲            | ۱۱۰             |         |
| سینگلتون‌هایی که hit مشخصی ندارند | ۳۶۳           | ۱۲۵۹            |         |



شکل ۲- مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman

جدول ۵- نتایج نرم افزار IDEG6 و تعیین گروه‌های کارکردی متفاوت بین دو کتابخانه را نشان می‌دهد.

| گروه‌های تازه‌بردی متفاوت در دو کتابخانه پنبه و فستوکا | کتابخانه فستوکا | کتابخانه پنبه | کل تکثر   |
|--|-----------------|---------------|-----------|
| PS   | 53              | 261           | 0.000021* |
| Mitochondrial electron transport / ATP synthesis       | 16              | 19            | 0.001183* |
| Cell wall  | 46              | 63            | 0.000014* |
| Amino acid metabolism                                  | 73              | 338           | 0.000014* |
| redox regulation                                       | 30              | 86            | 0.000047* |
| Misc   | 78              | 182           | 0.000432* |
| Signaling  | 53              | 218           | 0.001168* |

توالی‌های مربوط به کتابخانه پنبه تحت تنش خشکی در ۳۱ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند و توالی‌های مربوط به کتابخانه فستوکا تحت تنش خشکی در ۳۴ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند. کتابخانه‌های پنبه و فستوکا در سه گروه کارکردی فتوستتر، دیواره سلولی، متابولیسم اسید آمینه با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. این نشان دهنده اهمیت این سه گروه کارکردی در مکانیسم مقابله با تنش خشکی ما بین گیاهان مختلف می‌باشد. از دیگر گروه‌های کارکردی که بین دو گیاه پنبه و فستوکای تحت

در پاسخ به تنش خشکی را تنظیم می‌کنند کینازهای پاسخ به تنش هستند که در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی بیان افزایشی داشتند، این دسته از ژن‌ها نقش کلیدی را در هماهنگی بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی گوناگون دارند (Dunand-Sauthier et al. 2005). در آزمایشی نشان داده شد که بخشی از پاسخ سلولی به تنش‌ها به وسیله نقشی که کینازهای پاسخ به استرس به عنوان پیام رسان<sup>۱</sup> ایفا می‌کنند، اتفاق می‌افتد (Tibbles and Woodgett 1999). لبید ترانسفرازها در انتقال چربی از میان زمینه خارج سلولی به منظور تشکیل موم کوتیکولی نقش دارند. اهمیت تشکیل موم کوتیکولی به تحمل تنش خشکی در گیاه مربوط می‌شود (Kimberly et al. 2006). این پروتئین‌ها به طور غیر مستقیمی در دفاع گیاه و ممانعت از کاهش آب در برابر تنش‌های محیطی نقش دارند (Chugh and Khurana 2002). یکی از پاسخ‌های بیولوژیکی گیاه به تنش خشکی، تجمع پروتئین‌های دهیارین می‌باشد. این پروتئین‌ها غشاها و ماکرومولکول‌ها را از تغییر ماهیت حفاظت می‌کنند (Lopez et al. 2003). این ژن یکی از گزینه‌های مناسب به منظور استفاده در برنامه‌های اصلاح گیاهان از جمله برنج برای افزایش مقاومت به تنش خشکی می‌باشد. برای دستیابی به گروه‌های کارکردی و نقش سلولی EST‌ها از دو کتابخانه تحت تنش خشکی پنبه و فستوکا بعد از هم‌گذاری ۱۰۷۲ EST، در کل ۱۰۵ کانتیگ و ۶۹۵ سینگلتون در کتابخانه تحت تنش پنبه با استفاده از نرم افزار EGassembler تشکیل شد و در کتابخانه تحت تنش فستوکا کانتیگ ۵۳۹ و ۳۲۵۹ سینگلتون بعد از هم‌گذاری ۴۹۷۲ EST تشکیل شد. نتایج این تجزیه در جدول ۴ آمده است. گروه‌های کارکردی هر دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman طبقه‌بندی شد. مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه در شکل دو نمایش داده شده است. بیان ۷ گروه کارکردی (جدول ۵) بین این دو کتابخانه اختلاف معنی‌داری داشت که بیانگر این حقیقت است که گیاه پنبه و فستوکا تحت تنش خشکی با بکارگیری گروه‌های کارکردی متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند.

