Archive of SID

آنالیز ترانسکریپتوم ژن‌های القاء شده در پاسخ به تنش شوری در گیاه شورپسند *Aeluropus littoralis*

Transcriptom Analysis of Induced Genes in Response to Salt Stress in the Halophyte *Aeluropus littoralis*

سیده فرزانه فاطمی[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲*]، حسین عسگری[۳] و سیدحمیدرضا هاشمی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۳/۱۵

چکیده

شوری خاک با محدود کردن تولیدات گیاهی ابتدا جنبه‌های نموی را تحت تأثیر قرار می‌دهد که منجر به کاهش تولیدات گیاهی می‌گردد. در این تحقیق آنالیز بیان ژن مبتنی بر تکنیک cDNA-AFLP جهت مقایسه الگوی بیانی ناشی از تنش شوری در سه سطح ۰ (شاهد)، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار NaCl به‌مدت ۱ هفته پس از واکشت، در ریشه گیاه *Aeleuropus littoralis* که نزدیک‌ترین خانواده به غلات می‌باشد، انجام شد. از میان ۳۲ عدد EST جداسازی شده از روی ژل پلی‌اکریل‌آمید، ۲۵ عدد با طول میانگین ۲۵۰ جفت باز توالی‌یابی شدند. به‌میزان ۸۰٪ از رونوشت‌های توالی‌یابی شده با توالی اسیدآمینه و اسیدنوکلئیک شناسایی شده در موجودات دیگر، شباهت نشان دادند. از طرفی دیگر، ۷ رونوشت (EST) به‌عنوان ژن‌های جدید احتمالی در نظر گرفته شدند. در نهایت ۲۵ عدد EST در بانک ژن به ثبت رسید که مهم‌ترین آنها شامل گروه‌های پروتئینی انتقال‌دهنده پتاسیم، پروتئین‌های ریبوزومی، NADH دهیدروژناز و گولگین می‌باشند. نتایج این تحقیق در درک پایه‌های مولکولی تنش شوری و مکانیسم مقاومت جهت اصلاح و مهندسی ژنتیک در بهبود مقاومت غلات در برابر این تنش و تولید گیاهان مقاوم کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: شوری، cDNA-AFLP، بیان ژن، *Aeleuropus littoralis*

۱. کارشناس‌ارشد اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران
۲. استاد گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران
۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۴. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران
*: نویسنده مسوول Email: gh.nematzadeh@sanru.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

شوری خاک و آب آبیاری با محدود کردن تولیدات گیاهی یکی از چالش‌های بزرگ کشاورزی است. غلظت بالای نمک خاک سبب ایجاد تنش اسمزی و اختلال در هوموستازی و در نتیجه برهم زدن تعادل یونی گیاهان شده و در نتیجه منجر به خسارت در سطح مولکولی، توقف رشد و نهایتاً مرگ سلول می‌شود *زو* (Zhu, 2001). اصلی‌ترین اثرات زیان‌بار تنش شوری بر رشد و باروری گیاه به‌دلیل سمیت سلولی ناشی از یون‌های سدیم و کلر و تنش اسمزی است که هر دوی آنها منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد *زو* (Zhu, 2002). گیاهان سازگار با تنش‌های غیرزنده در جهت مقابله با تنش نمکی در سطح سلولی و مولکولی، به مکانیسم‌های پیچیده‌ای تکامل یافته‌اند. این مکانیسم‌ها شامل تجمع محافظت‌کننده‌های اسمزی، تنظیم هوموستازی یون و القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشند *هاسگاما* و همکاران؛ *کربس* و همکاران؛ *زو و زونگ* (Hasegawa *et al.*, 2000; Kreps *et al.*, 2002; Zhu and Xiong, 2002). 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. تحمل به تنش شوری به یک شبکه پیام‌رسانی پیچیده که دربردارنده چندین مسیر انتقال پیام می‌باشد، بستگی دارد که گیاهان را قادر می‌سازد تا به سرعت و به‌طور مناسب به تنش پاسخ دهند *زو* (2001). به‌منظور توسعه برنامه‌های اصلاح کلاسیک و مهندسی ژنتیک، درک مکانیسم‌هایی که گیاهان به‌واسطه آنها پیام‌های تنش را دریافت و انتقال می‌دهند و پاسخ‌های انطباقی را فعال می‌کنند حائز اهمیت است *کینوسامی* و همکاران (Reviewed by Chinnusamy *et al.*, 2005).

