

شناسایی و جداسازی رونوشت‌های پاسخگو به پتاسیم کلراید از گیاه آلوروپوس لیتورالیس

سیده فرزانه فاطمی^۱، قربانعلی نعمت‌زاده^{۲*}، حسین عسکری^۳، سید حمیدرضا هاشمی^۴

۱. کارشناس ارشد اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۲. استاد پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

۴. کارشناس ارشد اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۱۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۳۰)

Identification and Isolation of Transcripts in Response to KCl from *Aeluropus littoralis*

F. FATEMI¹, GH. NEMATZADEH^{2*}, H. ASKARI³, S. H. HASHEMI⁴

1. M.Sc. of Plant Breeding, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, University of Agriculture and Natural Resources of Sari, Sari, Iran, 2. Professor of Biotechnology, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, University of Agriculture and Natural Resources of Sari, Sari, Iran, 3. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, 4. M.Sc. of Plant Breeding, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, University of Agricultural Sciences and Natural Resources of Sari, Sari, Iran

(Received: Jun. 4, 2014 - Accepted: Sep. 21, 2014)

Abstract

Soil salinity limits crop production by creating osmotic stress and disruption of ion homeostasis, leads to damage at the molecular level and finally cell death. In this study, gene expression analysis based on cDNA-AFLP technique was used to compare the expression profiles of KCl stress at three levels: 0 (control), 200mM and 400mM, in *Aeluropus littoralis* which is the closest family to cereal. Among 34 isolated ESTs, 27 ESTs were obtained with the average length of 280 bp. The nucleotide sequences were compared with those in the GenBank database. Approximately 80% of the ESTs show homology to nucleotide or amino acid sequences in the GenBank database and 6 ESTs show no significant similarity in the GenBank database which considered as novel genes. Finally, 27 ESTs were recorded in NCBI database which are included potassium transporter, ribosomal protein, NADH dehydrogenase and golgin. The result of this research is very important to understand molecular basis and resistance mechanisms of drought stress for breeding and genetic engineering to improve crop resistance against stress and the production of resistant plants. EST classification based on responses to stress, will facilitate performance analysis, characterization of responsive genes in plant roots of *Aeluropus littoralis* to stress in future studies on this herb that is a member of the Poaceae family.

Keywords: *Aeluropus littoralis*, cDNA-AFLP, Gene expression, Salinity

چکیده

شوری خاک با ایجاد تنش اسمزی و بر هم زدن تعادل یونی تولیدات گیاهی را محدود می‌کند و منجر به خسارت در سطح مولکولی و نهایتاً مرگ سلول می‌گردد. در این تحقیق آنالیز بیان ژن مبتنی بر تکنیک cDNA-AFLP جهت مقایسه پروفایل بیانی ناشی از تنش شوری KCl در سه سطح ۰ (شاهد)، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار در گیاه آلوروپوس لیتورالیس که نزدیک‌ترین خانواده به غلات می‌باشد، انجام شد. از میان ۳۴ عدد EST جداسازی شده، ۲۷ عدد EST با طول میانگین ۲۸۰ جفت باز بدست آمد. در این میان ۸۰٪ از رونوشت‌ها با پروتئین‌ها و توالی‌های اسید نوکلئیک شناسایی شده در آرگانیزم‌های دیگر، شباهت نشان دادند. از طرفی دیگر، ۶ رونوشت به عنوان ژن‌های جدید در نظر گرفته شدند. در نهایت ۲۷ عدد EST در بانک ژن به ثبت رسید که مهمترین آنها شامل گروه‌های پروتئینی سینتاکسین، آدنوزیل متیونین دکربوکسیلاز و پروتئین‌های ریوزومی می‌باشند. گروه‌بندی ESTها بر مبنای نوع پاسخ به تنش‌ها، آنالیز عملکردی و خصوصیت یابی ژن‌های پاسخگو در ریشه گیاه آلوروپوس لیتورالیس به تنش مذکور را در مطالعات آتی روی این گیاه که از اعضای خانواده غلات می‌باشد، تسهیل خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: آلوروپوس لیتورالیس، بیان ژن، شوری، cDNA-AFLP