<sup>1</sup> Signalling

نمی‌توانند به هر مسیری نسبت داده شوند (گروه کارکردی متفرقه (misc) نامیده می‌شوند. در کتابخانه پنبه و فستوکا چندین زیر گروه این گروه کارکردی با همدیگر متفاوت بودند (Lederer and Boger 2005). تنظیم واکنش‌های اکسایش-کاهش در کتابخانه پنبه و فستوکای تحت تنش خشکی متفاوت بود. اکسیژن برای گیاهان مثل سایر موجودات هوایی، همانند یک تیغ دو لبه است. اگرچه برای رشد و نمو عادی ضروری است ولی تماس مدام با آن متنج به صدمه دیدن سلولها و در نهایت مرگ آنها می‌گردد. در کتابخانه فستوکای تحت تنش خشکی بیان بالایی از توالی‌های Mittler et al. (2004). در EST‌های کتابخانه پنبه تحت تنش خشکی، ۱۲۲ ۳۴/۷۷ (درصد) و در کتابخانه فستوکا EST ۱۹۱۴۱ ۳۳/۲۴ (درصد) سهم خیلی ضعیفی (نمره بلاست  $\leq 10^{-5}$ ) در همولوژی با توالی‌های موجود در پایگاه داده غیر تکراری Nr داشتند و یا هیچ توالی مشابهی با آنها وجود نداشت، بنابراین به عنوان ژن‌های جدید مدنظر قرار گرفتند و EST ۲۴۵ باقیمانده در پنبه و EST ۳۵۹۰ باقیمانده در فستوکا همولوژی بالا یا متوسطی را نشان دادند (نمره بلاست  $\geq 10^{-5}$ ). بر پایه نتایج ما، توالی‌هایی که در نشان دادن همولوژی معنی دار برای هر پروتئین در پایگاه داده‌های عمومی شکست خوردند کاندیدای مناسبی برای ژن‌های جدید هستند و در برنامه‌های انتقال ژن و اصلاح گونه‌های دیگر بکار گرفته می‌شوند. در این تحقیق مابه کمک نرمافزار IDEG6 و آزمون کای دو جنرال نشان دادیم که از بین ۲۵۶ ژن که بیان متفاوتی در دو کتابخانه پنبه و فستوکا نشان دادند ۱۴ ژن از نظر آماری تفاوت معنی داری داشتند، این ۱۴ ژن در جدول ۶ مشخص شده است. لبید ترانسفراز، گلوتاتیون اس ترانسفراز، دهیدرین، متالوتیونین از جمله ژن‌هایی هستند که در کتابخانه‌های فستوکا و پنبه تحت تنش خشکی مانند کتابخانه‌های برنج و گندم اختلاف داشتند. از نتایج این مطالعه و نتایج مشابه سایر محققین می‌توان استبطان نمود که احتمالاً این ژن‌ها با توجه به نقش بسیار مهمی که پیشتر در مورد آنها توضیح داده شد در مقابله با تنش خشکی در گونه‌های مختلف گیاهی اهمیت حیاتی دارند.