تکنیک‌های متعددی ازجمله DDRT-PCR، SSH، RDA، SAGE و cDNA microarray برای آنالیز ترانسکریپتوم مورد استفاده قرار گرفته اند *برین و زابو* (Breyne and Zabeau, 2001). تکنیک cDNA-AFLP بسیار کارآمد و با حجم عملیات کمتر جهت انگشت‌نگاری mRNA می‌باشد که برای مطالعه افتراقی بیان ژن در گستره ژنوم ارایه شده است *باخم* (Bachem, 1996). این روش بسیار حساس، مبتنی بر PCR و با تکرارپذیری بالا بوده و می‌توان بدون نیاز به اطلاعات قبلی از توالی‌های DNA از آن استفاده کرد *دیت* و همکاران (Ditt *et al.*, 2001). بنابراین، این تکنیک یک روش مطلوبی در مطالعه گونه‌هایی است که ژنوم آنها تاکنون توالی‌یابی نشده است و همچنین برای ژن‌هایی با میزان رونوشت کم محسوب می‌شود *فوکومورا* و همکاران (Fukumura *et al.*, 2003). از این تکنیک در جداسازی و تعیین خصوصیت ژن vacular /H^+ antiporter (Na^+)، *ژنگ* و همکاران (Zheng *et al.*, 2008)، بررسی ژن‌های مرتبط با شوری در گیاه نمک دوست *Spartina alterniflora* Loisel *بایساخ* و همکاران (Baisakh *et al.*, 2006) و آنالیز بیان ژن بین دو لاین گندم مقاوم به شوری RH8706-49 و حساس به شوری H8706-34 مورد استفاده قرار گرفته و منجر به شناسایی ژن synthase kinase–shaggy kinase (*TaGSK1*) به‌عنوان بخشی از ترکیبات درگیر انتقال سیگنال شوری در پاسخ به تنش شوری در گندم گردید *چن* و همکاران (Chen *et al.*, 2003).

تلاش‌های متعددی در جهت آنالیز کارکردی مکانیسم تحمل به شوری در شمار زیادی از گیاهان نمک‌دوست‌های دولپه انجام شده است. ولی اطلاعات در زمینه الگوهای بیان ژن در گیاهان نمک‌دوست تک‌لپه محدود است. گیاه نمک‌دوست *Aeluropus littoralis*، از گونه‌های نمک‌دوست مناطق بیابانی و شوره‌زار محسوب می‌شود *اخانی و قربانعلی* (Akhani and Ghorbanli, 1993). متابولیسم این گیاه تک‌لپه از نوع C4 بوده که انعطاف‌پذیری بیشتری در برابر تنش‌های خشکی و شوری دارد. این گیاه توانایی تحمل نسبت‌های بالای Na^+/K^+ را دارد و می‌تواند شوری را تا سطح ۱۱۰۰ میلی‌مولار *گلزار* و همکاران (Gulzar *et al.*, 2001) تحمل کند. از طرفی دیگر، بیان ژن *AlSAP* در *آلوروپوس لیتورالیس* سبب مقاومت به تنش شوری و خشکی و سرما، از طریق حفظ پایداری دستگاه فتوسنتزی گردیده است *بن سعد* و همکاران (Ben Saad *et al.*, 2012). مطالعه حاضر با هدف شناسایی و دستیابی به ژن‌های درگیر در تحمل به تنش شوری در گیاه *A. littoralis* با استفاده از تکنیک Capture cDNA- AFLP اجرا شد.

