

شناسایی رونوشت‌های دخیل در تنش خشکی در هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از روش cDNA-AFLP

Identification of the transcripts involving in drought tolerance in *Aeluropus littoralis* using cDNA-AFLP technique

سیده‌فرزانه فاطمی^۱، قربانعلی نعمت‌زاده^{۱*}، حسین عسکری^۲، سیدحمیدرضا هاشمی^۱

۱- به ترتیب کارشناس ارشد، استاد، دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- استادیار، دانشگاه شهید بهشتی

Fatemi F¹, Nematzadeh GA^{*1}, Askari H², Hashemi HR¹

1. MSc Student, Professor, PhD Student, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, University of Agriculture and Natural Resources of Sari
2. Assistant Professor, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

خشکی به عنوان مهم‌ترین عامل محیطی، رشد و تولید گیاهان زراعی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این تحقیق برای شناسایی رونوشت‌های دخیل تحت تنش خشکی پلی اتیلن گلایکول (PEG) در سه سطح صفر (شاهد)، و ۰/۹- و ۱/۴- مگاپاسکال در گیاه آلوروپوس لیتورالیس که نزدیک‌ترین خانواده به غلات می‌باشد، از روش cDNA-AFLP استفاده شد. از میان ۲۱ توالی EST جداسازی شده، ۱۷ توالی EST با طول میانگین ۲۷۰ جفت باز بدست آمد که ۷۲ درصد از رونوشت‌ها با پروتئین‌ها و توالی‌های اسید نوکلئیک شناسایی شده در موجودات دیگر، شباهت نشان دادند. ۵ رونوشت هیچ تشابه قابل ملاحظه‌ای با پروتئین‌ها و توالی‌های اسید نوکلئیک شناسایی شده در موجودات دیگر در آزمون‌های هم‌ردیفی انجام شده نشان نداد و به عنوان ژن‌های بالقوه ناشناخته یا پروتئین‌های فرضی در نظر گرفته شدند. در مجموع ۱۷ توالی EST در پاسخ به تنش PEG در بانک ژن به ثبت رسید که مهم‌ترین آنها شامل گروه‌های پروتئینی زینک فینگر، کلی اکسالاز، آسپارتیک پروتئاز می‌باشند و نقش برخی از آنها در تنش خشکی مورد بحث قرار گرفت. نتایج این تحقیق احتمالاً در درک اساس مولکولی تحمل به تنش خشکی و مهندسی ژنتیک غلات و تولید گیاهان مقاوم موثر باشد.

واژه‌های کلیدی

آلوروپوس لیتورالیس

بیان ژن

خشکی

cDNA-AFLP
EST

مقدمه

خشکی از جمله تنش‌های فیزیکی است که به عنوان مهم‌ترین عامل محدود کننده رشد و تولید گیاهان زراعی در اکثر نقاط جهان و ایران شناخته شده است. (Blum 1996) اظهار داشته که خشکی به عنوان تنش چند بعدی، گیاهان را در سطوح مختلف ساختاری تحت تاثیر قرار می‌دهد. تنش در طبیعت عموماً به صورت انفرادی عمل نمی‌کند بلکه تنش‌های زیادی به موازات هم روی گیاه اثر می‌گذارند. طبیعت در پاسخ به پیام‌های حاصل از تنش، مسیرهای متنوعی در جهت غلبه و تحمل آنها گسترش داده است. این مسیرها به طور هماهنگ در جهت کاهش اثرات تنش عمل می‌کنند (Mahajan and Tuteja 2005). یکی از پیامدهای رایج ناشی از تنش خشکی، کاهش پتانسیل آب در بستر بذر می‌باشد. پتانسیل منفی بالای آب خصوصاً در مراحل اولیه جوانه‌زنی، منجر به کاهش جذب آب توسط دانه و مانع تداوم فرایندهای مربوط به جوانه‌زنی می‌شود (Boydak et al. 2003). خشکی به عنوان مهم‌ترین فاکتور کنترل کننده عملکرد محصولات، تقریباً روی کلیه فرایندهای رشد گیاه تاثیرگذار است (Siddique et al. 1999). یکی از تغییرات فیزیولوژیکی که به هنگام خشکی ممکن است روی دهد، تنظیم فشار اسمزی است. تنش اسمزی در واقع کمبود آب را به گیاه القا می‌کند (Umezawa et al. 2002; Horie 2012). تنظیم اسمزی به عنوان جزئی مهم از مکانیسم‌های تحمل به خشکی در گیاهان مطرح است (Pagter et al. 2005). گیاهان در شرایط متفاوت محیطی، مواد محلول سازگار از قبیل اسیدهای آمینه، قندها و یون‌ها را سنتز می‌کنند. تجمع این مواد سبب کاهش پتانسیل آب اندام‌های گیاهی شده و جذب آب توسط گیاه را امکان‌پذیر می‌سازد (Pagter et al. 2005). در بسیاری از گیاهان حفظ تورژسانس توسط تنظیم اسمزی موجب بهبود عملکرد و زنده‌مانی آنها در شرایط تنش خشکی می‌شود. گیاهان از طریق تغییر در فرایندهای موفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیسمی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. غلظت هورمون آبسزیک اسید (ABA) در اندام‌های گیاهی در پاسخ به تنش خشکی افزایش می‌یابد و نقش اصلی را در سازگاری به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. ژن‌های گوناگونی در پاسخ به فقدان آب در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (Bray 1997; Campalans et al. 1999).