تنش اختلاف داشتند، گروه کارکردی سیگنالینگ و گروه کارکردی انتقال الکترون میتوکندریایی و متفرقه و تنظیم واکنش‌های اکسایش-کاهش هستند. در گروه کارکردی انتقال الکترون میتوکندریایی اختلاف معنی داری بین کتابخانه‌های پنبه و فستوکای تحت تنش خشکی وجود دارد. گروه کارکردی زنجیره انتقال الکترون مجموعه‌ای است از پروتئین‌های پیچیده که انرژی ذخیره شده‌ی ناقلين الکترونی حاصل از واکنش‌های اکسیداسیون و احیای سلول را برای تشکیل ATP و سایر مولکول‌های پرانرژی مصرف می‌کنند و عملکرد مهمی در تولید انرژی برای سلول‌های تحت تنش بازی می‌کنند که نشان دهنده نیاز سلول‌های گیاه تحت تنش خشکی به انرژی بیشتر به منظور مقابله با تنش خشکی می‌باشد (Wagner and Krab 2006). ژن‌های دخیل در فرایند انتقال پیام کلسیم<sup>۱</sup> نیز در دو کتابخانه تفاوت معنی داری داشتند. یون Ca<sup>+</sup> به طور گستره‌های در گیاهان و حیوانات بکار گرفته می‌شود. نه تنها در تولید ولتاژ غشایی بلکه به عنوان یک مکانیسم پیام دهنده عمل می‌کند، کلسیم یک ملکول کوچک<sup>۲</sup> است که اثر تنظیمی روی خیلی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها دارد. از ژن‌هایی که در فرایند پیام‌دهی کلسیم در کتابخانه فستوکا نقش دارند می‌توان به کلمودولین<sup>۳</sup> و کلسینورین<sup>۴</sup> اشاره نمود. کلمودولین جز پروتئین‌های باند شونده با کلسیم است و می‌تواند با پروتئین‌های دیگر باند شود و عملکرد آن‌ها را تنظیم کند و به این وسیله روی خیلی از عملکردهای سلول نقش داشته باشد. کلسینورین‌ها جز پروتئین فسفاتازها هستند و به طور گستره‌های در پاسخ به استرس‌های محیطی بیان می‌شوند (Kudla et al. 1999). تنش‌های محیطی معمولاً وقتی در گیاهان اعمال می‌شوند منجر به افزایش موقتی و زودگذر در کلسیم آزاد سیتوپلاسمی می‌شود. این پیام‌های کلسیم سلولی (Ca<sup>2+</sup>) در نهایت منجر به افزایش پاسخ‌های ژنی در گونه‌های گیاهی نسبت به تنش‌ها می‌شود که این ژن‌ها پروتئین‌هایی را رمز می‌کنند که وظیفه حفاظتی را به عهده دارند (Zhu, 2002).

<sup>1</sup> Calcium signaling<sup>2</sup> Allosteric<sup>3</sup> Calmodulin<sup>4</sup> Calcineurin

گفته می شوند که در شرایط استرسی در سلول بیان می گرددند نقش این سلول ها جلوگیری از تغییر کوئیتین های پروتئین ها تحت عوامل استرسی می باشد. پروتئین های HSP بواسطه چندین نوع از عوامل استرس زا همچون استرس های اکسیداتیو، فلزات سنگین و استرس های محیطی مانند استرس خشکی القاء می گرددند (Loones and Morange 1998). بنابراین شاید بتوان اینگونه استدلال نمود که پروتئین های HSP با تنظیم پروتئین های دخیل در مقابله با تنش خشکی نقش کلیدی را در مقابله با تنش بازی می کند. خیلی از چاپرون ها پروتئین های شوک های حرارتی هستند که پروتئین های بیان شده در پاسخ به تنش خشکی و یا دیگر استرس های سلولی هستند. علت این رفتار این است که چین خورده گی پروتئین به شدت تحت تاثیر تنش قرار می گیرد، از این رو بعضی از چاپرون ها برای تعییر صدمات ایجاد شده عمل می کنند. تجمع ماکرومولکول ها می تواند در عملکرد چاپرون ها مهم باشد. بیان بالای این ژن ها در کتابخانه فستوکای تحت تنش دیده شد (Ellis and van 1991) (Ellis and van 1991). فرایند تخمیر الكل به همراه تنفس سلولی در طی تنش خشکی اتفاق می افتد که در آن انرژی مشتق شده از اکسیداسیون ترکیبات آلی از قبیل کربوهیدرات ها استفاده در سایر واکنش های مهم سلولی در فرایندهای دخیل در نقل و انتقالات درون سلولی و به طور کلی در تمام واکنش های سلولی دخیل در مقابله با تنش خشکی صرف می شود. گروه های کارکردی تخمیر و ژنهای شرکت کننده در این گروه ها در کتابخانه Persson et al. (2008). پروتئین<sup>7</sup> LEA در کتابخانه پنبه تحت تنش خشکی افزایش بیان داشتند. این پروتئین نقش ویژه ای را در حفاظت سیتوپلاسم در برابر از دست دادن آب و حفاظت گیاهان بوسیله Chugh کاهش سمیت ایجاد شده بوسیله غلظت بالای یون ها دارد (Chugh and Khurana 2002). پروتئین های LEA پروتئین هایی هستند که از دیگر پروتئین ها در برابر استرس های خشکی و اسموتیک حمایت می کنند. مطالعات بیوانفورماتیکی اخیر پیشنهاد می کند که این پروتئین ها، رفتاری مانند چاپرون های<sup>8</sup> مولکولی دارند و به