مواد و روش‌ها

کاشت مواد گیاهی

بذر *A. littoralis* از مرکز تحقیقات پاکان بذر اصفهان تهیه شد و پس از ضدعفونی با هیپوکلریدسدیم ۲/۵٪ (v/v) و توئین ۲۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه، چندین بار شستشو داده شد. بذر این گیاه در داخل ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع MS *موراشیگ و اسکوک* (Murashige and Skoog, 1962) فاقد هورمون، غنی شده با سوکروز ۳٪ و ویتامین قرار داده شدند. بذور آلوروپوس در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۲۰ به‌مدت ۷ روز نگهداری شدند. غلظت‌های مختلف ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار پس از محاسبه به محیط‌کشت اضافه شدند و پس از واکشت، گیاهچه‌ها تحت

www.SID.ir

Archive of SID

تیمار صفر، (شاهد)، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار از NaCl در ۵ تکرار قرار گرفتند. سپس با گذشت 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، mRNA و سنتز cDNA

RNA موجود در ریشه گیاهان تحت تنش شوری و شاهد بلافاصله پس از برداشت با کیت جداسازی RNA (ترایزول Cat. No. 15596-018) شرکت اینویتروژن مطابق دستورالعمل ذکر شده در کیت استخراج شد. RNA استخراج شده از تکرارهای مختلف مربوط به هر سطح شوری و شاهد با مشاهده عدم‌وجود تفاوت معنی‌دار بین گیاهان موجود در هر تکرار، جهت کاهش خطای آزمایشی بین تیمارها به‌طور جداگانه با یکدیگر ترکیب گردیدند. برای تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز استفاده شد و بر مبنای آن نرمال‌سازی RNA استخراج شده در هر تیمار صورت گرفت. ۲۰ میکروگرم از RNA جهت استخراج mRNA، با دستورالعمل mRNA capture kit شرکت Roche و با استفاده از تیوپ‌های PCR حاوی استرپتاویدین (streptavidin) استخراج شد. توالی پلی A موجود در mRNA به توالی پلی T نشان‌دار شده با بیوتین متصل می‌شود. سپس این مخلوط در تیوپ PCR پوشیده شده با استرپتاویدین (streptavidin) قرار گرفته و پس از اتصال به دیواره تیوپ، به‌صورت بی‌حرکت باقی می‌ماند. پس از شستشو با بافر مربوطه، بقیه ترکیبات آزاد در تیوپ شسته شده و بدین ترتیب فقط mRNA متصل به توالی پلی T در تیوپ باقی می‌ماند که این توالی در مرحله RT-PCR به‌عنوان پرایمر عمل می‌کند. کلیه مراحل تا ساخته شدن رشته دوم مطابق دستورالعمل شرکت اینویتروژن cDNA در همان تیوپ صورت گرفت.

آنالیز AFLP، جداسازی ESTها از ژل و تکثیر مجدد آنها

هضم آنزیمی با استفاده از ۴۰۰ نانوگرم از هر یک از نمونه‌های dscDNA حاصل از مرحله قبل به وسیله ده واحد از آنزیم‌های *Mse*I و *Taq*I (شرکت فرمنتاز) مورد هضم قرار گرفت. پس از پایان اولین واکنش هضم آنزیمی که در داخل تیوپ‌های حاوی streptavidin انجام شد، نمونه‌ها یک مرتبه با بافر شستشو به حجم ۲۵۰ میکرولیتر شستشو داده شدند. سپس مواد واکنش جهت دومین هضم آنزیمی به حجم ۵۰ میکرولیتر به هر تیوپ حاوی dscDNA حاصل از مرحله قبل افزوده شد. جهت انجام واکنش اتصال، به مخلوط حاصل از مرحله هضم آنزیمی، با استفاده از آداپتورهای اختصاصی بر طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز به ازای هر واکنش افزوده شد. محصولات مرحله اتصال با استفاده از ترکیب پرایمری *Mse*I + N و *Taq*I + N در معرض واکنش مرحله پیش‌تکثیر قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر بر طبق دستورالعمل 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:

*Taq*I: 5'-GACGATGAGTCCTGACCGA-3'
*Mse*I: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