مقدمه

شوری خاک به عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده در کاهش تولید و بهره‌وری محصولات کشاورزی، سطح وسیعی از زمین‌های جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. غلظت بالای نمک خاک سبب ایجاد تنش اسمزی و اختلال در هم‌ایستایی و در نتیجه بر هم زدن تعادل یونی گیاهان شده و در نتیجه منجر به خسارت در سطح مولکولی، توقف رشد و نهایتاً مرگ سلول می‌گردد (Zhu, 2001). در میان عمومی‌ترین تأثیرات شوری در رشد گیاهان، محدودیتی که Na^+ و Cl^- در رشد و نمو گیاهان ایجاد می‌کنند و غالباً سبب بروز اختلال در سازوکار فتوسنتز می‌شوند حایز اهمیت است. یون کلر به عنوان یک آنیون متحرک، به دلیل کاهش رشد عمقی ریشه اثر عمده‌ای در کاهش دسترسی گیاه به آب دارد. این یون سبب کاهش رشد، ظهور کلروز و نکروز و ممانعت از جذب نیترات و فسفر می‌شود (Hasegawa et al., 2000). Santos و همکاران (۲۰۰۱) ثابت کردند که تنش KCl منجر به توسعه خصوصیات پیری در سلول‌های گیاه آفتابگردان می‌شود و این تغییرات به واسطه کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت صورت می‌گیرد (Santos et al., 2001). در چندین گونه گیاهی، افزایش غلظت یون کلر در محیط کشت منجر به کاهش سطح نیترات در بافت‌ها شد (Grattan and Grieve, 1992). اما با افزایش تنش KCl میزان آمینواسیدهای آزاد به شدت افزایش یافت (Santos, 1998). تنش KCl سطوح کلسیم را در اندام هوایی کاهش می‌دهد. این کاهش ممکن است به طور معنی‌داری ساختار غشاء و نفوذپذیری آن، ترکیبات دیواره سلولی و دیگر فرایندهای فیزیولوژیک را تحت تأثیر قرار دهد (Santos et al., 2001). همچنین KCl تجمع سطوح بالایی از پتاسیم را در سلول‌های آفتابگردان القاء کرد (Santos et al., 2001). ژن‌های گوناگونی در پاسخ به این عوامل دخالت

دارند که می‌توانند اثرات تنش را به حداقل رسانده و منجر به تنظیم محیط سلولی و تحمل گیاه شوند. شناسایی و جداسازی ژن‌هایی با فراوانی کم که بطور افتراقی بیان شدند یک فرایند چالش برانگیز است. به هر حال روش‌هایی که تاکنون برای شناسایی و کلون نمودن ژن‌های بیان شده بکار می‌رفت دارای محدودیت‌هایی نظیر عدم تکرارپذیری، عدم نشان دادن بیان‌های خیلی نادر و ایجاد داده‌های مثبت دروغین می‌باشند (Bauer et al., 1994). تغییرات زیادی نظیر بهبود فرایند طراحی پرایمر (Zhao et al., 1995; Diachenko et al., 1996) و تلفیق تکنیک‌های دیگر با انگشت‌نگاری RNA (Ivanova and Belyavsky, 1995) در جهت از بین بردن این مشکلات انجام پذیرفت. اما در هر حال مشکلات عدم تکرارپذیری و تردید در شناسایی قطعات مشخص برطرف نگردید. تکنیک $cDNA^-1$ AFLP (Bachem et al., 1996) بطور مؤثری بر این محدودیت‌ها غلبه نمود و بدون اینکه نیازمند این باشد که توالی موجود هدف از قبل شناخته شده باشد، امکان شناسایی سریع و آسان باندها را فراهم نمود. علاوه بر این، این روش بسیار حساس می‌باشد و ژن‌هایی که میزان رونوشت آنها بسیار کم می‌باشد قابل بررسی می‌باشند (Fukumura et al., 2003)، حتی ژن‌هایی که توسط ریزآرایه به سختی قابل بررسی می‌باشند (Evans et al., 2002).

گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* گیاهی چند ساله از خانواده گرامینه با سیستم فتوسنتزی C_4 است که قادر به تحمل سطوح بالای نمک تا ۱۱۰۰ میلی مولار می‌باشد (Gulzar and Khan., 2001). فرم ساختاری ریشه‌ها و تولید بذر این گیاه تحت شرایط تنش شوری به گونه‌ای است که به گیاه توانایی تحمل نسبت‌های بالای K^+ / Na^+ در

۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه (rpm) در داخل شیکر انکوباتور به مدت ۷ روز نگه‌داری شدند. سپس گیاهچه‌ها تحت تیمار ۰ (شاهد) و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار KCl 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 آتی در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

استخراج RNA و اجرای تکنیک cDNA-AFLP

RNA موجود در ریشه گیاهان تحت تنش شوری KCl و شاهد بلافاصله پس از برداشت با کیت جداسازی RNA (ترایزول -Cat. No. 15596) شرکت اینویترژن مطابق دستورالعمل ذکر شده در کیت استخراج شد. 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 استخراج شد. **هضم آنزیمی با استفاده از ۴۰۰ نانوگرم** از هر یک از نمونه‌های dsDNA حاصل از مرحله قبل به وسیله ده واحد از آنزیم‌های *MseI* و *TaqI* (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 پرایمری *MseI* +N و +N *TaqI* در معرض واکنش مرحله پیش تکثیر قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر بر طبق پروفایل زیر انجام گرفت. تکثیر محصولات PCR در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۵ سیکل با ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. توالی آغازگرهای پیش انتخابی مورد استفاده بشرح ذیل است:

محیط‌های شور و حفظ حالت عادی رشد بدون هیچگونه علائم سمی را اعطا می‌نماید. این گیاه به دلیل توانایی زیاد آن در تحمل سطوح بالای شوری و همچنین دارا بودن منابع ژنتیکی ارزشمند در پاسخ به تنش شوری و خشکی که یکی از مهم‌ترین مشکلات خانواده غلات می‌باشد حائز اهمیت است (Torbati-nejad *et al.*, 2001; Gulzar and Khan, 2001; Batanouny, 1994; Akhani and Ghorbanli, 1993).

اگرچه مکانیسم‌های متحمل نمک به طور وسیعی در گیاهان مدل مورد مطالعه قرار گرفتند، اما تا کنون در پاسخ این گیاه به تنش KCl در زمینه الگوهای بیان ژن اقدامی صورت نگرفته است. مشخص کردن این ژنها بخصوص در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* جهت اصلاح و مهندسی ژنتیک، در بهبود مقاومت غلات در برابر این تنش و تولید گیاهان مقاوم ضروری است. برای این هدف، آنالیز ترانسکریپتوم با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP تغییر یافته تحت عنوان Capture cDNA-AFLP به منظور شناسایی و دستیابی به ژن‌های درگیر در تحمل به تنش یون پتاسیم در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. از اهداف مطالعه حاضر، شناسایی EST‌های درگیر در پاسخ گیاه به تنش پتاسیم کلراید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

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 ۳٪ و ویتامین قرار داده شدند (Murashige and Skoog, 1962). سپس گیاهان در شرایط تاریکی در دمای

شده از گیاهانی که توالی ژنوم آنها هنوز بطور کامل در دسترس نیست می‌توان از نرم‌افزار بلاست^۲ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) در پایگاه اطلاعاتی NCBI استفاده نمود. از این‌رو با بلاست نمودن توالی انتخاب شده با استفاده از الگوریتم BLASTx^۳، BLASTn^۴ و tBLASTx^۵ در بانک ژن (NCBI GenBank)، میزان تشابه آنها با دیگر توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی مورد آزمون هم‌ردیفی قرار گرفت و برای آنالیزهای بعدی انتخاب گردیدند. همچنین به منظور بررسی عملکرد مولکولی هر EST به عنوان نماینده‌ای از یک ژن و نقش آن در فرایند بیولوژیکی و همچنین 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

پاسخ رشدی گیاهچه‌ها به تنش یون پتاسیم
 بذور آلوروپوس لیتورالیس در پاسخ به سطوح مختلف تنش یون پتاسیم، پاسخ‌های رشدی متفاوتی نشان دادند (شکل ۱). در سطح 200 mM آستانه تحمل این گیاه بوده و در سطح 400 mM کاهش رشد آن در مقایسه با شاهد مشاهده شد. جهت اجرای تکنیک cDNA-AFLP انتخاب ترکیب‌های پرایمری مناسب جهت بهینه‌سازی الگوی بانددهی صورت گرفت. در این تحقیق از ۱۰ ترکیب پرایمری استفاده شد که در این میان ۶ ترکیب باندهای واضحی را

TaqI:
 5'-GACGATGAGTCCTGACCGA-3'
 MseI: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
 پس از پایان واکنش، مخلوط حاصل ۲۰ برابر رقیق شد. سپس مرحله پیش تکثیر با پرایمر دو نوکلئوتیدی مجدداً تکرار گشت. محصولات مرحله پیش تکثیر با استفاده از آغازگرهای دارای دو باز انتخابی +2 *TaqI* و +2 *MseI* در انتهای ۳' مورد تکثیر انتخابی قرار گرفتند. محصولات PCR جهت الکتروفورز بر روی ژل اکریل آمید دناتوره ۶ درصد مورد استفاده قرار گرفت. عکسبرداری از الگوی باندهای بدست آمده با استفاده از دستگاه دنسیتومتر (GS-800, Imaging densitometer, BioRad, USA) صورت گرفته و در ادامه آنالیز TDFها با استفاده از نرم‌افزارهای Quantity one و Total Lab TL120 صورت گرفت.