تنش خشکی را می‌توان با اعمال تیمار پلی اتیلن گلیکول (PEG) به گیاه القا کرد. PEG پتانسیل اسمزی را در محیط رشد گیاه پایین آورده و دسترسی بذور به آب را کاهش می‌دهد (Michel and Kaufman 1973). برای اینکه گیاه به تنش غیرزنده خاصی سازگار شود نیاز به پاسخ ویژه‌ای دارد که مطابق با شرایط آن تنش خاص، طراحی شده باشد. بنابراین، فرایندهای مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی که با یک تنش خاص فعال می‌شوند ممکن است متفاوت با ترکیبات فعال شده در شرایط غیر تنش باشد. به این منظور مطالعه پروفایل ترنسکریپتوم در گیاهانی که در معرض تنش‌های غیر زنده متفاوت قرار دارند اهمیت دارد (Rizhsky et al. 2004). یکی از روش‌های موثر و کارآمد جهت تجزیه ترنسکریپتوم و شناسایی رونوشت‌های پاسخگو به تنش اسمزی غیر یونی، تکنیک¹ cDNA-AFLP می‌باشد (Bachem et al. 1998). در این روش بدون نیاز به داشتن اطلاعاتی در خصوص توالی موجود هدف، امکان شناسایی سریع و آسان رونوشت‌های دخیل در مقاومت به تنش فراهم می‌شود. علاوه بر آن، این روش بسیار حساس بوده و ژن‌هایی که میزان رونوشت آنها بسیار کم می‌باشد نیز قابل بررسی است (Fukumura et al. 2003). به منظور شناسایی و تعیین اساس ژنتیکی مکانیسم‌های درگیر در تحمل به خشکی (تنش آبسزیک اسید) در بادام (*Prunus amygdalus L.*) Batsch از تکنیک cDNA-AFLP استفاده شد که منجر به شناسایی EST‌های مرتبط با توالی‌های پروتئینی مشابه با انتقال دهنده ترکیبات نیتروژن‌دار، پروتئین‌های شوک حرارتی، سیستمین پروتئیناز و پروتئین‌های سرشار از پرولین شد (Campalans et al. 2001). با استفاده از روش cDNA-AFLP، در بررسی پاسخ گیاه *Citrullus colocynthis* به تنش خشکی پلی اتیلن گلیکول، ۸۴ TDF شناسایی شد (Si et al. 2009). همچنین با استفاده از این تکنیک ۹۰ TDF در پاسخ گیاه *Setaria italic* به تنش شوری (Jayaraman et al. 2008)، ۶۴ TDF در پاسخ گونه‌های مختلف گیاه نیشکر (*Saccharum spp*) به پاتوزن (LaO et al. 2008) و ۸۹ TDF در پاسخ گیاه چای به تنش خشکی شناسایی شد (Gupta et al. 2013). همچنین (Fatemi et al. 2013)، ۶۹ TDF

¹ Amplified restriction fragment polymorphism

در پاسخ گیاه *Aeluropus littoralis* به تنش NaCl را توالی‌یابی کردند که مهمترین آنها شامل گروه‌های پروتئین‌های ریبوزومی، فاکتورهای رونویسی و ترجمه، انتقال‌دهنده‌ها و پروتئین‌های دخیل در کاتابولیسم بوده است. در پاسخ مولکولی گیاه *Aeluropus lagopoides* به تنش خشکی، ۱/۵ درصد رونوشت‌ها تحت تاثیر قرار گرفتند. با استفاده از تکنیک DD-AFLP ژن‌هایی با بیان افتراقی شناسایی شدند که در پیام‌رسانی، تنظیم بیان ژن و تنظیم اسمزی نقش دارند (Mohsenzadeh et al. 2006).

گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* از علف‌های چند ساله دارای استولون می‌باشد که در مناطق بیابانی و کویری ایران یافت شده و از گونه‌های هالوفیت مناطق بیابانی و شوره‌زار محسوب می‌شود (Akhami and Ghorbanli 1993). این گونه از خویشاوندان وحشی و از تیره گندم می‌باشد که از مدت‌ها پیش جهت مرتعداری و ویژگی‌های فیزیولوژیکی مورد توجه بوده است. متابولیسم این گیاه از نوع C4 بوده که به آن انعطاف‌پذیری بیشتری در برابر تنش‌های خشکی و شوری می‌دهد. این گیاه به دلیل توانایی زیاد آن در تحمل سطوح بالای شوری و خشکی، پتانسیل تبدیل شدن به منبعی ژنتیکی گرانبها از نظر کشف مکانیسم‌های پاسخ به شوری و خشکی در تک‌لپه‌ای‌ها را دارد. همچنین به دلیل نزدیکی رابطه خویشاوندی این گیاه با گندم و برنج، توانایی بهبود تحمل تنش‌های غیر زیستی را در این گیاهان امکان‌پذیر می‌سازد (Akhami and Ghorbanli 1993 ; Gulzar and Khan, 2001). به طوری که در دورگ‌گیری سوماتیکی (امتزاج پروتوپلاست)، انتقال ژن‌های مقاومت به تنش NaCl از *Aeluropus littoralis* به گندم (*Triticum aestivum*) با موفقیت انجام شد (Wei et al. 2001).

اگرچه مکانیسم‌های تحمل به خشکی به طور وسیعی در گیاهان مدل مورد مطالعه قرار گرفتند، اما تاکنون در پاسخ این گیاه به تنش اسمزی غیر یونی در زمینه مطالعه الگوهای بیان ژن اقدامی صورت نگرفته است. مشخص کردن این ژن‌ها به خصوص در گیاه هالوفیت *A. littoralis*، جهت اصلاح و مهندسی ژنتیک، در بهبود مقاومت غلات در برابر این تنش و تولید گیاهان مقاوم ضروری است.