محصولات مرحله پیش تکثیر با استفاده از آغازگرهای دارای دو باز انتخابی در انتهای '۳ مورد تکثیر انتخابی قرار گرفتند. پس از تکثیر، محصولات PCR با ۵ میکرولیتر از محلول فرم‌آمید مخلوط شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه جهت الکتروفورز بر روی ژل اکریل‌آمید واسرشته ۶ درصد مورد استفاده قرار گرفت. پس از پایان الکتروفورز از رنگ‌آمیزی نیترات نقره جهت مشخص کردن الگوی باندی استفاده گردید. در پایان عکسبرداری از الگوی باندی به‌دست آمده با استفاده از دستگاه دنسیتومتر Imaging densitometer (GS-800, Bio-Rad, USA) صورت گرفت در ادامه آنالیز ESTها با استفاده از نرم‌افزارهای Quantity one و Total Lab TL120 صورت گرفت. باندهائی که با هدف بیان اختصاصی براساس بیان و عدم‌بیان در سطح شاهد و تیمارهای مختلف نمکی بیان افتراقی نشان داده بودند با استفاده از تیغ یا تیپ کریستالی استریل و با اضافه نمودن مقداری آب به باند موردنظر در سطح ژل، از ژل جدا شده و دقیقاً مشابه مرحله تکثیر پیش انتخابی تکثیر گردیدند. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و پس از تأیید اندازه باند بر روی ژل، کلون گردیدند.

همسانه‌سازی محصولات PCR، توالی‌یابی TDFها و آنالیز بیوانفورماتیک

همسانه‌سازی محصولات PCR در پلاسمید pTZ57R/T شرکت فرمنتاز (InsTAclone PCR Cloning Kit) انجام و از کلونی‌های سفید انتخابی با آغازگر M13 برای مرحله cloning pcr استفاده شد. براساس آنالیزهای صورت گرفته در کل ۳۲ عدد EST از روی ژل پلی‌اکریل‌آمید جداسازی، تکثیر مجدد و خالص‌سازی شد و پس از تأیید اندازه باندها بر روی ژل آگارز و خالص‌سازی آنها، توالی‌یابی ESTها با ارسال به شرکت GATC

www.SID.ir

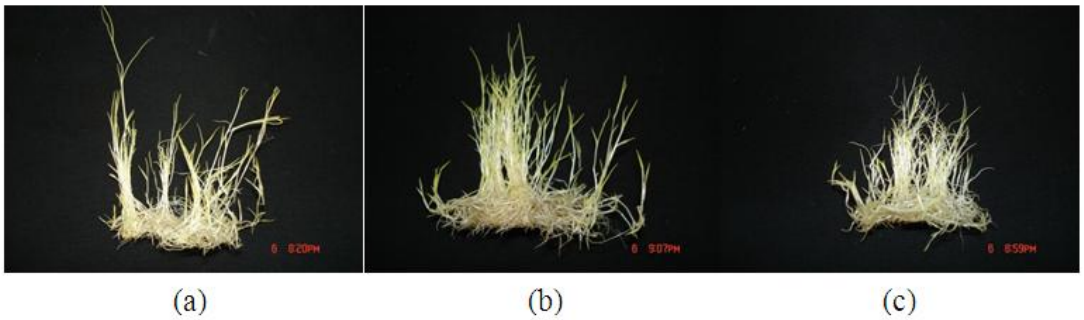
Archive of SID

کشور آلمان صورت گرفت. به‌منظور تولید ESTها از کتابخانه‌های ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار Chromas LITE v2.01 توالی ناقل، توالی‌های آداپتور، توالی Poly A و توالی‌های دارای کیفیت پایین حذف گردید. به‌منظور تعیین میزان شباهت ESTهای جداسازی شده از الگوریتم BLASTx، BLASTn و tBLASTx در پایگاه داده‌ها (NCBI) استفاده گردید. همچنین به‌منظور بررسی عملکرد مولکولی هر EST به‌عنوان 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.