جداسازی TDFها از ژل و آنالیز بیوانفورماتیک

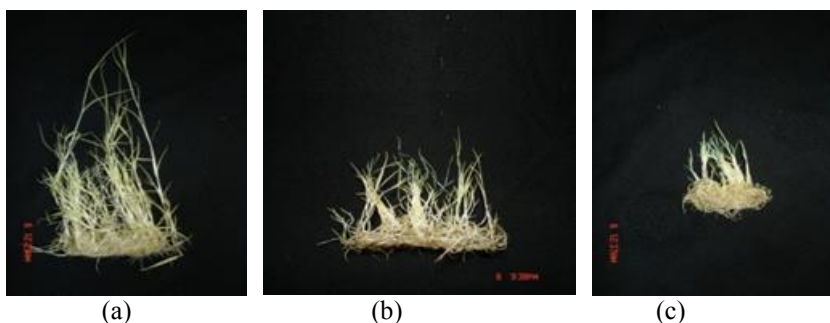
باندهائی که با هدف بیان اختصاصی در سطح شاهد و تیمار KCl حالت افزایش بیان و یا بیان افتراقی را نشان داده بودند از ژل جدا شده و دقیقاً مشابه مرحله تکثیر پیش انتخابی تکثیر گردیدند. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و پس از تایید اندازه باند بر روی ژل، کلون گردیدند. همسانه‌سازی محصولات PCR در پلاسمید pTZ57R/T شرکت فرمنتاز (InstAclone PCR Cloning Kit) انجام شد و توالی‌یابی TDFها با استفاده از پرایمرهای M13 در شرکت GATC کشور آلمان صورت گرفت. به منظور تولید ESTها از کتابخانه‌های ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit و Chromas توالی وکتور، توالی‌های آداپتور، توالی Poly A و توالی‌های دارای کیفیت پایین حذف گردید. به منظور کسب اطلاعات بیشتر درباره عملکرد ESTهای جداسازی

2. Blast (Basic Local Alignment Search Tool)
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

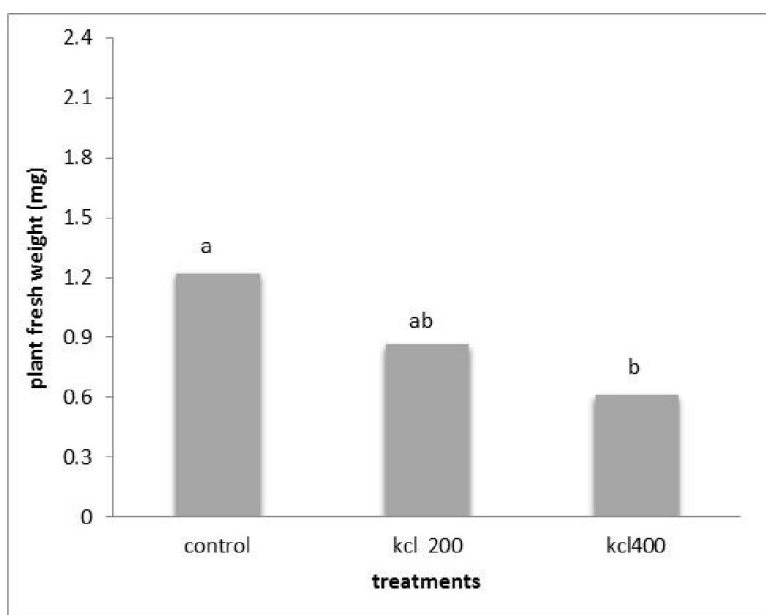
1. Transcript-derived fragments

مجموع ۱۰۵ TDF قابل امتیازدهی تولید کردند که ۳۶ باند آن چند شکل بودند. تعداد باندهای تولید شده به وسیله هر جفت آغازگرهای مورد استفاده از ۳۵ تا ۵۰ و تعداد نوارهای چند شکل از ۱۸ تا ۲۴ عدد متغیر بود.

ایجاد نمودند که جهت آنالیز ترانسکریپتوم انتخاب شدند. جهت شناسایی رونوشت‌هایی که بصورت افتراقی بیان شده بودند، الگوهای بیانی در ریشه در سطوح مختلف نمکی نسبت به شاهد بررسی شد. از ۶ ترکیب آغازگر به کار رفته در این تحقیق در



شکل ۱- پاسخ رشدی گیاه آلورپوس لیتورالیس به سطوح مختلف تنش KCl، صفر (شاهد) (a)، 200 mM (b) و 400 mM (c).



شکل ۲- تولید بیوماس در تیمار نمکی KCl در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار متفاوت بوده است اما در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار این نمک هیچ‌گونه کاهش معنی‌داری در تولید بیوماس نسبت به شاهد مشاهده نشد و این نشان‌دهنده آستانه تحمل این گیاه در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار و کاهش رشد گیاهچه‌ها با افزایش غلظت نمک می‌باشد.

