

بررسی خصوصیات و بیان ژن *AIPKL* در پاسخ به شرایط تنش شوری و ریکاوری در گیاه شور زیست *Aeluropus littoralis*

سحر فرجی^{۱*}، سید حمیدرضا هاشمی‌پتروودی^۲، حمید نجفی‌زیرینی^۳، غلامعلی رنجبر^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
 ۲. استادیار، پژوهشکده ژنتیک و بیوتکنولوژی کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
 ۳. استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
 ۴. دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰)

Characterization and expression profiling of *AIPKL* gene in response to salinity stress and recovery conditions in halophyte plant *Aeluropus littoralis*

Sahar Faraji^{1*}, Seyed Hamidreza Hashemi-Petroudi², Hamid Najafi-Zarrini³, Gholamali Ranjbar⁴

1. Former M.Sc. Student of Plant Breeding, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran
 2. Assistant Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
 3. Assistant Professor, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran
 4. Associate Professor, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran
- (Received: Dec. 7, 2017 - Accepted: Mar. 11, 2018)

Abstract

Salinity is considered as a perilous environmental stress reducing crop yields, which makes the plant survive difficult via stopping the various mechanisms of it, eventually leading to death. Genes are the momentous factors in multiple physiological pathways regarding to their involvements in stress responses. The gene encoding for Chromodomain Helicase DNA protein (*PICKLE*, *PKL*) is one of them, which regulates the other stress-responsive genes transcriptions under unfavorable conditions. Transcripts assay in halophyte *Aeluropus littoralis*, as a valuable genetic resource, will provide the inspiring information for sensitive crops improvement. Therefore, biochemical properties, functional domains, phylogenetic analysis and promoter *cis*-elements were investigated in this study, suggesting that this gene may play the critical roles in dealing with stimulus circumstances. Expression profiling of *AIPKL* in coping with salinity and recovery situations in *A. littoralis* shoot and root tissues through the qReal-Time PCR technique was also revealed high transcript magnitudes of this gene. Hence, further studies on *PKL* genes in multiple plant species can provide precious information for better understanding of stress endurance mechanisms.

Keywords: *Aeluropus littoralis*, stress-responsive genes, *PKL*, salinity, qReal-Time PCR.

چکیده

شوری، یکی از خطرناک ترین عوامل محیطی محدودکننده تولید در گیاهان زراعی است، به طوری که به واسطه متوقف کردن مکانیسم‌های مختلف گیاه، شرایط را برای حیات آن دشوار می‌سازد و در نهایت منجر به مرگ آن می‌شود. ژن‌ها به جهت ایجاد پاسخ‌های مقاومتی به تنش در مسیرهای مختلف فیزیولوژیکی دارای اهمیت فراوان می‌باشند. ژن رمزدهنده پروتئین‌های Chromodomain Helicase DNA (*PICKLE*, *PKL*) از این قبیل می‌باشد که بیان سایر ژن‌های عامل مقاومت را تنظیم می‌کند. مطالعه ژنتیکی رونوشت‌ها در هالوفیت *Aeluropus littoralis*، به عنوان یک منبع ژنتیکی بسیار با ارزش، زمینه‌ای را برای بهبود ژنتیکی گیاهان حساس به شوری فراهم می‌کند. از این رو در مطالعه حاضر، خصوصیات بیوشیمیایی، دومین‌های عملکردی، روابط فیلوژنتیکی، و نیز عناصر تنظیمی *cis* موجود در ناحیه پرموتور توالی کاندید با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک بررسی شدند. نتایج نشان دادند که ژن مذکور احتمالاً در مکانیسم‌های عامل مقاومت به شرایط محرک محیطی نقش مهمی را ایفا می‌نماید. برای بررسی بیشتر این موضوع، آزمون بیان ژن کاندید نیز، در پاسخ به شرایط نرمال، تنش شوری و ریکاوری به روش qReal-Time PCR انجام پذیرفت. نتایج حاصل از بررسی تعداد رونوشت‌های mRNA ژن مورد نظر، تحت شرایط تنش شوری و ریکاوری در بافت‌های مختلف گیاه *A. littoralis* نیز تاییدکننده این مطلب بود. بنابراین انجام مطالعات بیشتر در زمینه ژن *PKL* در گیاهان می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را جهت درک هرچه بیشتر مکانیسم‌های پاسخ به تنش فراهم آورد.

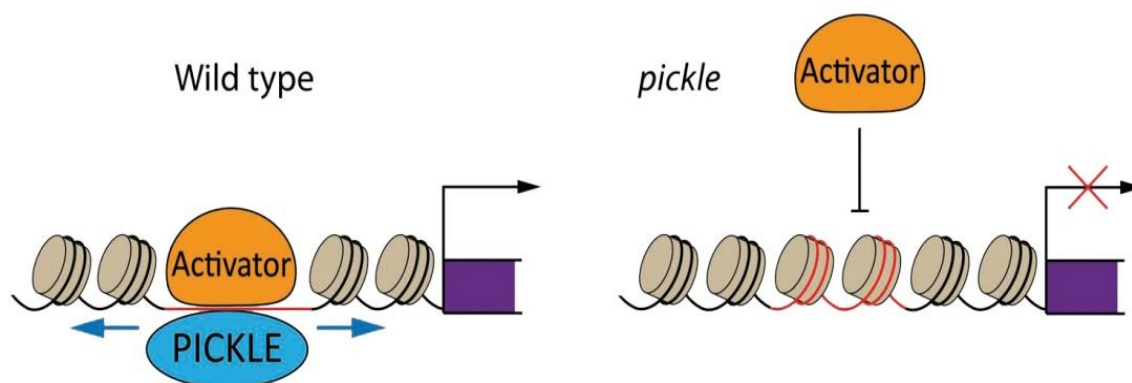
واژه‌های کلیدی: *Aeluropus littoralis*، ژن عامل مقاومت، *PKL*، تنش شوری، qReal-Time PCR.

شده است، بنابراین این یون‌ها به واسطه متوقف کردن مکانیسم‌های مختلف گیاه، شرایط را برای حیات آن دشوار می‌سازند (Munns & Tester, 2008). شوری در سطوح بالا ممکن است باعث آسیب به غشاء، عدم تعادل در مواد مغذی، تغییر در سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد، مهار آنزیمی و اختلالات متابولیکی شود، که در نهایت منجر به مرگ گیاه می‌شود (Hasanuzzaman *et al.*, 2012). امروزه روش‌ها و تکنیک‌های مدرن، محققان را قادر ساخته تا به بررسی بیان ژن‌ها، در پاسخ به تنش‌های مختلف از جمله شوری بپردازند. این ژن‌ها به جهت ایجاد پاسخ‌های مقاومتی به تنش در مسیرهای مختلف فیزیولوژیکی، دارای اهمیت فراوان می‌باشند. ژن رمزدهنده پروتئین‌های Chromodomain Helicase DNA (CHD) که تحت عنوان *PICKLE* (*PKL*) شناخته می‌شود، از این دست می‌باشد که سطوح بیان ژن‌های عامل مقاومت را تنظیم می‌کند (Perruc *et al.*, 2007). نمایی از فعالیت این ژن در راستای تسهیل فرآیند رونویسی از سایر ژن‌های عامل مقاومت به تنش، در شکل ۱ نشان داده شده است.

مقدمه

کشاورزی جهان با چالش‌های بسیاری از جمله تولید مواد غذایی، برای یک جمعیت ۲/۳ میلیاردی تا سال ۲۰۵۰، مواجه است (Fischer *et al.*, 2009). این در حالی است که تولید محصولات زراعی به موازات تقاضا برای آن، افزایش نیافته است. تولید پایین، در بیشتر موارد به تنش‌های غیر زیستی مختلف نسبت داده می‌شود. تنش‌های غیر زیستی در سراسر دنیا به عنوان بزرگترین محدودیت برای تولید محصول به شمار می‌روند، به طوری که بیش از ۵۰٪ کاهش عملکرد، نتیجه مستقیم تنش‌های غیر زنده است (Munns & Tester, 2008). از آنجایی که غلات برای جمعیت جهان جزو غذای اصلی و منبع مهم کربوهیدرات به شمار می‌روند، تولید غلات مقاوم به تنش‌های خشکی و شوری، برای دستیابی به امنیت غذایی در آینده، بسیار حائز اهمیت است.