مواد و روش‌ها

این آزمایشات در سال ۱۳۹۱ در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان اجرا شد. بذور *A. littoralis* از مرکز تحقیقات پاکان بذر اصفهان تهیه شد و پس از استریل‌سازی در داخل ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع موراشیک و اسکوک فاقد هورمون، غنی شده با سوکروز سه درصد و ویتامین قرار داده شدند (Murashige and Skoog 1962). گیاهان در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۷ روز نگهداری شدند. سپس گیاهچه‌ها تحت تیمار صفر (شاهد)، ۰/۹- و ۱/۴- مگاپاسکال از PEG در ۵ تکرار قرار گرفتند. پس از ۷ روز نمونه‌ها برداشت شده و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس ریشه‌ها از اندام هوایی جداسازی شده و سریعاً در نیتروژن مایع قرار گرفته و جهت استفاده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA موجود در ریشه گیاهان تحت تنش خشکی و شاهد در سه تکرار بلافاصله پس از برداشت با کیت جداسازی RNA (تراپزول Cat.

الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل اکریل آمید دناتوره ۶ درصد انجام گرفت. عکسبرداری از الگوی بانندی بدست آمده با استفاده از دستگاه دنسیتومتر (GS-800, Imaging densitometer (BioRad, USA) صورت گرفته و در ادامه تجزیه TDFها با استفاده از نرم افزارهای Quantity one و Total Lab TL120 صورت گرفت.

جداسازی TDFها از ژل

باندهایی که با هدف بیان اختصاصی در سطح شاهد و تیمار خشکی حالت افزایش بیان و یا بیان افتراقی را نشان داده بودند از ژل جدا شده و دقیقاً مشابه مرحله تکثیر پیش انتخابی تکثیر شدند. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز دو درصد و جریان برق ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند و پس از تایید اندازه باند بر روی ژل، همسانه سازی شدند. همسانه سازی محصولات PCR در پلاسمید pTZ57R/T شرکت فرمنتاز (InsTAclone PCR Cloning Kit) انجام شد. و توالی یابی TDFها با استفاده از آغازگرهای M13 شرکت GATC کشور آلمان صورت گرفت.

تجزیه بیوانفورماتیک

به منظور تولید ESTها از کتابخانه‌های ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit و Chromas توالی ناقل، توالی‌های آداپتور، توالی Poly A و توالی‌های دارای کیفیت پایین حذف شد. به منظور کسب اطلاعات بیشتر درباره عملکرد ESTهای جداسازی شده از گیاهانی که توالی ژنوم آنها هنوز بطور کامل در دسترس نیست می‌توان از نرم افزار بلاست (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) در پایگاه اطلاعاتی NCBI² استفاده کرد. از اینرو با بلاست توالی انتخاب شده با استفاده از الگوریتم BLASTx³، BLASTn⁴ و tBLASTx⁵ در بانک ژن (NCBI GenBank)، میزان تشابه آنها با دیگر توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی مورد آزمون همردیفی قرار گرفت (Altschul et al. 1997). همچنین به منظور بررسی عملکرد هر EST به عنوان نماینده‌ای از یک ژن و نقش آن در فرایند بیولوژیکی و همچنین

شرکت اینویترژن مطابق دستورالعمل ذکر شده (No. 15596-018) RNA استخراج شده از تکرارهای مختلف مربوط به هر سطح خشکی جهت کاهش خطای آزمایشی بین تیمارها با یکدیگر ترکیب شدند. برای تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب از روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز استفاده شد. نرمال سازی RNA استخراج شده در هر تیمار به روش Q-PCR و با استفاده از ژن اکتین صورت گرفت. در ادامه استخراج mRNA و ساخت رشته اول و دوم cDNA با دستورالعمل کیت mRNA Capture شرکت Roche و با استفاده از تیوپ‌های PCR حاوی streptavidin انجام شد (Feron et al. 2004).

هضم آنزیمی¹ با استفاده از ۴۰۰ نانوگرم از هر یک از نمونه‌های dsDNA حاصل از مرحله قبل به وسیله ده واحد از آنزیم‌های *TaqI* و *MseI* (شرکت فرمنتاز) صورت گرفت. در ادامه، واکنش اتصال به مخلوط حاصل از مرحله هضم آنزیمی، با استفاده از آداپتورهای اختصاصی صورت گرفت. محصولات مرحله اتصال با استفاده از ترکیب آغازگری *MseI* +N و *TaqI* +N در معرض واکنش مرحله پیش تکثیر قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر بر طبق الگوی دمایی زیر انجام گرفت. تکثیر محصولات PCR در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۵ چرخه با ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. توالی آداپتورهای مورد استفاده برای رشته بالایی و پایینی به ترتیب شامل توالی‌های *Taq I*: 5'-GACGATGAGTCCTGAC-3' و *Taq I*: 5'-CGGTCAGGACTCAT-3' توالی آغازگرهای پیش تکثیر مورد استفاده شامل *Taq I*: 5'-GACGATGAGTCCTGACCGA-3' و *Mse I*: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' می‌باشد.

پس از پایان واکنش، مخلوط حاصل ۲۰ برابر رقیق شد. سپس مرحله پیش تکثیر با آغازگر دو نوکلئوتیدی مجدداً تکرار گشت. محصولات مرحله پیش تکثیر با استفاده از آغازگرهای دارای دو باز انتخابی *Mse I* +2: CC / CA / CT و *Taq I* +2: GG / GC / AC / CT در انتهای ۳' مورد تکثیر انتخابی قرار گرفتند.

¹ Digestion

² National center for biotechnology service

³ Search protein database using a translated nucleotide query

⁴ Search a nucleotide database using a nucleotide query

⁵ Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

در این میان ۷۲ درصد از رونوشت‌ها با پروتئین‌ها و توالی‌های اسید نوکلئیک شناسایی شده در آرگانیسیم‌های دیگر، شباهت نشان دادند. در نهایت ۵ رونوشت هیچ تشابه قابل ملاحظه‌ای در آزمون‌های هم‌ردیفی انجام شده نشان نداد و به عنوان ژن‌های بالقوه دخیل در تنش خشکی در نظر گرفته شدند. نتایج حاصل از بررسی عملکرد مولکولی برخی از ESTها (به عنوان نماینده‌ای از یک ژن) و نقش آنها در فرایند بیولوژیکی و همچنین محل قرارگیری آنها در سلول در جدول ۲ ارائه شده است. در پایگاه اطلاعاتی (<http://www.geneontology.org>) بر پایه تجزیه و تحلیل‌های علمی، هر EST بر اساس عملکرد، نحوه فعالیت و مکان سلولی خود به گروه خاصی اختصاص یافت.