مکانیسم افزایش خواهد داد (Craciun *et al.*, 2006). در این پژوهش به منظور پوشش دادن به کل ژنوم و تولید قطعاتی با قابلیت تفکیک روی ژل ۶٪ پلی‌اکریل آمید توالی‌های موجود از این گیاه در بانک ژن (NCBI) با در نظر گرفتن معیارهایی

توالی‌یابی و آنالیز ESTها









یکی از دلایلی که باعث پیچیدگی مقاومت به شوری در گیاهان می‌گردد این است که مقاومت به شوری توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود. بنابراین آنالیز کلی رونوشت‌ها درک ما را از این

و خالص‌سازی شد و بعد از کلون شدن برای توالی یابی با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت M13 ارسال گردید. به منظور تولید ESTها از کتابخانه‌های ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit و Chromas توالی وکتور، توالی‌های آداپتور، توالی Poly A و توالی‌های دارای کیفیت پایین حذف شد که در نهایت ۲۷ EST با طول میانگین ۲۸۰ جفت باز در بانک ژن به ثبت رسید که بازده توالی‌یابی ۷۹/۵٪ بود. این توالی‌های انتخاب شده با استفاده از الگوریتم BLASTx ، BLASTn و tBLASTx در بانک ژن (NCBI GenBank) میزان تشابه آنها با دیگر توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی مورد آزمون هم‌ردیفی قرار گرفت (جدول ۱). در این میان ۸۰٪ از رونوشت‌ها با پروتئین‌ها و توالی‌های اسید نوکلئیک شناسایی شده در ارگانسیم‌های دیگر، شباهت نشان دادند. در نهایت ۶ رونوشت هیچ تشابه قابل ملاحظه‌ای در آزمون‌های هم‌ردیفی انجام شده نشان نداد و به عنوان ژنهای جدید و ناشناخته در نظر گرفته شدند.

همچون جایگاه‌های آنزیم‌های برشی مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت ترکیب آنزیم‌های برشی *Mse* I / *Taq* I جهت هضم cDNA انتخاب گردید. پیش از آغاز آنالیز افتراقی انتخاب ترکیب‌های پرایمری مناسب جهت بهینه‌سازی الگوی باندهی صورت گرفت. در نهایت ۷ رونوشت به عنوان ژن‌های جدید در نظر گرفته شدند. این ژن‌های جدید فراهم آورنده زمینه‌ای برای درک هر چه بهتر مکانیسم‌های تحمل تنش شوری از طریق جداسازی و خصوصیت‌یابی ژن کامل این توالی‌های جدید و ناشناخته می‌باشد. بطوریکه در گیاه *Thellungiella halophila* حدود ۱۵٪ از TDFها (Wang et al., 2004)، در گیاه *Foxtail Millet* ۱۵٪ (Jayaraman et al., 2008)، و در گیاه سویا ۱۴٪ (Umezawa 2002)، به عنوان ژن‌های جدید و ناشناخته در نظر گرفته شدند.

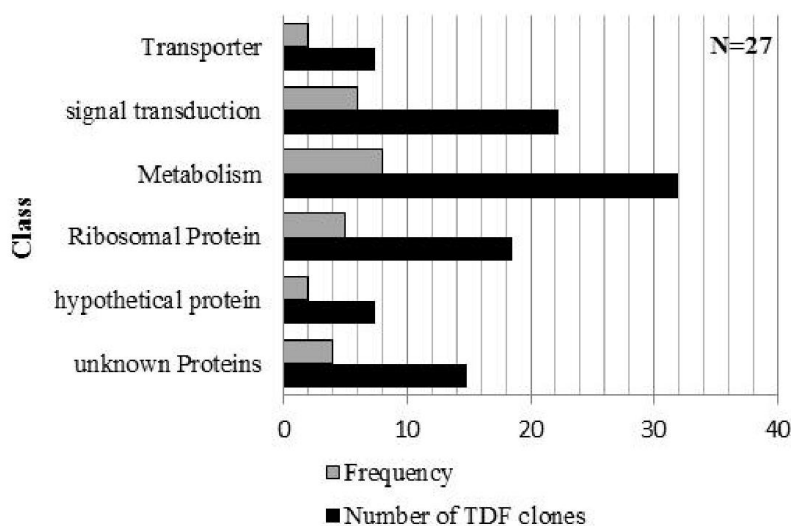
شناسایی رونوشت‌های پاسخگو به تنش یون پتاسیم بر اساس آنالیزهای صورت گرفته در کل ۳۴ EST از روی ژل اکریل‌آمید جداسازی، تکثیر مجدد

جدول ۱- نتایج حاصل از آزمون هم‌ردیفی TDFهای پاسخگو به تنش KCl و هومولوژی قطعات مشتق شده از رونوشت‌ها با پروتئین‌های پاسخگو به تنش‌های غیر زیستی