جدول ۶- ژن های با بیان متفاوت بر حسب تعداد EST های هر کانتیگ در دو کتابخانه پنبه و فستوکای تحت تنش خشکی را نشان می دهد.

| ژن ها                     | تعداد EST در کتابخانه پنبه | تعداد EST در کتابخانه فستوکای |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| lipid transfer protein    | ۰                          | ۱۹                            |
| glutathione s-transferase | ۳                          | ۲۲                            |
| dehydrin                  | ۲۹                         | ۶                             |
| metallothionein           | ۱۲                         | ۰                             |
| Ubiquitin                 | ۲۲                         | ۵                             |
| Glutathione peroxidase    | ۰                          | ۲۱                            |
| Amine oxidase             | ۴                          | ۱۸                            |
| Peroxidases               | ۴                          | ۲۷                            |
| Heat shock protein        | ۱۸                         | ۴                             |
| Phosphatases              | ۰                          | ۲۷                            |
| Alcohol dehydrogenase     | ۰                          | ۱۶                            |
| pyruvate decarboxylase    | ۴                          | ۲۶                            |
| LEA                       | ۹                          | ۰                             |
| chaperonins               | ۰                          | ۲۷                            |

یوبی کوئیتین ها<sup>۱</sup>، که در کتابخانه پنبه افزایش بیان داشتند، پروتئین های کوچکی هستند که در انواع سلول های و کاربیوتی وجود دارد. حضور وسیع این پروتئین در جایگاه های مختلف و ثابت ماندن ساختار مولکولی آن در گونه های مختلف، حاکی از نقش مهم یوبی کوئیتین در حیات سلولی می باشد. اتصال کولان یوبی کوئیتین به پروتئین ها یکی از مهم ترین راه های هدایت بسیاری از بیومولکول های پروتئینی به سمت تجزیه پروتئوزومی<sup>۲</sup> بشمار می رود (Kimura and Tanaka 2010). ما پیشنهاد می کنیم که ژن های دخیل در فرایند اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی نقش بسیار مهمی در مقابله با تنش خشکی بازی می کند. افزایش بیان ژن های دخیل در استرس های اکسیداتیو در کتابخانه فستوکای تحت تنش خشکی دیده شد. از این ژن ها می توان به پراکسیدازها<sup>۳</sup>، آمین اکسیدازها<sup>۴</sup>، گلوتاتیون پراکسیدازها<sup>۵</sup> اشاره نمود. این ژن ها احتمالاً به دنبال وقوع تنش خشکی در این کتابخانه تولید می شوند (Kerr et al. 1972)، از طرفی بیان ژن های پاسخ به استرس نیز در این کتابخانه افزایش داشت که این می تواند به این علت باشد که پراکسیدهای تولید شده باید از سلول ها دفع شوند تا از صدمات ناشی از تنش جلوگیری کنند. از ژن هایی که در پاسخ به استرس های اکسیداتیو در دو کتابخانه بیان شده و اختلاف بیان داشتند می توان به ژن های شوک حرارتی<sup>۶</sup> اشاره نمود. پروتئین های شوک حرارتی به مجموع پروتئین هایی