دسته‌بندی الگوهای بیانی مشاهده شده در پاسخ گیاه *A. littoralis* به تنش خشکی الگوهای بیانی متفاوتی مشاهده شد که می‌توان آنها را به پنج گروه کاملاً مجزا دسته‌بندی کرد. (۱) TDFهایی که در اثر افزایش میزان خشکی تظاهرشان افزایش می‌یابد؛ (۲) TDF-هایی که در اثر افزایش میزان خشکی تظاهر آنها کاهش می‌یابد؛ (۳) TDFهایی که در اثر اعمال تنش تظاهرشان متوقف شده و خاموش می‌شوند؛ (۴) TDFهایی که در گیاه شاهد خاموش بوده و در اثر اعمال تنش تظاهر یافته است؛ (۵) TDFهایی که تظاهر آنها هم در شرایط عادی رشد گیاه و هم تحت تنش هیچ تغییری نکرده و ثابت بوده‌اند. ژن‌هایی که حالت توقف بیان را نشان دادند، TDFهایی هستند که در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف PEG وجود نداشته و فقط در گیاهان شاهد قابل شناسایی بودند و در مقابل ژن‌های فعال شده تنها در گیاهان تحت تنش قابل شناسایی بوده و در گیاهان شاهد بیان نشدند که در این مطالعه ژن‌های این گروه مورد بررسی قرار گرفت. TDFهایی که حالت افزایش یا کاهش بیان را نشان دادند رونوشت‌هایی بودند که هم در گیاهان شاهد و هم تحت تنش حضور داشته ولی زمانیکه نسبت به گیاهان شاهد مقایسه شدند حالت افزایش یا کاهش بیان را نشان دادند. در پژوهش‌های صورت گرفته توسط (Jayaraman et al. 2008) بر روی گیاه (*Foxtail Millet*) *Setaria italic L.* و در بررسی پاسخ هالوفیت *Kosteletzkya virginica* به تنش شوری چنین الگوهای بیانی مشاهده شد (Guo et al. 2009). در شکل ۴ درصد فراوانی TDF بر اساس

محل قرارگیری آنها در سلول، از پایگاه اطلاعاتی (<http://www.geneontology.org>) استفاده شد. بر پایه تجزیه و تحلیل‌های علمی در این پایگاه، هر EST بر اساس عملکرد، نحوه فعالیت و مکان سلولی خود به گروه خاصی اختصاص یافت.

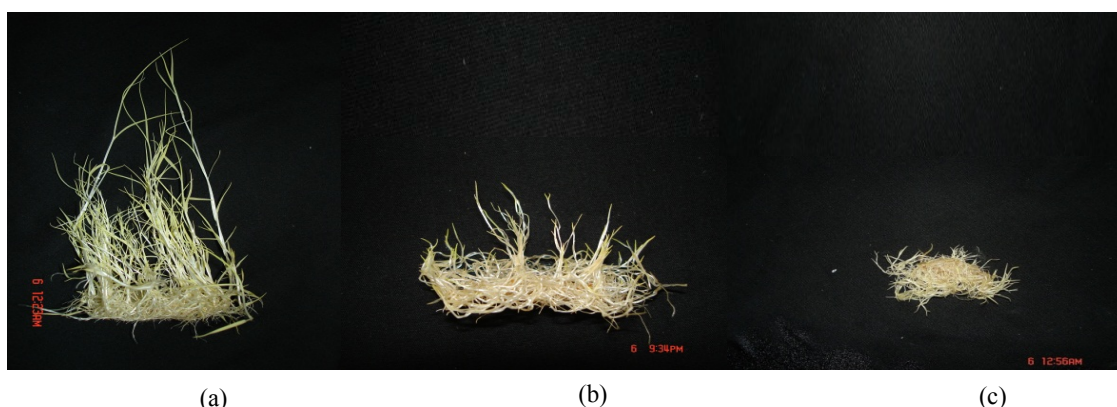
نتایج و بحث

بدور آلوروپوس لیتورالیس در پاسخ به سطوح مختلف تنش خشکی، پاسخ‌های رشدی متفاوتی نشان دادند (شکل ۱). سطح ۰/۹- مگاپاسکال آستانه تحمل این گیاه است و در سطح ۱/۴- مگاپاسکال کاهش رشد آن در مقایسه با شاهد مشاهده شد. پیش از آغاز تجزیه افتراقی انتخاب ترکیب‌های آغازگری مناسب جهت بهینه سازی الگوی باندهی صورت گرفت. از ۱۲ ترکیب آغازگری استفاده شده در این تحقیق، ۷ ترکیب باندهای واضحی را ایجاد نمودند که جهت تجزیه ترانسکریپتوم انتخاب شدند. جهت شناسایی رونوشت‌هایی که بصورت افتراقی بیان شده بودند، الگوهای بیانی در ریشه در سطوح مختلف خشکی نسبت به شاهد بررسی شد. از ۷ ترکیب آغازگری به کار رفته در این تحقیق در مجموع ۱۱۴ TDF قابل امتیازدهی تولید شد که ۴۲ باند آن چند شکل بودند. تعداد باندهای تولید شده به وسیله هر جفت آغازگرهای مورد استفاده از ۵۰ تا ۷۰ و تعداد نوارهای چند شکل از ۱۵ تا ۲۵ عدد متغیر بود. میانگین تعداد باندهای امتیازدهی شده در هر جفت آغازگر ۶۳ درصد و باندهای چند شکل ۲۴ درصد محاسبه شد.