	EST name	EST length (bp)	dbEST_Id	GenBank_Accn	Sequence homology	Organism	Query cover	Max ident	E value
	GABIT25	133	78011828	JZ191066	glutamate decarboxylase-like	<i>Vitis vinifera</i>	65%	41%	3.5
	GABIT41	500	78011844	JZ191082	hypothetical protein	<i>Sorghum bicolor</i>	100%	67%	1e-40
	GABIT30	363	78011833	JZ191071	hypothetical protein	<i>Zea mays</i>	95%	85%	5e-56
	GABIT44	323	78011847	JZ191085	40S ribosomal protein S3-3-like	<i>Brachypodium distachyon</i>	94%	99%	5e-65
	GABIT7	283	78011810	JZ191048	syntaxin 81	<i>Zea mays</i>	98%	89%	3e-53
	GABIT12	269	78011815	JZ191053	uncharacterized protein At2g02148-like	<i>Glycine max</i>	57%	27%	3.0
	GABIT17	136	78011820	JZ191058	S-adenosylmethionine decarboxylase	<i>Cleistogenes songorica</i>	97%	100%	7e-24
	GABIT67	152	78011870	JZ191108	PHYTOCHROME C, partial	<i>Cenchrus americanus</i>	37%	53%	1.1

ژن‌های فعال شده تنها در گیاهان تحت تنش قابل شناسایی بوده و در گیاهان شاهد بیان نشدند. در پژوهش‌های صورت گرفته توسط (Jayaraman *et al.*, 2008) بر روی گیاه (*Foxtail Millet*) (Guo *et al.*, 2009) در *Setaria italic L.* و در بررسی پاسخ هالوفیت *Kosteletzkya virginica* به تنش شوری چنین الگوهای بیانی مشاهده شد (Guo *et al.*, 2009). در شکل ۲ درصد فراوانی TDFها بر اساس هومولوژی آنها با پروتئین‌های دارای عملکرد مشخص نشان داده شده است.

الگوهای بیانی مشاهده شده در پاسخ گیاه آلروپوس لیتورالیس به تنش شوری KCl به دو صورت بوده: ۱) TDFهایی که در اثر اعمال تنش تظاهرشان متوقف شده و خاموش می‌شوند و ۲) TDFهایی که در گیاه شاهد خاموش بوده و در اثر اعمال تنش تظاهر یافته است. در این مطالعه ژن‌هایی که حالت توقف بیان را نشان دادند، TDFهایی هستند که در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف KCl وجود نداشته و فقط در گیاهان شاهد قابل شناسایی بودند و در مقابل



شکل ۲- طبقه‌بندی و درصد فراوانی TDFهای شناسایی شده بر اساس هومولوژی آنها با پروتئین‌های دارای عملکرد مشخص

بیوستنتز پلی‌آمین‌ها نقش ویژه‌ای دارد آنزیم S-آدنوزیل متیونین دکربوکسیلاز می‌باشد. در مطالعات پیشین این مسئله به اثبات رسیده است که بیش‌بیان نمودن این ژن موجب افزایش مقاومت در گیاه میزبان ژن می‌گردد (Roy and Wu., 2002; Wi *et al.*, 2006). بنابراین همانطور که در مطالعه حاضر نیز اتفاق افتاده است، دور از انتظار نخواهد بود که در پاسخ به تنش نمکی KCl بیان این ژن افزایش یابد.

آدنوزیل متیونین دکربوکسیلاز^۱

در این تحقیق TDF، GABIT17 با کد دسترسی JZ191058 در NCBI همولوگ پروتئین‌های آدنوزیل متیونین دکربوکسیلاز شناخته شد. پلی‌آمین‌ها در تمامی موجودات زنده وجود دارند و در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی و سلولی نقش دارند. یکی از نقش‌های کلیدی این ترکیبات افزایش مقاومت به تنش شوری می‌باشد (Wi *et al.*, 2006). یکی از آنزیم‌های کلیدی که در مسیر