نتایج و بحث

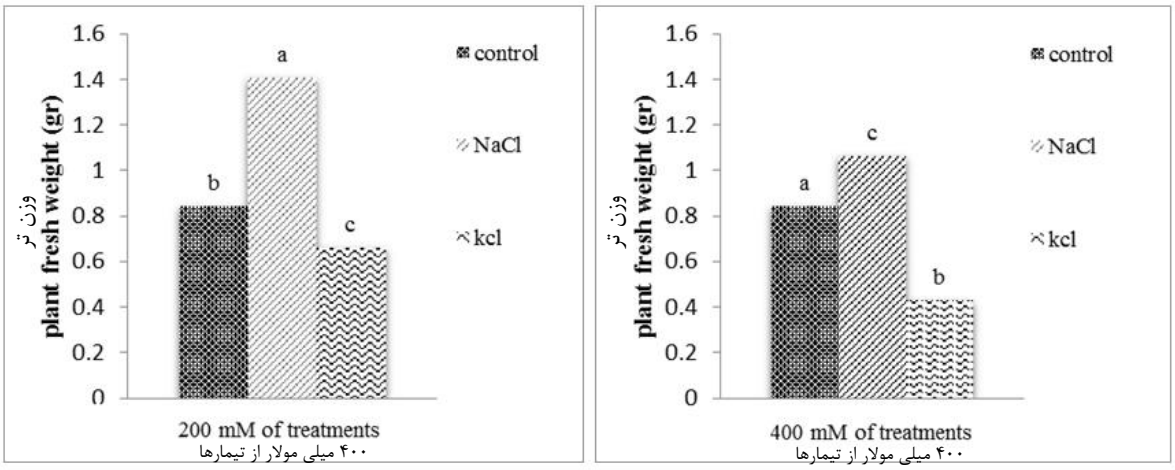
پاسخ رشدی گیاهچه‌ها به تنش شوری

بذور *آلوروپوس لیتورالیس* پس از تیماردهی در پاسخ به سطوح مختلف تنش شوری، پاسخ‌های رشدی متفاوتی نشان دادند (شکل ۱). پاسخ گیاهچه‌ها نسبت به کلریدسدیم به‌خوبی نشان‌دهنده طبیعت نمک‌دوست بودن گیاه *آلوروپوس لیتورالیس* بوده، به‌طوری‌که نه تنها در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار این نمک هیچ‌گونه کاهش معنی‌داری در تولید بیوماس نسبت به کنترل مشاهده نشد، بلکه مقدار آن افزایش یافت. در غلظت ۲۰۰ الی ۴۰۰ میلی‌مولار کاهش رشد گیاهچه‌های تحت تیمار در مقایسه با شاهد مشاهده شد. پاسخ‌های متفاوت در تولید بیوماس، در تیمارهای مختلف نمکی NaCl و KCl با غلظت یکسان حاکی از وجود اثرات ویژه یونی می‌باشد به‌طوری‌که تولید بیوماس در تیمار نمکی KCl کمتر از تیمار نمکی NaCl بوده است و این نشان‌دهنده سمیت بیشتر یون پتاسیم نسبت به سدیم می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به‌دست آمده توسط *سوسا و همکاران* (Sosa *et al.*, 2005) و *یونیس* و همکاران (Younis *et al.*, 1971) مطابقت دارد (شکل ۲).



شکل ۱: پاسخ رشدی گیاهچه *آلوروپوس لیتورالیس* به سطوح مختلف تنش نمک، ۱ هفته پس از واکشت، (a) صفر (شاهد)، (b) ۲۰۰mM و (c) ۴۰۰ mM

Fig. 1: Growth response of *A. littoralis* to different levels of NaCl, 1 week after subculture, a) control, b) 200 mM, c) 400 mM



شکل ۲: پاسخ‌های متفاوت در تولید بیوماس; تولید بیوماس در تیمار نمکی KCl کمتر از تیمار نمکی NaCl در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار بوده است و این نشان‌دهنده سمیت بیشتر یون پتاسیم نسبت به سدیم می‌باشد

Fig. 2: Different responses in biomass production; Biomass production in KCl treatment is lower than NaCl treatment in both 200 and 400 mM. that shows more toxic effects of KCl than NaCl

www.SID.ir

Archive of SID

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 مکانیسم افزایش خواهد داد *کراسون* و همکاران (Craciun *et al.*, 2006). cDNA-AFLP این امکان را فراهم می‌نماید که تفاوت‌ها و شباهت‌های بیانی در پاسخ به تنش نمکی قابل مشاهده گردند *باخم* و همکاران (1996). در این زمینه تولید ESTها و آنالیزهای کلی ترانسکریپتوم روشی قدرتمند، دقیق و نسبتاً ارزان می‌باشد که موجب شناسایی مکانیسم‌های ژنتیکی تحمل تنش خواهد شد. cDNA-AFLP یک تکنیک بسیار سودمند برای بررسی بیان ژن در مقیاس وسیع می باشد *برین و زابو* (Breyne and Zabeau, 2001). قابل اطمینان بودن این تکنیک در مطالعات متعددی تأیید شده است *اومزاوا* و همکاران؛ *باخم* و همکاران، 1996؛ *گو* و همکاران (Umezawa *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2009).