بر اساس تجزیه‌های کیفی صورت گرفته در کل ۲۱ EST از ژل اکریل‌آمید جداسازی، تکثیر مجدد و خالص‌سازی شد و بعد از همسانه‌سازی برای توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای M13 ارسال شد. توالی ناقل، آداپتور، توالی Poly A و توالی‌های دارای کیفیت پایین از توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزارهای BioEdit و Chromas حذف شدند که در نهایت ۱۷ EST با طول میانگین ۲۷۰ جفت باز در بانک ژن به ثبت رسید که بازده توالی یابی ۸۰ درصد بود. تشابه این توالی‌های انتخاب شده با استفاده از الگوریتم BLASTx، BLASTn و tBLASTx در بانک ژن (NCBI GenBank) با دیگر توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن مورد آزمون هم‌ردیفی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج حاصل از آزمون هم‌ردیفی TDFهای پاسخگو به تنش خشکی PEG در *Aeluropus littoralis* با استفاده از الگوریتم BLASTx در بانک ژن (NCBI GenBank). همولوژی مشتق شده از رونوشت‌ها با پروتئین‌های پاسخگو به تنش‌های غیر زیستی از طریق بلاست کردن توالی‌ها با توالی‌های موجود در میکروارگانسیم‌های دیگر ارائه شده است. هرچه درصد هم‌پوشانی و شباهت توالی‌ها بیشتر باشد اطمینان از عملکرد و صحت توالی‌های بدست آمده بیشتر خواهد بود.

EST name	GenBank Acc	Organism	EST length (bp)	Sequence homology	Query coverage	Max ident	E value
GABIT53	JZ191094	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	231	glyoxalase I	22%	88%	0.031
GABIT9	JZ191050	<i>Staurastrum punctulatum</i>	261	envelope membrane protein	43%	39%	3.5
GABIT27	JZ191068	Micromonas sp	403	ADP-glucose pyrophosphorylase	54%	32%	1.2
GABIT20	JZ191061	<i>Glycine max</i>	133	zinc finger CCCH domain-containing protein 40-like	60%	50%	6.7
GABIT5	JZ191046	<i>Sorghum bicolor</i>	306	hypothetical protein	23%	83%	5e-05
GABIT8	JZ191049	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	265	aspartic proteinase	56%	38%	1.4
GABIT51	JZ191092	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	260	importin subunit beta-1-like	90%	97%	1e-43
GABIT61	JZ191102	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	180	Zinc finger CCCH domain-containing protein 24;	63%	97%	6e-16

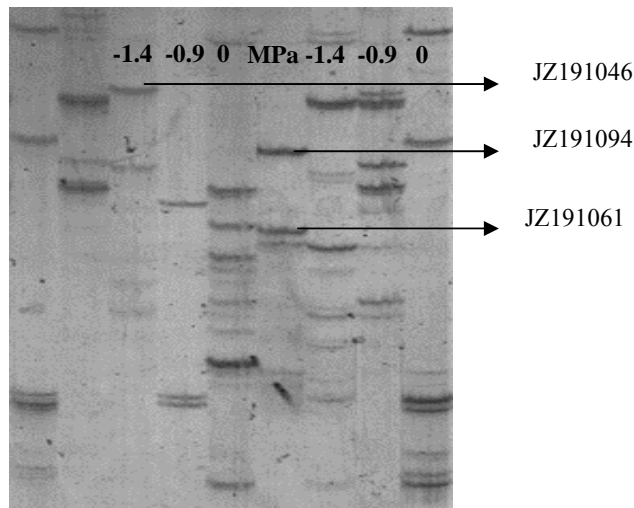


شکل ۱- پاسخ رشدی گیاه آلوروپوس لیئورالیس به سطوح مختلف تنش خشکی PEG در سطوح (a) صفر (شاهد); (b) ۰/۴ - مگاپاسکال; (c) ۱/۴ - مگاپاسکال.

هر چه بهتر مکانیسم‌های تحمل تنش شوری از طریق جداسازی و خصوصیت‌یابی ژن کامل این توالی‌های ناشناخته فراهم می‌آوردند. در این تحقیق TDF با کد دسترسی JZ191061 در NCBI با پروتئین -zinc finger CCCH domain-containing protein 40-like هم‌ردیفی بالایی نشان داد. نوع CCCH پروتئین‌های زینک فینگر شامل خانواده بزرگی از پروتئین‌ها می‌باشد. مشاهدات پیشین نشان می‌دهد این پروتئین‌ها پروتئین‌هایی هستند که به RNA و یا DNA متصل می‌شوند و در تنظیم فعالیت‌های فراوری mRNA نقش دارند (Bai and Tolias 1996). به هر حال تاکنون اطلاعات بسیار کمی از نقش این پروتئین‌ها در فرایندهای رشد و

همولوژی آنها با پروتئین‌های دارای عملکرد مشخص نشان داده شده است.