1. S-adenosylmethionine decarboxylase

سینتاکسین^۱

در این بررسی GABIT7، TDF با کد دسترسی JZ191048 در NCBI همولوگ پروتئین‌های سینتاکسین شناخته شد. اطلاعات فیزیولوژیکی نشان می‌دهد که پاسخ گیاه به تنش شوری و خشکی توسط بیان مجموعه‌ای از ژن‌های ویژه کنترل می‌گردد. مسئولیت پروتئین‌های حاصل از این ژن‌ها در حقیقت حفاظت از گیاه در مقابل اثرات نامطلوب تنش و به حداقل رساندن خسارات ناشی از تنش می‌باشد (Hasegawa *et al.*, 2000). یکی از این پروتئین‌ها پروتئین سینتاکسین می‌باشد. Sanderfoot و همکاران (۲۰۰۰) موفق به شناسایی ۲۴ نوع پروتئین سینتاکسین در آرکیدوپسیس شدند و آنها را در ۸ گروه تقسیم‌بندی نمودند. با مطالعه بر روی موتانت‌های آرکیدوپسیس مشخص گردید که موتانت *osm1* می‌تواند تا سطح ۱۴۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به خوبی رشد نماید. با مطالعه بیشتر بر روی این موتانت مشخص گردید تفاوت *osm1* با دیگر گیاهان در وجود ژن *SYP61* می‌باشد که عضوی از خانواده پروتئینی سینتاکسین‌ها می‌باشد (Sanderfoot *et al.*, 2000). نتایج ما نیز نشان می‌دهد که این ژن در گیاه آلوروپوس در بالاترین سطح نمک کلریدپتاسیم بیان گردیده است. دلیل اینکه این ژن در سطوح پایین‌تر نمک بیان نگردیده است احتمالاً به ذات هالوفیت بودن گیاه آلوروپوس برمی‌گردد و اینکه سطوح پایین نمک برای گیاه تنش محسوب نمی‌گردند. از طرفی دیگر، به دلیل آنکه بیان این ژن فقط در پاسخ به تنش KCl صورت گرفته است، این پدیده احتمال اختصاصی بودن این ژن در پاسخ به تنش KCl را افزایش می‌دهد

پروتئین‌های ریبوزومی

در این مطالعه GABIT3، TDF با کد دسترسی JZ191044 در NCBI همولوگ پروتئین‌های

ریبوزومی شناخته شد. پروتئین‌های ریبوزومی پروتئین‌هایی هستند که به tRNA متصل می‌شوند و یک واحد عملکردی را به وجود می‌آورند که نقش مرکزی را در فرایند ترجمه برعهده دارد. در این مطالعه تقریباً ۱۰٪ ژنهایی که به تیمارهای اعمال شده پاسخ دادند جزء پروتئین‌های ریبوزومی بوده‌اند. با وجود اینکه نمی‌توان دلیل محکمی دال بر دخیل بودن این پروتئین‌ها در ایجاد مقاومت به تنش بیان نمود اما این پروتئین‌ها در تعداد زیادی از مطالعات مولکولی مربوط به تنش دیده شده‌اند. در مطالعه پروفایل بیان ژن برنج در مقابل تنش شوری تعداد قابل توجهی از پروتئین‌های ریبوزومی در حضور تنش افزایش بیان نشان داده‌اند (Kawasaki *et al.*, 2001).

بر طبق بررسی‌های انجام شده توسط Fatemi و همکاران (2013) با تکنیک cDNA-AFLP، سطوح رونوشت‌های ناقلین یونی در پاسخ به تنش سدیم کلراید افزایش بیان نشان دادند. هم‌ایستایی سدیم و پتاسیم در گیاهان نقشی کلیدی در مقاومت گیاه به شوری دارد (Shabala and Ciun., 2007). زمانی که گیاه در معرض غلظت‌های بالای یون سدیم قرار می‌گیرد و حجم وسیعی از این یون به سمت سیتوزول سرازیر می‌گردد هموستازی پتاسیم-سدیم بر هم می‌خورد بنابراین سلول با فعال نمودن انتقال‌دهنده‌های پتاسیم به داخل سلول درجهت مقابله با افزایش سدیم فعالیت می‌نماید.

این مطالعه بیانگر این است که الگوهای بیانی در هالوفیت آلوروپوس تحت تنش پتاسیم کلراید به نحوی تغییر می‌کند تا گیاه بتواند در شرایط تنش زنده بماند. زنده‌مانی گیاه با افزایش غلظت نمک تا ۴۰۰ میلی‌ملار، این حقیقت را اثبات می‌کند که این گیاه دارای مکانیسم‌هایی جهت مقاومت در برابر تنش نمک می‌باشد. القای تنش به ژن در درجه اول در سطح رونویسی رخ می‌دهد و تنظیم زمانی و مکانی الگوهای بیان ژن‌های خاص درگیر در تنش،

برنج بسیار مفید خواهد بود.

در هر حال در این مطالعه، تکنیک cDNA-AFLP به طور مؤثری توانسته است ژن‌های درگیر در پاسخگویی به تنش یونی و اسمزی را شناسایی کند. cDNA-AFLP ثابت نموده است که تکنیکی کارا و مطمئن برای تفکیک اثرات یونی و اسمزی در تنش شوری می‌باشد. گروه‌بندی TDFها بر مبنای نوع پاسخ به تنش یونی و اسمزی، آنالیز عملکردی ژن‌های پاسخگو در ریشه گیاه آلوروپوس لیتورالیس به تنش‌های مذکور را در مطالعات آتی روی این گیاه را تسهیل خواهد کرد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان جهت حمایت‌های مالی در راستای تأمین هزینه‌های این تحقیق، نهایت تشکر را داریم.