جهت اجرای تکنیک cDNA-AFLP انتخاب ترکیب‌های پرایمری مناسب جهت بهینه‌سازی الگوی باندهی صورت گرفت. در این تحقیق از ۱۰ ترکیب آغازگر استفاده شد که در این میان ۶ ترکیب باندهای واضحی را ایجاد نمودند که جهت آنالیز ترانسکریپتوم انتخاب شدند. جهت شناسایی رونوشت‌هایی که به‌صورت افتراقی بیان شده بودند، الگوهای بیانی در ریشه در سطوح مختلف نمکی نسبت به شاهد بررسی شد. از ۶ ترکیب آغازگر به‌کار رفته در این تحقیق در مجموع ۱۰۵ TDF قابل امتیازدهی تولید کردند که ۳۶ باند آن چندشکل بودند. تعداد باندهای تولید شده به‌وسیله هر جفت آغازگرهای مورد استفاده از ۳۵ تا ۵۰ و تعداد نوارهای چند شکل از ۱۸ تا ۲۴ عدد متغیر بود.

در این پژوهش به‌منظور پوشش دادن به کل ژنوم و تولید قطعاتی با قابلیت تفکیک روی ژل ۶٪ پلی‌اکریل‌آمید توالی‌های موجود از این گیاه در بانک ژن (NCBI) با در نظر گرفتن معیارهایی 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 به‌عنوان توالی‌های احتمالی جدید در نظر گرفته شدند. این توالی‌های 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. به‌طوری‌که در گیاه *Thellungiella halophile* حدود ۱/۵٪ از قطعات جداسازی شده *ونگ* و همکاران (Wang *et al.*, 2004)، در گیاه نمک‌دوست *Spartina alterniflora* ۳٪ *بایساخ* و همکاران (Baisakh *et al.*, 2006)، در گیاه *Foxtail Millet* ۱۵٪ *جیارمن* و همکاران (Jayaraman *et al.*, 2008)، و در گیاه سویا ۱۴٪ *اومزاوا* و همکاران (2002)، به‌عنوان ژن‌های جدید و ناشناخته در نظر گرفته شدند.

شناسایی رونوشت‌های مرتبط با شوری

پس از آنالیزهای صورت گرفته بر روی ۳۲ عدد EST جداسازی شده از روی ژل پلی‌اکریل‌آمید، در نهایت ۲۵ EST با طول میانگین ۲۵۰ جفت باز در بانک ژن به ثبت رسید که بازده توالی‌یابی ۷۸٪ بود. میزان تشابه این توالی‌های انتخاب شده با استفاده از الگوریتم BLASTx، BLASTn و tBLASTx در بانک ژن (NCBI GenBank) با دیگر توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی مورد آزمون همردیفی قرار گرفت (جدول ۱). در این میان ۸۰٪ از رونوشت‌ها با پروتئین‌ها و توالی‌های اسیدنوکلئیک شناسایی شده در ارگانیسم‌های دیگر، شباهت نشان دادند. در نهایت ۷ رونوشت هیچ تشابه قابل‌ملاحظه‌ای در آزمون‌های همردیفی انجام شده نشان ندادند و به‌عنوان توالی‌های جدید و ناشناخته در نظر گرفته شدند.