در این پژوهش به منظور پوشش دادن به کل ترانسکریپتوم و با در نظر گرفتن معیارهایی همچون افزایش احتمال جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی، ترکیب آنزیم‌های برشی *Mse I / Taq I* جهت هضم cDNA انتخاب شد که از جایگاه شناسایی آنزیم ۴ بازی (4 base cutter) برخوردارند. در این تحقیق ۵ رونوشت هیچ تشابه قابل ملاحظه‌ای در آزمون‌های هم‌ردیفی انجام شده نشان نداد که می‌توان آنها را به عنوان ژن‌های کاندید جهت مطالعات بیشتر در نظر گرفت. این ژن‌های کاندید احتمالاً زمینه لازم را برای درک



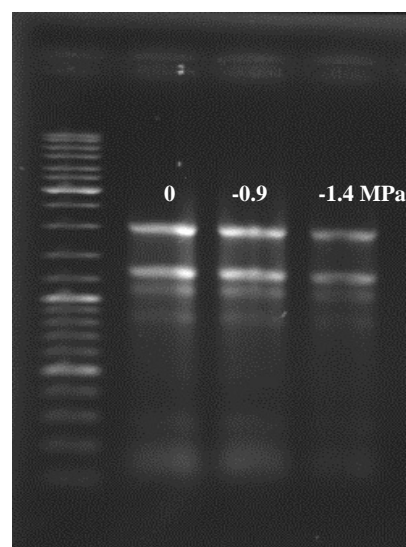
شکل ۲- TDFهای پاسخگو به تنش خشکی PEG در غلظت های صفر، ۱/۹- و ۱/۴- مگاپاسکال در گیاه آلوروپوس لیئورالیس در ژل پلی اکریل آمید.

آب افزایش یافت (Espartero et al. 1995). علاوه بر تنش نمک و تنش آب، افزایش سطح رونوشت گلی‌اکسالاز I در پاسخ به فلز سنگین روی و مانیتول نیز در گیاه *Brassica juncea* مشاهده شد (Reddy et al. 1999). در واقع تنش‌های نمک، آب، مانیتول و فلز سنگین، به طور قابل توجهی سبب افزایش سطح رونوشت، پروتئین و فعالیت خاص گلی‌اکسالاز I می‌شوند. این امر نشان می‌دهد احتمالاً افزایش بیان گلی‌اکسالاز I اثری عمومی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی است. بیش بیان ژن گلی‌اکسالاز I (*GlyI*) در توتون تراریخت شده موجب افزایش قابل توجه تحمل گیاه در برابر غلظت بالای کلرید سدیم در مقایسه با نوع وحشی شد (Reddy et al. 1999). محققین نشان دادند در کلزا (*Brassica napus*) فعالیت دی‌هیدروآسکوربات ردوکتاز، گلوکاتایون-S-ترانسفراز، گلوکاتایون پراکسیداز و گلی‌اکسیلاز I به طور قابل توجهی تحت شرایط تنش خشکی افزایش یافت، در حالی که کاتالاز و فعالیت گلی‌اکسیلاز II کاهش یافت. همچنین افزایش شدید پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدی نیز با تنش خشکی القا شد (Hasanuzzaman and Fujita 2011). در این تحقیق TDF با کد دسترسی JZ191049 در NCBI همولوگ پروتئین آسپارتیک پروتئیناز شناخته شد. آسپارتیک پروتئیناز (AP) در سطح وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته و همچنین به طور گسترده‌ای در میان مهره‌داران، گیاهان، مخمرها، نامات‌ها، انگل‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها یافت شده است (Dunn 2002). با توجه به پایگاه داده (MEROPS ([http:// www.merops.ac.uk](http://www.merops.ac.uk)),

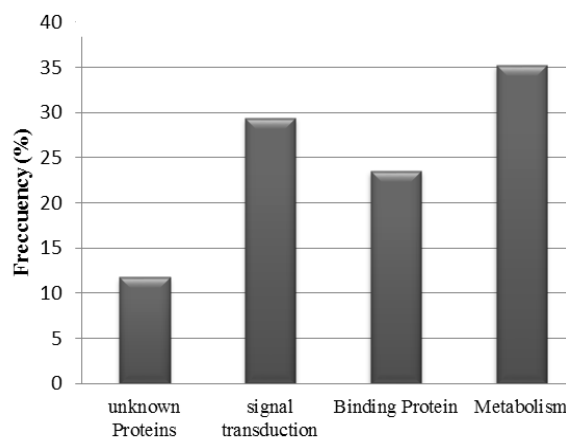
نموی گیاه در دست می‌باشد. یکی از مواردی که این پروتئین‌ها در آن نقش ایجاد می‌کنند پاسخ به شرایط تنش در گیاه می‌باشد، به طوری که بررسی عناصر سیس موجود در پروموتور ژن‌های این پروتئین‌ها نشان می‌دهد که بسیاری از این عناصر سیس با عناصر سیس موجود در پروموتور ژن‌های مقاومت به تنش خشکی مشابهت دارند (Peng et al. 2012). داده‌ها در این آزمایش نشان داد که بیان ژن Zinc finger CCCH نیز در پاسخ به بالاترین سطح تنش خشکی (PEG) مشاهده شده‌است. بنابراین می‌توان این ژن را به عنوان یک ژن پاسخگو به تنش خشکی در نظر گرفت. TDF با کد دسترسی JZ191094 در NCBI همولوگ پروتئین گلی‌اکسالاز شناخته شد. سیستم گلی‌اکسالاز در طبیعت شامل دو آنزیم: گلی‌اکسالاز I و گلی‌اکسالاز II می‌باشد که به طور هماهنگ با استفاده از کاهش گلوکاتایون به عنوان یک کوفاکتور جهت تبدیل 2-oxoaldehydes به 2-hydroxyacids عمل می‌کنند (Thornalley 1993). نقش این سیستم حفاظت در مقابل سمیت سلولی α -oxoaldehyde، تنظیم و تکثیر تقسیم سلول، مونتاژ میکروتوبول‌ها و تحرک وزیکول می‌باشد (Thornalley 1993; 1990). این پروتئین در فرایند متابولیک کربوهیدرات، فرآیند بیوسنتز سیستمین، گلوکونوژنز، گلیکولیز، فرایند کاتابولیک methylglyoxal به D-لاکتات، پاسخ به یون کادمیوم و پاسخ به تنش شوری نقش دارد. با این حال، یک رابطه علت و معلولی بین فعالیت گلی‌اکسالاز و رشد سریع سلول هنوز مشخص نیست. بیان ژن گلی‌اکسالاز I در گوجه فرنگی تحت تنش شوری و تنش