<sup>1</sup> Ubiquitin

<sup>2</sup> Proteasomes

<sup>3</sup> Peroxidases

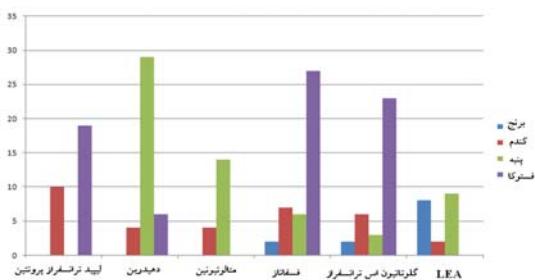
<sup>4</sup> Amine oxidase

<sup>5</sup> Glutathione peroxidase

<sup>6</sup> Heat shock protein

<sup>7</sup> Late embryogenesis abundant

<sup>8</sup> Chaperonins



شکل ۳- بررسی توزیع ژن‌های دخیل در تنفس خشکی در چهار کتابخانه تحت تنفس خشکی پیشنهادات

با توجه به اهداف پژوهش در تعیین ژن‌های دارای بیان افتراقی و شناسایی ژن‌های کلیدی در فرایند مقاومت به تنفس خشکی بوده، موارد زیر در ادامه این تحقیق پیشنهاد می‌شود:

- ۱- جدا سازی و بررسی مولکولی ژن‌های دارای بیان افتراقی
- ۲- شناسایی ارتباطات بین عوامل تاثیر گذار در فرایند مقاومت به تنفس خشکی
- ۳- با توجه به تعیین ژن‌های کلیدی دخیل در فرایند مقاومت به تنفس خشکی در گیاهان مختلف در این پژوهش می‌توان به دست ورزی این ژن‌ها به منظور افزایش مقاومت گیاهان مهم زراعی به تنفس خشکی اقدام نمود.

#### سپاسگزاری

از دانشگاه زنجان بخاطر پشتیبانی مالی از پژوهش انجام شده و همچنین از استاد محترم جناب آقایان دکتر بهرام ملکی و مرحوم دکتر علی حق نظری به خاطر پشتیبانی علمی در اجرای این پژوهه تحقیقاتی کمال تشکر را داریم و نیز از همکاری‌های صمیمانه و پشتیبانی معاونت علمی و پژوهشی دانشگاه زنجان قدردانی می‌نماییم.

#### منابع

- Anderson J, Davis D (2003) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in (*Euphorbia esula*). Plant Biology. 32:430-441.
- Barret-Lennard EG, Robson AD, Greenway H (2008) Effect of phosphorous deficiency and water deficit phosphatase activities from wheat leaves. J Exp Bot 33:682-695.
- Bausher M, Shatters R, Chaparro J, Niedz R (2003) An expressed sequence tag (EST) set from *Citrus sinensis* L. Osbeck whole seedling and implications of further