REFERENCES

- 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.
- 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. The Plant J. 9(5): 745-753.
- Batanouny KH (1994) Halophytes and halophytic plant communities in the Arab Region. In Halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands (pp. 139-163). Springer Netherlands.
- Bauer D, Warthoe P, Rohde M, Struss M (1994) PCR methods and applications manual supplement, pp S805-809. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Breyne P, Zabeau M (2001) Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes, Curr. Opin. Plant Biol. 4: 136-142.
- Craciun AR, Courbot M, Bourgis F, salis P, saumitou-laprade P, Verbruggen N (2006) Comparative cDNA-AFLP analysis of cd-tolerante and sensitive genotypes derived from crosses between the cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* ssp. *Petraea*. J. Exp. Bot. 2967-2983.
- Diachenko LB, Ledesma J, Chenchik AA, Siebert PD (1996) Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. Biochem. Biophys Res Com 219: 824-828.

بخش مهمی از پاسخ گیاه به تنش است (Singh *et al.*, 2002). تکنیک‌های از قبیل خاموش کردن^۱ و یا بیان بیش از حد اجزای خاص سیگنالینگ، ممکن است نقش این ژن‌ها را در مسیرهای خاص تایید می‌کند. در نتیجه، تجزیه و تحلیل عملکردی و خصوصیات یابی بیشتر ژن‌هایی که در این مطالعه مشخص شده‌اند، می‌تواند منجر به درک جامع‌تری از تحمل به تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس گردد. به دلیل آنکه این گیاه از خانواده غلات می‌باشد دانش مکانیسم تحمل به شوری و ژن‌های کلیدی درگیر در تحمل به شوری در این گیاه، جهت اصلاح و مهندسی ژنتیک ارقام متحمل به شوری در دیگر اعضای این خانواده از جمله ذرت، گندم، جو و

1. Silencing

- Evans SJ, Datson NA, Kabbaj M, Thompson RC, Vreugdenhil E, De Kloet ER, Akil H (2002) Evaluation of Affymetrix Gene Chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. *Eur. J. Neurosci.* 16(3): 409-413.
- Fatemi F, Nematzadeh G, Askari H, Hashemi H (2013) Differential gene expression of *Aeluropus littoralis* in response to NaCl. *Annals of Biological Research.* 4(11): 110-115.
- 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 Res.* 31(16): e94-e94.
- Grattan SR, Grieve CM (1992) Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agr. Ecosyst. Environ.* 38.4: 275-300.
- Gulzar S, E Khan (2001) Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus logopoides*. *Ann. Botany.* 87(3): 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(2): 189-199.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Ivanova NB, Belyavsky AV (1995) Identification of differentially expressed genes by restriction endonuclease-based gene expression fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 2954-2958.
- Jayaraman A, Puranik S, Rai NK, Vidapu S, Sahu P P, Lata C, Prasad M (2008) cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *Mol. Biotechnol.* 40(3) P: 241-251.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Bohnert HJ (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell Online.* 13(4): 889-905.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.
- Roy M, Wu R (2002) Overexpression of adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhance sodium chloride-stress tolerance. *Plant Sci.* 163(5): 987-992.
- Sanderfoot AA, Assaad FF, Raikhel NV (2000) The Arabidopsis genome: An abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant Physiol.* 124: 1558-1569.
- Santos C (1998) Study of some mechanisms of osmotic regulation and the expression of glutamine synthetase in *Helianthus annuus* L. cells exposed to salt stress: selection of salt tolerant cells. PhD thesis, University of Aveiro, Portugal (English summery).
- Santos CL, Vieira A, Campos H, Azevedo, Caldeira G (2001) In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. *J. Exp. Bot.* vol. 52, No. 355, pp: 351-360.
- Shabala S, Cuin TA (2007) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum.* 133(4): 651-669.
- Singh KB, Foley RC, Oñate-Sánchez L (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5(5): 430-436.
- Torbati-nejad NM, Maghsud-Lorad H, Gharebash AM (2001) Determination of feed value of two species of *Aeluropus logopoides* and *Aeluropus littoralis* in sheep. *J. Agric. Sci. Natur. Resour.* 7(2): 31-45.
- 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 Environ* 25: 1617–1625.
- Wang Z, Li P, Fredricksen M, Gong Z, Kim CS, Zhang C, Bohnert HJ, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM, Zhao Y, Zhang H (2004) Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance. *Plant Sci.* 166: 609–614.
- Wi SJ, Kim WT and Park KY (2006) Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep.*, 25(10): 1111-1121.
- Zhao S, Ooi SL, Pardee AB (1995) New primer strategy improves precision of differential display. *Bio.Techniques* 18: 842–850.
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66-71.