میکروب‌ها یا ویروس‌ها به عهده دارند (Mutlu and Gal 1999); در برگ‌های توتون و گوجه-فرنگی یک اسپارتیک پروتئیناز خارج سلولی شناسایی شده است که در تخریب پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن (Pathogen related protein) نقش دارد. این پروتئین‌ها به عنوان پاسخ گیاهان به شرایط‌های مختلف تنش زنده یا غیر زنده محسوب می‌شوند که در فضاهای بین سلولی سنتز و انباشته می‌شوند. یکی از نقش‌های احتمالی این پروتئین‌ها در مکانیسم حفاظتی برای PR پروتئین‌ها، ممانعت از تجمع بیش از حد آنها و در نتیجه تنظیم عملکردهای بیولوژیک این پروتئین‌های القاء شده از تنش می‌باشد (Rodrigo et al. 1989 and 1991; Simões and Faro 2004). القای بیان ژن AP نیز در برگ‌های گوجه فرنگی با زخمی شدن و یا تیمار با متیل جاسمونات شناسایی شد که به عنوان پروتئین‌های دفاعی در مقابل پاتوژن‌ها عمل می‌کنند (Schaller and Ryan 1996). در ارقام لوبیای حساس به خشکی که در معرض تنش‌های غیر زنده مانند کمبود آب قرار گرفتند، بیان ژن AP و در نتیجه فعالیت AP به طور معنی‌داری افزایش یافت.

پاسخ‌هایی که گیاهان به انواع تنش‌ها می‌دهند توسط مسیرهای پیام‌رسانی چندگانه تنظیم می‌شوند و همپوشانی بسیار زیادی بین الگوهای بیان ژن‌هایی وجود دارد که تحت تاثیر تنش‌های مختلف القا می‌شوند (Singh et al. 2002). بدین صورت که الگوهای بیان ژن مشاهده شده در اثر تنش خشکی، ممکن است همپوشانی زیادی با آن دسته از الگوهای بیانی داشته باشد که در پاسخ به تنش شوری و یا دیگر تنش‌های غیر زیستی مشاهده شده است. چرا که تمامی تنش‌ها می‌توانند به نوعی باهم در ارتباط باشند. بسته به شرایطی که گیاه در معرض آن قرار دارد، برخی از ژن‌هایی که بیان می‌شوند ممکن است ناشی از تنش ثانویه گیاه باشد. این عدم اطمینان وجود دارد که آیا این ژن‌ها به طور مستقیم توسط خود تنش و یا در نتیجه اثرات ناشی از تنش (تنش‌های ثانویه) القا می‌شوند. تکنیک‌های از قبیل خاموش کردن و یا بیان بیش از حد ژن‌های مرتبط با انتقال سیگنال، ممکن است نقش این ژن‌ها را در مسیرهای پیام‌رسانی تایید کند. بررسی الگوی بیان بیشتر ژن‌هایی که در این مطالعه مشخص شده‌اند، با استفاده از تکنیک‌هایی از جمله Real time PCR می‌تواند منجر به درک



شکل ۳- RNA استخراج شده در غلظت‌های صفر، -۰/۹ و -۱/۴ MPa در گیاه آلورپوس لیئورالیس تحت تنش خشکی در ژل آگارز.



شکل ۴- طبقه‌بندی TDFهای شناسایی شده بر اساس میزان شباهت آنها با پروتئین‌های دارای عملکرد مشخص در گیاه *Aeluropus littoralis*.

(Rawlings and Barrett 1999). اسپارتیک پروتئینازها بر اساس هومولوژی توالی اسید آمینه خود به ۱۴ خانواده مختلف گروه بندی می‌شوند، که به نوبه خود به شش گروه مختلف بر اساس رابطه تکاملی خود و ساختار سوم تقسیم می‌شوند. اسپارتیک پروتئینازها در بسیاری از گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی و استخراج شده‌اند. با این حال، عملکردهای بیولوژیک آنها به وضوح آنچه که در پستانداران، میکروب‌ها یا ویروس‌ها مشخص و خصوصیت‌یابی شده، تعیین نشده‌است. این پروتئین‌ها عملکرد متنوع و مختلفی مانند پردازش پروتئین‌های خاص، تخریب پروتئین، پردازش پلی‌پروتئین‌های ویروسی در پستانداران،

جدول ۲- نتایج حاصل از اونتولوژی برخی ESTها) این طبقه‌بندی به مفهوم توصیف فرآورده‌های ژن بر اساس عملکرد مولکولی، فرایند بیولوژیکی و اجزا سلولی می‌باشد. (http://www.geneontology.org)

EST name	Biological Process	GO category	
		Molecular Function	Cell complement
GABIT53	Carbohydrate metabolic process, gluconeogenesis, glycolysis, response to salt stress	lactoylglutathione lyase activity, metal ion binding	envelope, cytosol, mitochondrion, plasma membrane, vacuole
GABIT9	Ion /proton transport	proton extrusion	integral to membrane, plastid
GABIT27	glycogen /starch biosynthetic process	nucleotidyltransferase activity	Amyloplast
GABIT20	Regulatory/ mRNA processing	RNA/ DNA binding, zinc ion binding	nucleus

خانواده از جمله ذرت، گندم، جو و برنج بسیار مفید خواهد بود.

سپاسگزاری

از حمایت‌های مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان در تامین هزینه‌های این تحقیق سپاسگذاری می‌شود.