تنش شوری، یکی از خطرناک‌ترین عوامل محیطی محدودکننده تولید در گیاهان زراعی است. در بیشتر موارد، اثرات منفی شوری در گیاهان مختلف، به افزایش یون‌های Na^+ و Cl^- نسبت داده



شکل ۱. نمایی شماتیکی از فعالیت ژن *PICKLE* در راستای فعال‌سازی سایر ژن‌های عامل مقاومت به تنش. این ژن تحت شرایط محرک احتمالاً بواسطه ایجاد برخی تغییرات در ساختار نوکلئوزوم‌ها در کروماتین، زمینه را برای اتصال پروتئین‌های فعال‌کننده رونویسی به نواحی چسبنده DNA هدف فراهم، و در نتیجه موجب تسهیل رونویسی و بیان ژن‌های عامل مقاومت به تنش‌های محیطی می‌گردد. در غیاب ژن *PICKLE* (ایجاد موتانت *pickle*) فعال‌کننده قادر به شناسایی توالی هدف نیست، و در نتیجه ژن پاسخگو به تنش فعال نمی‌گردد. خطوط قرمز رنگ نشان‌دهنده نواحی چسبنده، و استوانه‌های خاکستری نشان‌دهنده نوکلئوزوم‌ها در DNA ژن هدف می‌باشند (Köhler & Aichinger, 2010).

از اهداف مطالعه حاضر بررسی توالی EST ژن *AIPKL* در *Aeluropus littoralis* شناسایی موتیف‌های عملکردی، روابط فیلوژنتیکی، و نیز عناصر تنظیمی *cis* موجود در ناحیه پروموتور، و همچنین بررسی تعداد رونوشت‌های mRNA و میزان پاسخگویی این ژن به شرایط مختلف با استفاده از تکنیک qRT-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آنالیز همولوژی و شناسایی توالی همولوگ
توالی EST مربوط به ژن *AIPKL* در آلوروپوس (JK671232) از پایگاه داده NCBI به دست آمد و جستجوی BLAST بمنظور یافتن نزدیک‌ترین ژن همولوگ با استفاده از پایگاه‌های Phytozome (Goodstein et al., 2011) و NCBI (Altschul et al., 1997) صورت پذیرفت. تاکنون هیچ دیتابیس برای شناسایی توالی‌های اسید نوکلئیکی و پروتئینی در گیاه آلوروپوس ثبت نگردیده است، بنابراین در چنین مواقعی آنالیزهای بر مبنای تشابه بسیار قابل تعمیم و راهگشا می‌باشند؛ بدین ترتیب توالی CDS (XM-008660981.1) و پروتئین PKL (XP_008659203.1) همولوگ در ذرت (*Zea mays*)، که دارای حدوداً ۹۰٪ تشابه با توالی متناظر در گیاه آلوروپوس می‌باشد، از پایگاه Phytozome استخراج شده و برای ادامه آنالیزهای بیوانفورماتیکی مورد استفاده قرار گرفت.

مکانیابی پروتئین، آنالیز ساختاری ژن، دمین‌های

عملکردی و روابط فیلوژنتیکی

مکان‌یابی سلولی پروتئین PKL با استفاده از آنالیز PSORT (Horton et al., 2007)، انجام گردید. بررسی نواحی اگزون و اینترون *PKL* نیز در ۹ ژن همولوگ و با استفاده از مقایسه توالی ژنومی و CDS به‌وسیله ابزار GSDS (Hu et al., 2014) صورت پذیرفت.

پروتئین‌های CHD (PKL)، از خانواده پروتئین‌های تنظیمی SNF2 هستند که به‌واسطه باز کردن رشته‌های کروماتین موجب تسهیل فرآیند رونویسی جهت ایجاد پاسخ به شرایط محرک می‌شوند، و نقش مهمی را در تنظیم بیان سایر ژن‌های پاسخگو به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند (Perruc et al., 2007). ژن‌های *PKL* به‌طور گسترده در آرکیدوپسیس مطالعه شده‌اند، اما اطلاعات اندکی در زمینه این پروتئین‌ها در سایر گیاهان وجود دارد. برخی مطالعات بیانگر نقش *PKL* در تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به هورمون‌ها هستند. برای مثال تنظیم رونویسی از ژن‌های پاسخگو به اکسین (مانند *ARF7* و *ARF9*)، نیازمند بیان ژن *PKL* است (Fukaki et al., 2006). علاوه بر این *PKL*، در طول رشد اندام‌های هوایی، بسته به نیاز گیاه موجب تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به سیتوکینین و جبریلین می‌شود (Furuta et al., 2011). طی تنش نور، این ژن موجب سرکوب هیستون H3k27me3 در لوکوس هدف شده، و از این طریق رونویسی از ژن مورد نظر را تسهیل می‌کند (Jing et al., 2013).

گیاه *Aeluropus littoralis* یک هالوفیت چندساله ریزوم دار تک لپه با سیستم فتوسنتزی C_4 می‌باشد، که معمولاً در خاک‌های بسیار شور و مناطق خشک رشد می‌کند (Gulzar et al., 2003). این گیاه همانند سایر گرامینه‌ها دارای ژنوم کوچک (342 Mb) با $2n=2x=14$ کروموزوم می‌باشد (Zouari et al., 2007) و بدلیل توانایی تحمل سطوح بالای شوری، قادر به زنده ماندن در مقادیر بسیار زیاد نمک می‌باشد. مطالعه ژنتیکی رونوشت‌های حاصل از ژن‌های عامل مقاومت در هالوفیت آلوروپوس زمینه را برای بهبود ژنتیکی گیاهان حساس به شوری فراهم می‌کند. آلوروپوس از خانواده گرامینه است و آگاهی از مکانیسم‌های مقاومت و ژن‌های کلیدی دخیل، می‌تواند برای اصلاح و مهندسی ژنتیک سایر اعضای این خانواده مثل ذرت، گندم، جو و برنج بسیار مفید باشد.

GPS-SUMO (Zhao *et al.*, 2014) در سطوح معنی‌داری متوسط و بالا، پیش‌بینی گردیدند. اسید آمینه‌های N-گلیکوزیده شده (آمید نیتروژن‌های مربوط به اسید آمینه آسپاراژین)، در نهایت به کمک سرور Glycosylation prediction (Blom *et al.*, 2004) بررسی شدند.

شناسایی عناصر تنظیمی *cis* موجود در ناحیه پروموتور ژن کاندید

ناحیه 2000 bp بالا دست منطقه 5'-UTR در نزدیک‌ترین ژن همولوگ (*ZmPKL*) برای *AIPKL*، به عنوان ناحیه پروموتور در نظر گرفته شد و از پایگاه داده Phytozome استخراج گردید. در ادامه، عناصر تنظیمی *cis* پاسخگو به تنش موجود در این توالی به همراه تعداد و عملکرد آنها با استفاده از دیتابیس PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002) مورد جستجو قرار گرفت.