و سیله استرس‌های خشکی و اسموتیک القا می‌شوند و ساختارهای مولکولی و سلولی را از اثرات صدمات کاهش آب حفاظت می‌کنند (Shiota et al. 1998). آنزیم‌های فسفاتاز به طور وسیعی در گیاهان یافت می‌شوند. به عبارت دیگر فسفاتازها دفسفریلاسیون فسفات آلی و تبدیل آن به فسفات معدنی را بر عهده دارند (Barret-Lennard et al. 2008). نتایج این پژوهش نشان داد که تنفس خشکی سبب افزایش آنزیم‌های فسفاتاز به ویژه در کتابخانه فستوکای تحت تنفس خشکی گردیده و با افزایش سطح تنفس، بیان این آنزیم‌ها افزایش یافت. عوامل محیطی مانند تنفس خشکی می‌توانند سبب افزایش فعالیت درون سلولی و برونو سلولی این آنزیم شود. اهمیت این آنزیم در تولید و انتقال فسفر می‌باشد (Julie et al. 2000). بعد از مقایسه دو به دوی کتابخانه‌ها و پیدا کردن اهمیت آن‌ها در این گیاهان مقایسه آماری بین نتایج بدست آمده از این تفاوت‌ها در چهار گیاه انجام شد و بررسی ژن‌های مهم دخیل در تنفس خشکی در چهار کتابخانه تحت تنفس خشکی نشان داد که لیپید ترانسферاز، گلوتاتیون اس ترانسferاز، دهیدرین، متالوتیونین، فسفاتازها، LEA که پیشتر اهمیت آن‌ها در مقاومت به تنفس خشکی بیان شد، از جمله ژن‌های مهم دخیل در تنفس خشکی در چهار کتابخانه برنج، گندم، پنبه و فستوکای تحت تنفس بودند. بررسی توزیع این ژن‌ها در چهار کتابخانه تحت تنفس خشکی در شکل ۳ آورده شده است. بررسی توزیع ژن‌های مهم در تنفس خشکی در چهار گیاه نشان داد که اکثر ژن‌های مهم دخیل در تنفس خشکی، به ترتیب در گیاه فستوکای، پنبه، گندم و به مقدار کمتری در گیاه برنج تحت تنفس خشکی افزایش بیان داشتند که نشان دهنده کارآمدتر بودن گیاه فستوکای و سپس پنبه در مقاومت به تنفس خشکی می‌باشد.

- perennial source investigations. Plant Science 165:415-422.
- Capell T, Bassie L, Christou P (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Plant Biology. 26:9909-9914.
- Chen L, Zhao LP, Gao QK (2005) Generation and analysis of expressed sequence tags from the tender shoots cDNA library of tea plant (*Camellia sinensis*). Plant Science. 168:359-363.
- Chugh A, Khurana P (2002) Gene expression during drought stress recent advances. Current Sience 83:6-25.