جامع‌تری از مکانیسم عملکردی این ژن‌ها در تحمل به تنش خشکی در گیاه آلوپوس لیتورالیس شود. به دلیل آنکه این گیاه از خانواده غلات می‌باشد دانش مکانیسم تحمل به خشکی و ژن‌های کلیدی درگیر در تحمل به خشکی در این گیاه، جهت اصلاح و مهندسی ژنتیک ارقام متحمل به خشکی در دیگر اعضای این

منابع

- Akhani H, Ghorbanli M (1993) A contribution to the halophytic vegetation and flora of Iran. In towards the rational use of high salinity tolerant plants. Springer Netherlands 1:35-44.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Bachem CWB, Van der hoven RS, De Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* 9:745-753.
- Bachem, CWB, Oomen RJFJ, Visser RGF (1998) Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* 16:157-173.
- Bai C, Tolias PP (1996) Cleavage of RNA hairpins mediated by a developmentally regulated CCH zinc finger protein. *Molecular and Cellular Biology* 16:6661-6667.
- Blum A (1996) Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regulation* 20:135-148.
- Boydak M, Dirik H, Tilki F, Calikoglu M (2003) Effects of water stress on germination in six provenances of *Pinus brutia* seeds from different bioclimatic zones in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 27:91-97.
- Bray E (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2:48-54.
- Campalans A, Messeguer R, Goday A, Pagès M (1999) Plant responses to drought, from ABA signal transduction

- events to the action of the induced proteins. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:1-14.
- Campalans A, Pages M, Messeguer R (2001). Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). *Tree Physiology* 21:633-643.
- Dunn BM (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical reviews* 102:4431-4458.
- Fatemi F, Nematzadeh Gh, Askari H, Hashemi HR (2013) Differential gene expression of *Aeluropus littoralis* in response to NaCl. *Annals of Biological Research* 4:110-115.
- Feron R, Mariani C, Vriezen WH (2004) Application of the mRNA Capture Kit in cDNA-AFLP. *Biochemica* 3:23-24.
- Espartero J, Sanchez-Aguayo I, Pardo JM (1995) Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Molecular Biology* 29:1223-1233.
- Fukumura R, Takahashi H, Saito T, Tsutsumi Y, Fujimori A, Sato S, Abe M (2003) A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. *Nucleic Acids Research* 31:e94-e94.
- Gulzar S, E Khan (2001) Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus logopoides*. *Annals of Botany* 87:319-324.
- Guo YQ, Tian ZY, Qin GY, Yan DL, Zhang J, Zhou WZ, Qin P (2009) Gene expression of halophyte *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress at early stage. *Genetica* 137:189-199.

- Gupta S, Bharalee R, Bhorali P, Das SK, Bhagawati P, Bandyopadhyay T, Gohain B, Das S (2013) Molecular analysis of drought tolerance in tea by cDNA-AFLP based transcript profiling. *Molecular Biotechnology* 53:237-248.
- Hasanuzzaman M, Fujita M (2011) Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research* 143:1758-1776.
- Horie T, Ichirou K, Maki K (2012) Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice* 5:11.
- Jayaraman A, Puranik S, Rai NK, Vidapu S, Sahu PP, Lata C, Prasad M (2008) cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *Molecular Biotechnology* 40:241-251.
- LaO M, Arencibia AD, Carmona ER, Acevedo R, Rodríguez E, León O, Santana I (2008) Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. *Plant Cell Reports* 27:1103-1111.
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139-158.
- Michel E, Kaufmann R (1973) The osmotic potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916.
- Mohsenzadeh S, Malboobi MA, Razavi K, Farrahi-Aschtiani S (2006) Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* (Poaceae) to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 56:314-322.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-97.
- Mutlu A, Gal S (1999) Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiologia Plantarum* 105:569-576.
- Pagter M, Bragato C, Brix H (2005) Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. *Aquatic Botany* 81:285-299.
- Peng X, Zhao Y, Cao J, Zhang W, Jiang H, Li X, Cheng B (2012) CCCH-Type zinc finger family in maize: genome-wide identification, classification and expression profiling under abscisic acid and drought Treatments. *PloS one* 7:e40120.
- Rawlings ND, Barrett AJ (1995) Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods in Enzymology* 248:105-120.
- Rawlings ND, Barrett AJ (1999) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 27:325-331.
- Reddy VS, Sopory SK (1999) Glyoxalase I from *Brassica juncea*: molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *Plant Journal* 17:385-395.
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R (2004) When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134:1683-1696.
- Rodrigo I, Vera P, Conejero V (1989) Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37-kDa aspartyl endoproteinase. *European Journal of Biochemistry* 184:663-669.
- Rodrigo I, Vera P, Van Loon LC, Conejero V (1991) Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins evidence for conserved mechanisms of degradation of pathogenesis-related proteins in plants. *Plant Physiology* 95:616-622.
- Schaller A, Ryan CA (1996) Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. *Plant Molecular Biology* 31:1073-1077.
- Si Y, Zhang C, Meng S, Dane F (2009) Gene expression changes in response to drought stress in *Citrullus colocynthis*. *Plant Cell Reports* 28:997-1009.
- Siddique MRB, Hamid A, Islam MS (1999) Drought stress effects on photosynthetic rate and leaf gas exchange of wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 40:141-145.
- Simões I, Faro C (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry* 271:2067-2075.
- Singh KB, Foley RC, Oñate-Sánchez L (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 5:430-436.
- Thornalley PJ (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of metabolic pathways fundamental to biological life. *Biochemical Journal* 269:1-11.
- Thornalley PJ (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 14:287-371.
- Umezawa T, K Mizuno, Fujimura T (2002) Discrimination of genes expressed in response to the ionic or osmotic effect of salt stress in soybean with cDNA-AFLP. *Plant, Cell and Environment* 25:1617-1625.
- Wei Y, Guangmin X, Daying Z, Huimin C (2001) Transfer of salt tolerance from *Aeluropus littoralis* sinensis to wheat (*Triticum aestivum* L.) via asymmetric somatic hybridization. *Plant Science* 161:259-266.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6:251-264.