تهیه مواد گیاهی و اعمال تنش

بذور گیاه هالوفیت *Aeluropus litoralis* از استان اصفهان تهیه گردید. پس از ضدعفونی کردن ابتدا بذرها در محیط کشت ۱/۲ MS (Murashige & Skoog, 1962) همراه با ۳٪ سوکروز و ۰/۷٪ آگار کشت داده شدند و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی با دمای 25 ± 1 در گلخانه پرورش یافتند. پس از گذشت ۴ هفته گیاهچه‌ها به محیط هیدروپونیک هوگلدن ۰/۵ و سپس ۱ منتقل گردیدند. پس از ۲ ماه به دنبال استقرار کامل گیاهچه‌ها، تنش شوری اعمال گردید. برای این منظور از غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl استفاده شد و نمونه‌برداری به صورت time course در هفت زمان به شرح: ۶ ساعت، ۲۴ ساعت و یک هفته پس از تنش، و نیز ۶ ساعت، ۲۴ ساعت و یک هفته پس از ریکاوری و حذف تنش، از بافت‌های برگ و ریشه انجام گردید. نمونه‌های بدون تنش نیز به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شدند.

دمین‌های پروتئینی حفاظت شده در توالی PKL، با استفاده از ابزار InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005) شناسایی و از طریق پایگاه‌های Pfam و SMART تأیید و تکمیل گردیدند. به منظور بررسی میزان حفاظت شدگی و پدیده‌های حذف/اضافه در این پروتئین، توالی اسید آمینه‌ای مربوط به یکی از دومین‌ها در تعداد ۹ پروتئین همولوگ شناسایی و با استفاده از برنامه Clustal W (Chenna *et al.*, 2003) مورد آزمون هم‌ردیفی قرار گرفته و سپس با استفاده از WebLogo3 (Crooks *et al.*, 2004) به نمایش درآمدند.

روابط تکاملی میان ژن‌های PKL در گونه‌های مختلف گیاهی نیز، بکمک توالی‌های پروتئینی حاصل از آنها بررسی شد و در نتیجه درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) بر مبنای روش Neighbor-Joining (NJ) رسم گردید. شاخص bootstrap در این روش پس از ۱۰۰۰ بار تکرار و تحت حالت pairwise gap deletion مشخص گردید.

پیش‌بینی تغییرات پس از ترجمه

توالی اسید آمینه مربوط به PKL، به منظور برآورد پنج تغییر اصلی پس از ترجمه شامل: فسفوریلاسیون، S-نیتروزیلاسیون، یوبیکوئیتیناسیون، سیومویلاسیون و N-گلیکوزیلیلاسیون مورد بررسی قرار گرفت. نواحی فسفوریله شده در پروتئین PKL، در سه ناحیه اصلی اسید آمینه‌های سرین (S)، سرتونین (T) و تیروزین (Y) با استفاده از سرور NetPhos 3.1 (Blom *et al.*, 2004) و در سطح اختصاصی بیش از ۹۰٪ شناسایی گردید. مناطق S-نیتروزیلاسیون از طریق سرور iSNO-AAIPair (Xu *et al.*, 2013) و تنظیم پارامتر مورد نظر بر روی حالت high threshold مشخص گردید. تغییرات یوبیکوئیتیناسیون و سیومویلاسیون نیز به ترتیب با استفاده از سرور UbPred (Radivojac *et al.*, 2010) و نرم‌افزار

استخراج RNA و سنتز cDNA (Bio-Rad, California). به منظور آنالیز منحنی تفکیک، تمام واکنش‌های PCR در یک دمای ذوب از ۵۵ °C تا ۹۵ °C قرار گرفته و میزان فلوروسنس، پیوسته اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از بیان ژن مورد نظر، پس از بررسی پلات‌ها و با استفاده از سیستم ترموسایکلر BIO-RAD، به صورت نموداری برای بافت‌های برگ و ریشه رسم گردید. آنالیز بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ صورت گرفت (Schmittgen & Livak, 2008)، و ژن هدف نسبت به ژن‌های رفرنس نرمال شده و در نهایت میزان بیان تحت شرایط مختلف، با تیمار کنترل مقایسه گشت.

نتایج و بحث

شناسایی و تعیین خصوصیات توالی کاندید نتایج جستجوی BLAST در پایگاه‌های NCBI و Phytozome، با استفاده از توالی EST مربوط به *AIPKL* نمایانگر همولوژی قابل توجه بیش از ۸۰٪ با *Brachypodium distachyon* (XP_003564199.1)، *Oryza sativa* (AAL47211.1)، *Dichanthelium oligoanthos* (OEL16204.1) و *Setaria italica* (XP_004964666.1)، و بیش از ۷۰٪ با *Panicum hallii* (PAN25447.1)، *Aegilops tauschii* (XP_020196633.1)، *Sorghum bicolor* (XP_021305333.1) و *Oryza brachyantha* (XP_015694099.1) بود. علاوه بر این، تشابه بسیار قابل توجه (تقریباً ۹۰٪) نیز در *ZmPKL* (XP_008659203.1) مشاهده شد؛ که به عنوان نزدیک‌ترین ژن همولوگ (-XM-008660981.1) برای *AIPKL* بود. بر اساس نتایج حاصل از مکانیابی پروتئین کاندید با استفاده از پایگاه PSORT مشخص شد که پروتئین حاصل از ترجمه این توالی غالباً در هسته متمرکز است. بررسی وجود سیگنال پپتیدها، ترکیب اسیدهای آمینه و همچنین موتیف‌های عملکردی در پروتئین PKL گواه بر این مطلب بود.

استخراج RNA کل از بافت‌های برگ و ریشه گیاهان کنترل و دارای تنش با استفاده از روش ترایزول و بر اساس دستورالعمل کیت (Invitrogen, USA) صورت گرفت و بمنظور حذف آلودگی DNA ژنومی از RNAهای استخراجی، تیمار *DNase I* (ThermoFisher Scientific)، انجام پذیرفت. سپس کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA به ترتیب با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ اندازه‌گیری شدند. ۱ میکرولیتر از RNAهای تیمار شده برای سنتز رشته اول cDNA، با استفاده از کیت رونویسی QuantiTect reverse (Qiagen, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد و نمونه حاصل تا زمان مصرف در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

طراحی پرایمر و آزمون بیان ژن با استفاده از تکنیک Real-Time PCR

پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن *PKL*، با توجه به نواحی حفاظت‌شده توالی این ژن در سایر گیاهان هم خانواده و با استفاده از نرم‌افزار OLIGO طراحی شدند (جدول ۱). اختصاصی بودن پرایمرها نیز با روش آنالیز منحنی ذوب بررسی شد. علاوه بر این، ژن‌های β -actin و *Elongation factor 1-a (Efla)* که معمولاً به دلیل پایداری بیان بالا در مراحل مختلف نمو و تنش در گیاهان به عنوان ژن خانه‌دار مورد استفاده قرار می‌گیرند، نیز به عنوان دو ژن رفرنس داخلی (به ترتیب برای نرمال کردن داده‌های بیانی در بافت‌های برگ و ریشه)، در نظر گرفته شده و پرایمرهای مناسب برای آن‌ها تهیه گشتند (جدول ۱).