- Dunand-Sauthier I, Walker C, Humphrey T (2005) Stress-Activated Protein Kinase Pathway Functions To Support Protein Synthesis and Translational Adaptation in Response to Environmental stress in Fission Yeast. *Eukaryotic Cell* 11:1785-1793.
- Ellis RJ, van SM (1991) Molecular chaperones embryogenic gene. *Plant Physiology* 94:690-695.
- Gao WR, Wang XS, Liu QY, Peng H, Chen Ch, Li JG, Zhang J, Hu SN, Ma H (2008) Comparative analysis of ESTs in response to drought stress in chickpea (*C. arietinum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communication* 376:578-583.
- Gorantla M, Babu PR, Lachagari VB, Feltus FA, Paterson AH, Reddy, AR (2005) Functional genomics of drought stress response in rice: Transcript mapping of annotated unigenes of an indica rice (*Oryza sativa* L.cv. Nagina 22). *Current Science*. 89:496-513.
- Hide W, Miller R, Ptitsyn A, Kelso J, Gopallakrishnan C, Christoffels A (1999) EST Clustering Tutorial. ISMB. p. 24.
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M (2007) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Journal* 27:325-33.
- Julie EH, Simpson R J, Richardson AE (2000) The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose-1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant and Soil* 220:165-174.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (4):239-57.
- Kimberly D, Cameron A, Smart L (2006) Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. *Plant Physiology* 140:176-183.
- Kimura Y, Tanaka K (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *Journal of Biochem* 147:793-8.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2940-45.
- Kudla J, Xu Q, Harter K (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Plant Biology* 96:4718-4723.
- Lederer B, Boger P (2005) A Ligand Function of Glutathione S-Transferase. *Plant Physiology*. 171:63-87.
- Lein W, Usadel B, Stitt M, Reindl A, Ehrhardt T, Sonnewald U, Bornke F (2008) Large-scale phenotyping of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) to identify essential leaf functions. *Plant Biotechnology Journal* 6:246-263.
- Loones MT, Morange M (1998) Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo Cell 3:237-44.
- Lopez C, Banowetz G M , Kronstad W (2003) dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Science* 43:577-582.
- Man MZ, Wang X, Wang Y (2002) Power\_SAGE: comparing statistical tests for SAGE experiments. *Bioinformatics* 18:953-959.
- Masoudi-Nejad A, Tonomura K, Kawashima Sh, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo T, Goto S (2006) EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Research* 34:459-462.
- McGinnis S, Madden TL (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 32:20-25.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Elsevier 9:490-498.
- Mostajeran A, Rahimi-Eichi V (2009) Effects of Drought Stress on Growth and Yield of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars and Accumulation of Proline and Soluble Sugars in Sheath and Blades of Their Different Ages Leaves. *American-Eurasian* 5(2):264-272.
- Naghavi MR, malbobi M A, rashidi S (1388) bioinformatics.tehran university press,Tehran. Iran (In Farsi).
- Neerincx P, Leunissen, J (2005) Evolution of web service in bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*. 6:178-188.
- Persson B, Hedlund J, Jornvall H (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the MDR superfamily. *Cell Mol Life Sci* 65(24):3879-94.
- Pospisilova J, Synkova H, Rulcova J (2000) Cytokinins and water stress. *Biologia Plantarum*. 43(3):321-328.
- Reddy P, Sairanganayakulu G, Thippeswamy M, Reddy S, Reddy MK , Sudhakar Ch (2008) Identification of stress-induced genes from the drought tolerant semi-arid legume crop horsegram (*Macrotyloma uniflorum* Verdc.) through analysis of subtracted expressed sequence tags. *Plant Science* 175:372-384.
- Richards FJ, Coleman RG (1952) the polyamine biosynthetic pathway. *Nature* 170:460-463.
- Romualdi C, Bortoluzzi S, Dalessi G, Danieli GA (2003) IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiology Genomics* 12:159-162.
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Ulrich Guldener U, Mannhaupt G, Meunsterko M, Mewes HW (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research* 32:5539-5545.
- Sato m, Bremner L (1993) Oxygen free radicals and m et allothionein. *Biology and Medicine* 14:325-327.
- Sheffer KM, dunn JH, minner DD (2001) summer drought response and rooting depth of tree cool season turfgrasses. *HortSci* 22:296-297.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2008) Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol* 115:327-334.
- Shiota H, Satoh R, Watabe K, Harade H, Kamada H (1998) *C-ABI3*, the carrot homologue of the *Arabidopsis ABI3*, is expressed during both zygotic and somatic

embryogenesis and function in the regulation of embryo - specific ABA-Inducible genes. plant cell physiology 39:1184-1193.

Skuse G, Du Ch (2008) Bioinformatics Tools for Plant Genomics. International Journal of Plant Genomics 28:1-2. Tausz M (2003) The Role of Glutathione in Plant Response and Adaptation to Natural Stress . Plant Ecophysiology 45:102-122.

Tibbles LA, Woodgett J R (1999) The stress-activated protein kinase pathways. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences 55:1230-1254.

Tuberosa R, Salvi S (2006) Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. Plant Science 11:406-412.

Varshney RK, Langridge P, Graner A (2007) Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley. Science direct 58:121-55.

Wagner A, Krab K (2006) The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation. Physiologia Plantarum 95:318-325.

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. Ann Rev Plant Biol 53:247-273.