به منظور بررسی میزان رونویسی، از Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific)، طی یک چرخه دمایی دو مرحله‌ای استفاده شد تا میزان رونوشت‌های ژن از طریق CFX96 Real-Time PCR اندازه‌گیری شود

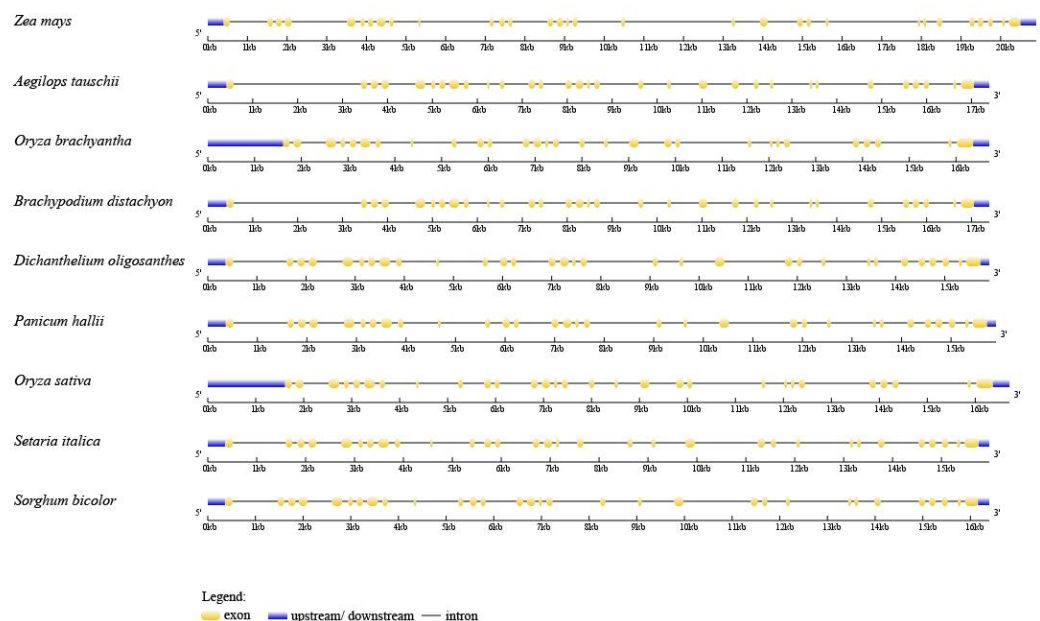
جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده جهت استفاده در آزمون بیان ژن *PKL* در *Aeluropus littoralis* با استفاده از روش qRT-PCR

نام ژن	کد دسترسی	توالی پرایمرها (رفت و برگشت) 5' → 3'	طول محصول (جفت باز)	Tm (°C)
<i>AIPKL</i>	JK671232	AGGGGTATGCTGAACTTGT CACCTTCGCCTCAATCAA	۱۴۶	۶۳
β -actin	AB181991	TGCTGGCCGAGACCTTAC GGCGAGCTTTTCCTTGATG	۱۱۳	۵۹
<i>Efla</i>	M90077	ACCTTCTCTGAATACCCTCCTCTG CTTCTCCACACTCTTGATGACTCC	۹۰	۶۵

بررسی دومین‌های حفاظت‌شده و عملکردهای بیولوژیکی

طبق نتایج حاصل از پایگاه‌های InterProScan، Pfam و SMART دومین‌های ساختاری و عملکردی بسیار مهمی در پروتئین PKL وجود دارد که بسیار اختصاصی عمل می‌کنند (جدول ۲). نخستین دومین مربوط به ساختارهای zinc finger می‌باشد که نقش بسیار شایان توجهی در اتصال به مولکول‌های مختلف DNA، RNA، پروتئین و لیپید دارد (Gamsjaeger et al., 2007). این دومین‌ها دارای عملکردهای اختصاصی مختلفی از قبیل تنظیم رونویسی و بیان ژن‌ها، سازمان‌دهی اسکلت سلولی، توسعه اپیتلیال، فولدینگ پروتئین و بازیابی ساختارهای کروماتین می‌باشند (Gamsjaeger et al., 2007). علاوه بر این مطابق گزارشات مختلف، این دومین‌های ساختاری در ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی از قبیل خشکی و شوری دخیل می‌باشند (Yazdani et al., 2015; Zhou et al., 2015). دومین شناسایی شده دیگر تحت عنوان Chromatin Organization (Chromo Modifier)، نیز یک دومین ساختاری با توالی حدود ۶۰ اسید آمینه می‌باشد، که نقش مهمی در ایجاد ساختار فشرده هتروکروماتین از کروماتین رشته‌ای دارد. نتایج نشان می‌دهد که این دومین دارای ساختاری حفاظت‌شده شامل سه رشته بتا و یک آلفا هلیکس می‌باشد، که در شرایط نامساعد محیطی موجب تعدیل بیان سایر ژن‌های پاسخگو به تنش می‌شود (Hu et al., 2013).

بررسی ساختار اگزون-اینترون با استفاده از برنامه GSDB نشان داد که توالی CDS ژن *PKL* بواسطه تعداد مختلفی از اینترون‌ها به صورت منقطع درآمده است (شکل ۲). به طور کلی ۳۰ اگزون (و ۲۹ اینترون) در تمام گونه‌های همولوگ شناسایی شد؛ به استثنای گونه‌های *O. brachyantha* و *O. sativa* که ۲۹ اگزون و ۲۸ اینترون در آنها یافت شد (شکل ۲). مقایسات میان ساختار ژن‌ها در گونه‌های مختلف نشان می‌دهد که افزایش و یا کاهش تعداد و طول اگزون‌ها معمولاً در طول فرایند تکامل رخ می‌دهد، و در نتیجه عملکرد ژن‌ها به صور مختلفی بروز می‌نماید (Hu et al., 2014). بررسی ساختار ژن‌ها در گونه‌های مختلف اطلاعات ارزشمندی را برای پیش‌بینی نقش احتمالی آن‌ها در پاسخ به تنش‌های مختلف در سایر گونه‌های گیاهی فراهم می‌آورد (Hu et al., 2014). با توجه به شباهت قابل توجه پیش‌بینی شده میان ژن‌های همولوگ، و همچنین ساختار ژنی بسیار حفاظت‌شده آنها می‌توان گفت که این ژن‌ها در پاسخ به شرایط محرک احتمالاً از یک مکانیسم و استراتژی مشترک استفاده می‌کنند؛ بنابر این می‌توان اذعان داشت که با توجه به درصد همولوژی بسیار بالا و شباهت ساختاری میان ژن‌های *PKL* در گونه‌های کاندید، *AIPKL* در گیاه آلوروپوس نیز احتمالاً دارای ساختار ژنی مشابه با گونه‌های همولوگ بوده (شکل ۲)، و در زمره ژن‌های پاسخگو به تنش‌های محیطی قرار دارد.



شکل ۲. ساختار ژن *PKL* و مقایسه آن در برخی گونه‌های خویشاوند برای *Aeluropus littoralis*. برای این منظور از مقایسه توالی CDS و ژنومی استفاده شد.

جدول ۲. دومین‌های ساختاری و عملکردی پیش‌بینی شده در توالی پروتئینی *PKL*

نام دومین	شماره دسترسی	موقعیت اسید آمینه	عملکرد
Zinc finger	IPR001965	۱۰۴-۳۱ ۹۹-۵۷ ۱۰۱-۵۵ ۹۸-۵۸	در تنظیم رونویسی از ژن‌ها و فرایند ترجمه، تاشدگی پروتئین، اتصال سلولی، بازبایی کروماتین و ... دخیل است.
Chromo domain	IPR000953	۱۷۳-۷۰ ۱۸۳-۱۰۳ ۱۵۵-۱۱۹ ۲۴۷-۱۸۹ ۲۵۷-۱۹۷ ۲۴۷-۱۹۸	ناحیه‌ای با حفاظت شدگی بسیار بالا که موجب تغییر فرم کروماتین هسته به هتروکروماتین و در نهایت تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به تنش می‌شود.
SNF2 N-terminal domain	IPR000330	۵۸۰-۳۰۲	در فرایندهای مختلفی از قبیل تنظیم رونویسی، بازسازی DNA و باز کردن رشته‌های کروماتین دخیل می‌باشد.
Helicase C-terminal domain	IPR001650	۷۶۷-۶۰۷	طی فرآیند جداسازی مولکول‌های دو رشته‌ای نوکلئیک اسید به‌عنوان یک کاتالیزور وابسته به انرژی نقش آفرینی می‌کند.
DUF	IPR009462	۸۹۷-۸۳۳ ۱۰۴۵-۹۲۸	شامل چندین دومین با عملکرد ناشناخته می‌باشند، اما مطالعات بیانگر فعال شدن آنها طی شرایط خاص مانند کمبود مواد غذایی می‌باشند.

نیز دومین حفاظت‌شده helicase شناسایی شد که عموماً در پروتئین‌های دارای فعالیت هلیکازی یافت می‌شود (Caruthers *et al.*, 2000) و موجب تسهیل باز شدن مولکول دو رشته‌ای نوکلئیک اسید و در نتیجه فرآیند رونویسی می‌شود. اما در میان

دومین اختصاصی SNF2 موجود در ناحیه N-terminal پروتئین *PKL*، در فرایندهای سلولی مختلفی از جمله تنظیم رونویسی از ژن‌ها (Hu *et al.*, 2013) دخیل، و دارای ساختاری با حفاظت شدگی بالا می‌باشد. در ناحیه C-terminal پروتئین

دومین اختصاصی در پروتئین PKL در گیاه آلوروپوس و مقایسه آن با سایر گونه‌های همولوگ نشان داد که با وجود اشتقاق این گونه‌های مختلف از یکدیگر در طول زمان‌های متفاوت، توالی دومین عملکردی در آن‌ها به میزان بسیار قابل توجهی حفاظت شده می‌باشد (شکل ۳)؛ بنابراین احتمالاً می‌توان ژن PKL را به‌عنوان گزینه مناسبی برای انجام مطالعات تکاملی و فیلوژنتیکی معرفی کرد، چراکه ناهنجاری‌های ناشی از جهش‌های حذف/اضافه در کدون‌های رمزدهنده برای این پروتئین رخ نداده است (Tamura et al., 2013).

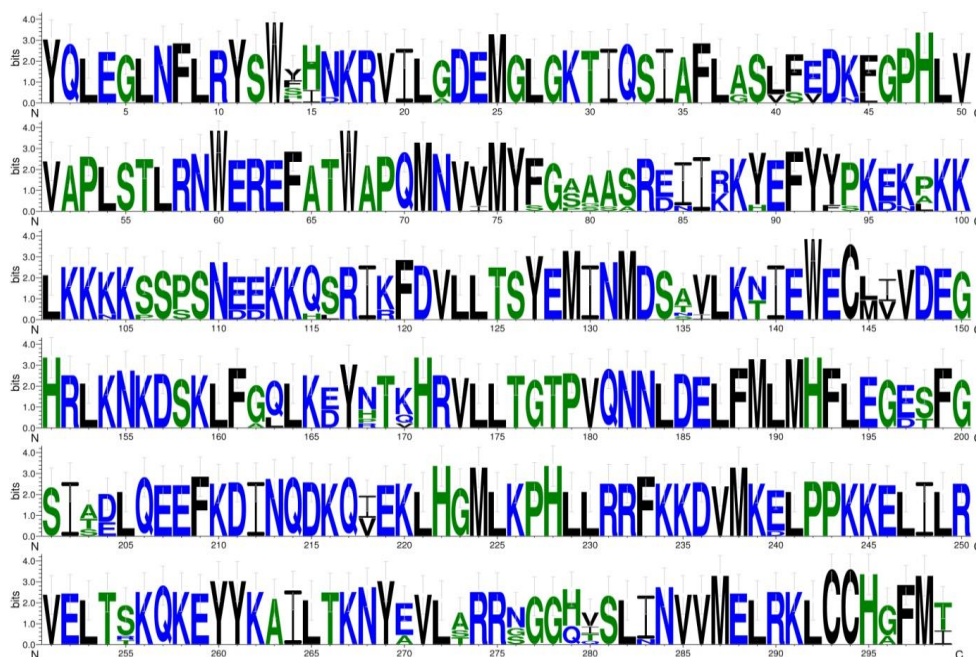
بررسی روابط فیلوژنتیکی ژن‌های PKL

به‌منظور بررسی روابط تکاملی میان ژن‌های PKL در گونه‌های گیاهی، درخت فیلوژنتیکی بر مبنای توالی پروتئینی و با استفاده از روش NJ در نرم‌افزار MEGA 6.0 رسم شد که به دو زیر مجموعه دو لپه (با ۳۱ عضو) و تک لپه (با ۱۴ عضو) تقسیم شد (شکل ۴). مطابق نتایج حاصله تشابه بسیار بالایی میان پروتئین PKL در آلوروپوس و ذرت مشاهده شد. پروتئین‌های SbPKL از گیاه سورگوم، DoPKL از گیاه *D. oligosanthos*، SiPKL در ارزن (*S. italica*) و PhPKL در *P. hallii* نیز در فواصل بسیار نزدیکی از هم بر روی درخت فیلوژنتیکی قرار گرفتند، که احتمالاً بیانگر عملکرد ژنی مشترک و اشتقاق این گونه‌ها از یک نیای مشترک می‌باشد. با توجه به طول کوتاه شاخه‌های منشعب شده میان این گونه‌ها در درخت می‌توان گفت که این اشتقاق احتمالاً در سال‌های اخیر رخ داده است (Tamura et al., 2013). این در حالی است که اشتقاق ژنتیکی میان گونه‌های *Aeluropus littoralis* و *Ananas comosus* و *Phoenix dactylifera* با وجود قرارگیری آنها در یک زیرمجموعه (گروه ۲)، احتمالاً در سال‌های دورتری رخ داده است، که با در نظر گرفتن پدیده تکامل ژنتیکی قابل درک می‌باشد (Tamura et al., 2013).

دومین‌های شناسایی‌شده، دومینی با عملکرد ناشناخته، تحت عنوان DUF (Domain of Unknown Function) نیز شناسایی شد؛ مطالعات بیانگر این است که دومین‌های DUF شامل چندین دومین یوکاریوتی می‌باشند و در شرایط نرمال محیطی عملکرد بخصوصی از خود نشان نمی‌دهند، اما تحت شرایط محرک محیطی با اتصال به مولکول DNA موجب تحریک فرآیندهای سازگاری، مانند کاهش بیوسنتز پروتئین‌ها (Häuser et al., 2012)، می‌شوند. بدین ترتیب با توجه به عملکرد دومین‌های شناسایی شده در توالی پروتئین کاندید، می‌توان گفت که ژن PKL در گیاه آلوروپوس طی شرایط نامساعد محیطی دارای نقش‌های مهمی می‌باشد، چراکه با اتصال دومین‌های پروتئینی شناسایی‌شده به مولکول‌های DNA موجب تنظیم و تعدیل بسیاری از عملکردهای سلولی در سایر ژن‌های پاسخگو به تنش می‌شود (Hu et al., 2013).

به‌منظور بررسی میزان حفاظت‌شدگی و پدیده‌های احتمالی حذف/اضافه در توالی پروتئین PKL، دمین SNF2 که مشخصه بارز پروتئین‌های PKL است (Hu et al., 2013)، با استفاده از توالی ۹ پروتئین همولوگ مورد آزمون هم‌ردیفی قرار گرفت و میزان حفاظت‌شدگی آن به‌صورت گرافیکی به نمایش درآمد (شکل ۳).

نتایج به‌دست آمده حاکی از تشابه بسیار بالای توالی PKL در گونه‌های مختلف بود. اگرچه در برخی نواحی اسید آمینه‌های متفاوت مشاهده شد، اما هیچ‌گونه پدیده حذف و اضافه‌ای در طول فرایند تکاملی این ژن در گونه‌های مختلف گیاهی رخ نداده است (شکل ۳). این مسئله احتمالاً بیانگر اهمیت این ژن در طول تکامل گونه‌های گیاهی می‌باشد، چرا که رخداد جهش‌های حذف و یا اضافه در نوکلئوتیدها موجب تغییرات قابل توجهی در ساختار و عملکرد پروتئین‌ها شده و در نتیجه به‌عنوان صفتی نامطلوب طی فرآیند تکامل بروز می‌نماید (Tamura et al., 2013). بررسی توالی این



شکل ۳. مقایسه توالی اسید آمینه پروتئین‌های PKL به منظور بررسی میزان حفاظت‌شدگی و همچنین بروز احتمالی پدیده‌های حذف/اضافه در طول پدیده تکاملی در گونه‌های کاندید.

۶۹۴-۶۹۸، نیز شناسایی شدند، که احتمالاً در تثبیت مکانیسم‌های سلولی پاسخ به تنش دخیل می‌باشند (Zhao *et al.*, 2014). از آنجاییکه واکنش‌های گلیکوزیلاسیون در تنظیم خصوصیات فیزیوشیمیایی و بیولوژیکی پروتئین‌ها مؤثر هستند (Blom *et al.*, 2004)، تغییرات گلیکوزیلاسیون در پروتئین کاندید بررسی و مشخص شد که ۱۸ اسید آمینه N (آسپاراژین) در موقعیت‌های مختلف (مطابق جدول ۳) گلیکوزیله شده‌اند.

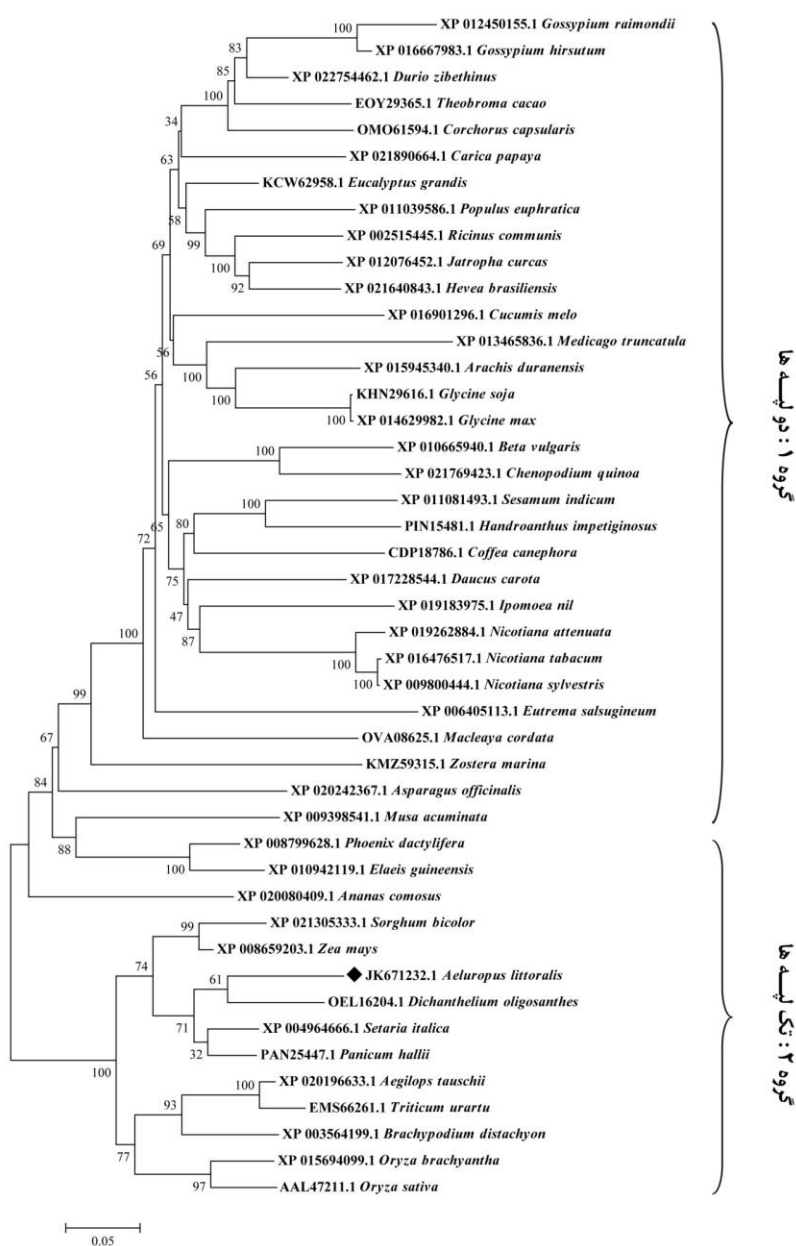
تمامی این تغییرات بمنظور تنظیم صحیح پروتئین در شرایط مختلف رشدی و محیطی صورت گرفته است (Blom *et al.*, 2004). در میان انواع تغییرات پس از ترجمه، یوبیکوئیتیناسیون، S-نیتروزیلاسیون و فسفریلاسیون بیشتر از سایرین مورد توجه قرار دارند، زیرا دخالت آنها در تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به تنش‌های محیطی به اثبات رسیده است (Guerra *et al.*, 2015). سیستم پروتئازوم یوبیکوئیتین (UPS) به‌عنوان یکی از مسیرهای سلولی بسیار مهم در ایجاد سازگاری با

بررسی تغییرات پس از ترجمه پروتئین PKL

تغییرات پس از ترجمه در پروتئین‌ها، به‌عنوان عوامل بسیار ضروری برای تنظیم و تعدیل مکانیسم‌های رشد و پاسخ به تنش مطرح می‌باشند (Blom *et al.*, 2004). در مطالعه حاضر، وقوع پنج تغییر اصلی پس از ترجمه در پروتئین PKL بررسی شد (جدول ۳). پیش‌بینی نواحی فسفریله شده در این پروتئین بیانگر توزیع بیشتر آن در ناحیه اسید آمینه سرین (۲۷ موقعیت) بود، در حالی که تنها ۵ و ۱ مورد فسفریلاسیون در اسید آمینه‌های به‌ترتیب تیروزین و سرئونین رخ داد. پیش‌بینی مکان‌های S-نیتروزیلاسیون نیز ۲ ناحیه در موقعیت‌های ۱۴۶ و ۴۲۶ پروتئین PKL را نمایان ساخت. همچنین ۷ و ۵ تغییر یوبیکوئیتیناسیون به‌ترتیب با درصد اطمینان متوسط و بالا در PKL شناسایی شد. نتایج نشان داد که ۵ ناحیه در موقعیت‌های ۱۷۹، ۳۷۰، ۵۲۶، ۸۳۹ و ۱۰۷۱، متحمل تغییر سیومویلاسیون شده‌اند، و همچنین ۳ ناحیه در موتیف‌های چسبنده به نواحی سیومویلاسیون در موقعیت‌های اسید آمینه‌ای ۱۱۲-۱۰۸، ۱۹۳-۱۸۹ و

سلول‌های گیاهی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Guerra *et al.*, 2015)، و با توجه به وجود بیش از ۳۰ ناحیه فسفریله شده در پروتئین PKL نقش این ژن در تنظیم پاسخ به تنش آشکار می‌گردد. بنابراین با توجه به تنظیمات و تغییرات خاص صورت گرفته در پروتئین کاندید، *AIPKL* در هالوفیت *Aeluropus littoralis* احتمالاً می‌تواند در زمره ژن‌های پاسخگو به تنش قرار گیرد.

تنش‌های غیر زنده ایفای نقش می‌کند (Radivojac *et al.*, 2010). وجود ۱۲ ناحیه یوبیکوئیتیناسیون در پروتئین PKL احتمالاً بیانگر دخالت مسیر UPS در تنظیم بیان ژن تحت شرایط تنش است. سیگنالینگ نیتریک اکسید نیز در طول شرایط تنش زای محیطی بواسطه واکنش‌های S-نیتروزیل‌اسیون در سلول رخ می‌دهد (Xu *et al.*, 2013). واکنش فسفریلاسیون در پروتئین‌ها نیز برای انتقال سیگنال‌های تنش در



شکل ۴. بررسی روابط فیلوژنتیکی ژن‌های PKL با استفاده از آنالیز تکاملی توالی‌های اسید آمینه در گونه‌های مختلف گیاهی. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 و بر مبنای روش neighbor-joining با استفاده از ۱۰۰۰ تکرار bootstrap رسم شد.

جدول ۳. تغییرات پس از ترجمه در توالی پروتئین PKL

سفریلاسیون ^۱	S-نیتروزیلاسیون	بویکوئیتیناسیون ^۲	سیومویلاسیون	N-گلیکوزیلاسیون
12 S LRVSERRP	146 IKWKGLSYIHCSWVSEKEYSE	35*	108-112 PLTEMERILDIEVLEAPRE	87
23 S ALDESDDDL	426 SSILKNIEWECLVVDEGHRLK	37**	179 RRQKEAMKIEAERSG	231
121 S PREDSSSTE		54**	189 - 193 AERSGEDIVAIRPEWTTVD	246
122 S REDSSSTEP		63*	370 ASRDIIRKYEFYYPK	354
123 S EDSSSTEPR		*498	526 VMKELPPKKELILRV	413
128 S TEPRSKKME		*820	694 - 698 NLATADTVHIYDSDWNPHA	566
154 Y SEKEYSEAA		*823	839 EAKAQAEKEEARRKA	669
185 S EAERSGEDI		*834	1071 LSGGRIWKAHDLILL	760
205 S RILASRKNL		839**		914
255 S RRRKSGDKG		845**		921
271 S QFKESPTFL		870**		956
389 S KKKSSPSNE		885*		1008
391 S KSSPSNEDK				1033
398 S DKKQSRIRF				1055
602 S LLDSSGKMQ				1099
729 S YRLVSRGTI				1123
732 T VSRGTIEER				1126
774 S IRYGSKELF				1138
809 S DGDESVEDE				
829 Y ANFEYIDEA				
883 S KGKRSRQOM				
899 S IHDLSSEDE				
900 S HDLSSEDED				
905 Y EDEDYSLED				
906 S DEDYSLEDD				
912 S EDDISDNDT				
923 S QGNISGKRG				
930 S RGQYSKRKS				
934 S SKRKS RNVD				
988 S LKGKSVVEI				
1012 Y NDSDYFSDG				
1035 S IANISLIEE				
1145 Y SMSHYKEIQ				

۱: S: سرین، T: سرتوئین، Y: تیروزین
 ۲: سطوح اطمینان * متوسط، و ** بالا

که احتمالاً *AlPKL* نقشی اساسی در ایجاد مقاومت به شرایط محرک محیطی در آلوروپوس ایفا می‌کند (Perruc et al., 2007).

پروفایل بیانی ژن *AlPKL* در پاسخ به شرایط مختلف شوری و ریکاوری در بافت‌های *Aeluropus littoralis*

در نتیجه آنالیز مرحله ذوب ژن مورد بررسی، تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص حاصل شد. این دستاورد بیانگر تک محصوله بودن آغازگرهای مورد استفاده می‌باشد. در واقع تکثیر غیر اختصاصی ژن مورد نظر رخ نداد، چرا که هیچ گونه پیک اضافی که معرف این نوع تکثیر است، مشاهده نشد (شکل ۵-الف).

۶ ساعت پس از اعمال تنش میزان بیان این ژن در بافت برگه به ۳/۵ برابر نمونه کنترل رسید (شکل ۵-ب). ۲۴ ساعت پس از تنش، میزان بیان در مقایسه با کنترل تقریباً ۳ برابر افزایش داشت و تا یک هفته بعد، بیان همچنان ثابت بود. بیان قابل

شناسایی عناصر تنظیمی *cis* پاسخگو به تنش عناصر تنظیمی *cis* موجود در توالی پروموتور ژن‌ها، به‌عنوان نواحی چسبنده برای آنزیم‌های RNA پلیمراز و فاکتورهای رونویسی مطرح می‌باشند، در نتیجه بیان ژن‌های مختلف را در شرایط خاص رشدی و محیطی کنترل می‌نمایند (Lescot et al., 2002). مطابق نتایج بررسی توالی پروموتور ژن همولوگ *ZmPKL*، ۱۶ نوع از عناصر *cis* پاسخ‌دهنده به شرایط محرک محیطی در این ناحیه یافت شدند (جدول ۴)؛ که برخی از آنها عبارتند از MBS (پاسخ به تنش خشکی)، TC-rich repeats (پاسخ دفاعی در برابر تنش) و HSE (پاسخ به تنش گرمایی).

علاوه بر این، برخی عناصر پاسخ‌دهنده به هورمون‌ها، از جمله GARE-motif (پاسخ به جیبرلین)، ABRE (پاسخ به اسید آبسزیک) و TGA-element (پاسخ به اکسین)، نیز در این ناحیه شناسایی شدند. بدین ترتیب با توجه به عناصر *cis* شناسایی شده در توالی پروموتور می‌توان اذعان داشت

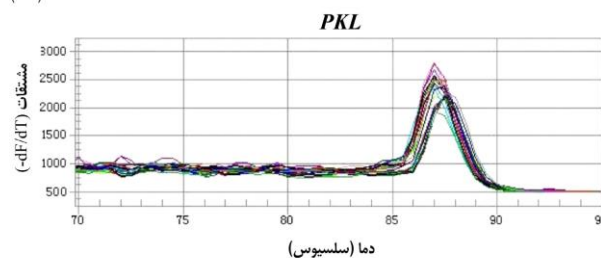
مذکور در ۲۴ ساعت و یک هفته پس از ریکاوری نیز، به تقریباً ۲/۵ و ۷ برابر نمونه کنترل افزایش یافت. با توجه به نتایج حاصل، ژن *PKL* در بافت برگ گیاه آلوروپوس احتمالاً می‌تواند به‌عنوان یک ژن پاسخگو به تنش شوری و عامل مقاومت مطرح شود (Zouari et al., 2007). شایان ذکر است که این ژن در بافت ریشه نیز احتمالاً با استفاده از مکانیسم متفاوتی به شرایط تنش‌زای محیطی پاسخ می‌دهد.

توجه ژن *PKL* طی شرایط ریکاوری، در تیمار دوم آن و با میزان ۲ برابر کنترل، مشاهده شد (شکل ۵-ا). در نمونه‌های ریشه نیز، ۶ ساعت پس از اعمال تنش افزایشی ۲/۵ برابری در میزان رونوشت‌های *AIPKL* در مقایسه با تیمار کنترل مشاهده شد (شکل ۵-ب). مقدار بیان در شرایط ریکاوری نیز بسیار قابل توجه بود، به این ترتیب که ۶ ساعت پس از ریکاوری بیان *PKL* افزایشی نزدیک به ۳ برابر تیمار کنترل را نمایان ساخت. میزان رونویسی از ژن

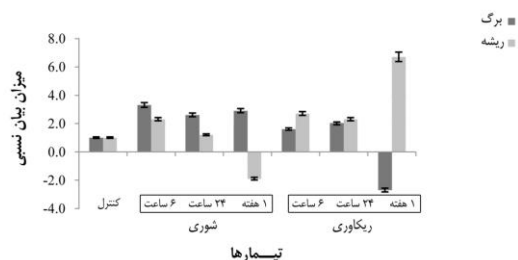
جدول ۴. عناصر تنظیمی *cis* عامل پاسخ به تنش در توالی پرموتر ژن *PKL*

تعداد	توالی	عملکرد	فاکتور تنظیمی
۳	AGAAACAA	دخیل در ایجاد پاسخ به نور	AE-box
۱	AAACCAATT	فاکتور پاسخ‌دهنده به تنش	ELI-box3
۵	TCTGTTG	دخیل در ایجاد پاسخ به هورمون جیبرلین	GARE-motif
۳	TAACGTG	فاکتور پاسخ‌دهنده به تنش خشکی	MBS
۱	TGGTTT	دخیل در ایجاد پاسخ به شرایط تحریک بی‌هواری	ARE
۱	TCTTAC	عامل پاسخ‌دهنده به نور	TCT-motif
۲	CAACGG	عامل اتصال به فاکتور رونویسی MYBHv1 برای ایجاد پاسخ دفاعی در برابر تنش	CCAAT-box
۱	ATTCTCTAAC	دخیل در ایجاد پاسخ دفاعی و عامل مقاومت در برابر تنش	TC-rich repeats
۳	TACGTGTC	عامل پاسخ به هورمون اسید آسبیزیک	ABRE
۴	CGTCA	عامل پاسخ به هورمون متیل جاسمونات	CGTCA-motif
۱	AAAAAATTC	عامل پاسخ به تنش گرمایی	HSE
۴	TGACGTAA	عامل پاسخ به هورمون اکسین	TGA-element
۴	CACGTG	عامل پاسخ‌دهنده به نور	G-Box
۳	CC(G/A)CCC	عامل پاسخ‌دهنده به نور	Sp1
۱	TCTTAC	عامل پاسخ‌دهنده به نور	TCT-motif
۴	TGACG	عامل پاسخ به هورمون متیل جاسمونات	TGACG-motif

(الف)



(ب)



شکل ۵. (الف) نتیجه آنالیز مرحله ذوب ژن *AIPKL* در هالوفیت *Aeluropus littoralis* تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص نشان داد، که بیانگر عدم وجود تکثیر غیر اختصاصی ژن است. (ب) بیان نسبی ژن *AIPKL* در پاسخ به دو شرایط تنش شوری (600 mM NaCl) و ریکاوری، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

به تنش می‌شود و بدین ترتیب حیات گیاه تا حد زیادی حفظ می‌گردد (Perruc et al., 2007).

نتیجه‌گیری

مطابق یافته‌های حاصل از آنالیزهای بیوانفورماتیکی می‌توان نتیجه گرفت که ژن مذکور احتمالاً در مکانیسم‌های پاسخ به شرایط محرک نقش مهمی را ایفا می‌نماید. نتایج حاصل از بررسی تعداد رونوشت‌های mRNA ژن مورد نظر، تحت شرایط تنش شوری و ریکاوری در بافت‌های مختلف گیاه *Aeluropus litoralis* نیز تاییدکننده این مطلب بود. با توجه به مطالعات صورت گرفته در زمینه گیاه آلورپوس، می‌توان این هالوفیت را به‌عنوان گونه‌ای مناسب برای جداسازی ژن‌ها و پروموتورهای عامل مقاومت به تنش‌های متعدد محیطی در نظر گرفت.

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4: 1633-1649.
- Caruthers JM, Johnson ER, McKay DB (2000) Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *PNAS.* 97: 13080-13085.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic acids Res.* 31: 3497-3500.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14: 1188-1190.
- Fischer R, Byerlee D, Edmeades GO (2009) Can technology deliver on the yield challenge to 2050. *FAO Expert Meeting on How to feed the World in 2050*, pp. 1-48.
- Fukaki H, Taniguchi N, Tasaka M (2006) PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of *ARF7* and *ARF19* activity during *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant J.* 48: 380-389.
- Furuta K, Kubo M, Sano K, Demura T, Fukuda H, Liu YG, Shibata D, Kakimoto T (2011) The CKH2/PKL chromatin remodeling factor negatively regulates cytokinin responses in *Arabidopsis* calli. *Plant Cell Physiol.* 52: 618-628.
- Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem. Sci.* 32: 63-70.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N

Furuta et al. (2011) نشان دادند که پروتئین‌های CHD به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی مهمی، در زمینه بیان ژن‌ها و فرآیندهای رشد و پاسخ به تنش عمل می‌کنند. ژن‌های *PKL* موجب تعدیل بیان سایر ژن‌های پاسخگو به تنش می‌شوند (Fukaki et al., 2006). ضرورت بیان این ژن در آراییدوپسیس، به منظور تنظیم بیان ژن‌های *ABI3* و *ABI5* در پاسخ به تنش ABA، نیز حاکی از دخالت این ژن در ایجاد پاسخ به تنش اسمزی بوده است (Perruc et al., 2007). نتایج حاصل از بررسی بیان *PKL* در آلورپوس نیز تاییدی بر این موضوع بود. چرا که با اعمال تنش شوری بر میزان بیان این ژن افزوده شد. در واقع می‌توان گفت که *PKL* در گیاه آلورپوس، جزء ژن‌های کنترل‌کننده شرایط تنش است و موجب تحریک و تنظیم بیان سایر ژن‌های پاسخگو

- (2011) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40: D1178-D1186.
- Guerra D, Crosatti C, Khoshro HH, Mastrangelo AM, Mica E, Mazzucotelli E (2015) Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: a spider's web of mechanisms. *Front. Plant Sci.* 6: 57.
- Gulzar S, Khan MA, Ungar IA (2003) Salt tolerance of a coastal salt marsh grass. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34: 2595-2605.
- Hasanuzzaman M, Hossain MA, da Silva JAT, Fujita M (2012) Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In: Bandi V, Shanker AK, Shanker C, Mandapaka M (ed.) *Crop stress and its management: Perspectives and strategies.* Springer, Berlin, pp. 261-316.
- Häuser R, Pech M, Kijek J, Yamamoto H, Titz B, Naeve F, Tovchigrechko A, Yamamoto K, Szaflarski W, Takeuchi N (2012) RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. *PLoS Genet.* 8: e1002815.
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier C, Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35: W585-W587.
- Hu B, Jin J, Guo AY, Zhang H, Luo J, Gao G (2014) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31: 1296-1297.
- Hu Y, Zhu N, Wang X, Yi Q, Zhu D, Lai Y, Zhao Y (2013) Analysis of rice Snf2 family proteins and their potential roles in epigenetic regulation. *Plant physiol. Biochem.* 70: 33-42.
- Jing Y, Zhang D, Wang X, Tang W, Wang W, Huai J, Xu G, Chen D, Li Y, Lin R (2013) *Arabidopsis* chromatin remodeling factor PICKLE interacts with transcription factor HY5 to regulate hypocotyl cell elongation. *Plant Cell* 25: 242-256.
- Köhler C, Aichinger E (2010) Antagonizing Polycomb group-mediated gene repression by chromatin remodelers. *Epigenetics* 5: 20-23.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 30: 325-327.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:651-681.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Perruc E, Kinoshita N, Lopez- Molina L (2007) The role of chromatin- remodeling factor PKL in balancing osmotic stress responses during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J.* 52: 927-936.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* 33: W116-W120.
- Radivojac P, Vacic V, Haynes C, Cocklin RR, Mohan A, Heyen JW, Goebel MG, Iakoucheva LM (2010) Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 78: 365-380.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. protoc.* 3: 1101-1108.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Xu Y, Shao XJ, Wu LY, Deng NY, Chou KC (2013) iSNO-AAPair: incorporating amino acid pairwise coupling into PseAAC for predicting cysteine S-nitrosylation sites in proteins. *PeerJ.* 1:

- e171.
- Yazdani B, Asghari-Zakaria R, Shobbar ZS (2015) Identification and classification of the WRKY transcription factors family in barley. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 4: 41-54.
- Zhao Q, Xie Y, Zheng Y, Jiang S, Liu W, Mu W, Liu Z, Zhao Y, Xue Y, Ren J (2014) GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res.* 42: W325-W330.
- Zhou L, Wang NN, Gong SY, Lu R, Li Y, Li XB (2015) Overexpression of a cotton (*Gossypium hirsutum*) WRKY gene, *GhWRKY34*, in *Arabidopsis* enhances salt-tolerance of the transgenic plants. *Plant Physiol. Biochem.* 96: 311-320.
- Zouari N, Saad RB, Legavre T, Azaza J, Sabau X, Jaoua M, Masmoudi K, Hassairi A (2007) Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. *Gene.* 404: 61-69.