الگوهای بیانی مشاهده شده در نتایج به‌دست آمده در پاسخ گیاه *آلوروپوس لیتورالیس* به تنش شوری به پنج گروه کاملاً مجزا دسته‌بندی می‌شود: ۱) TDFهایی که در اثر افزایش میزان خشکی بیانشان افزایش می‌یابد ۲) TDFهایی 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 NaCl وجود نداشته و فقط در گیاهان شاهد قابل شناسایی بودند و در مقابل ژن‌های فعال شده تنها در گیاهان تحت استرس قابل شناسایی بوده و در گیاهان شاهد بیان نشدند. در پژوهش‌های صورت گرفته توسط *جیارمن* و همکاران (2008) بر روی گیاه *Foxtail millet* (*Setaria italic* L.) و در بررسی پاسخ گیاه نمک‌دوست *Kosteletzkya virginica* به تنش شوری چنین الگوهای بیانی مشاهده شد *گو* و همکاران

www.SID.ir

Archive of SID

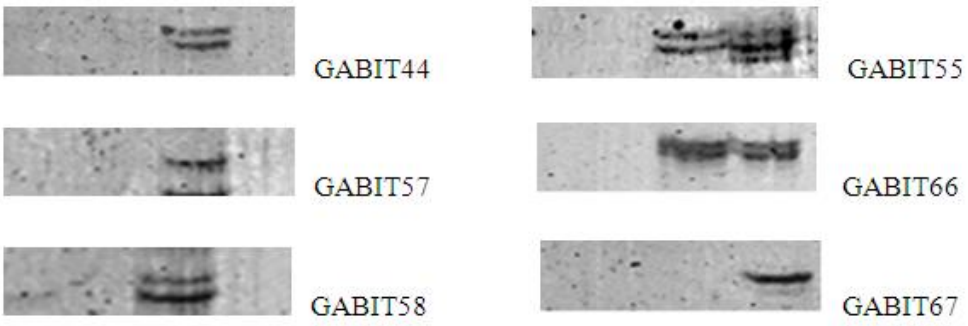
(Gue *et al.*, 2009). در این تحقیق دسته‌بندی ۳ و ۴ مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۳).

در پاسخ گیاه *آلوروپوس لیتورالیس* به تنش شوری الگوهای متفاوتی بر حسب بیان و عدم‌بیان توالی‌های زیر مشاهده گردید (شکل ۴):

جدول ۱: نتایج حاصل از آزمون همردیفی ESTهای مرتبط با تنش شوری و شباهت قطعات مشتق شده از رونوشت‌ها با ارگانیسم‌های دیگر. مقدار ارزش مورد انتظار کمتر از $۱۰^{-۸}$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است

Table 1: The results of EST Blast analysis in response to salt stress and their similarity with other organisms

نام EST EST name	طول EST EST length(bp)	شماره ID	شماره دسترسی در بانک ژن Accretion	توالی‌های مشابه حاصل از بلاست Blast alignment	نام گیاه Plant name	میزان همپوشانی Query coverage	حداکثر تشابه Mox identity	ارزش مورد انتظار E-valu
GABIT26	458	78011829	JZ191067	uncharacterized protein	*Zea mays*	79%	61%	1e-47
GABIT4	309	78011807	JZ191045	unknown	*Zea mays*	62%	59%	5e-16
GABIT66	179	78011869	JZ191107	-	-	-	-	-
GABIT67	152	78011870	JZ191108	-	-	-	-	-
GABIT68	166	78011871	JZ191109	-	-	-	-	-
GABIT55	221	78011858	JZ191096	potassium transporter 18-like	*Glycine max*	61%	95%	5e-17
GABIT56	240	78011859	JZ191097	hypothetical protein	*Sorghum bicolor*	98%	71%	2e-30
GABIT57	212	78011860	JZ191098	golgin candidate 4-like	*Brachypodium distachyon*	63%	91%	4e-13
GABIT58	207	78011861	JZ191099	calcineurin B-like-interacting protein kinase	*Hordeum brevisubulatum*	97%	44%	8e-12
GABIT44	323	78011847	JZ191085	40S ribosomal protein S3-3-like	*Oryza sativa Japonica Group*	98%	97%	1e-63



شکل ۳: بیان و عدم‌بیان رونوشت‌های مرتبط با تنش NaCl در رشه گیاهچه‌ها در سه سطح ۱) شاهد، ۲) ۲۰۰mM، ۳) ۴۰۰mM

Fig. 3: on and off regulation of transcript in response to NaCl in roots at three levels: 1) control, 2) 200 mM, 3) 400 mM

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۴: دسته‌بندی TDFها از لحاظ نوع عملکرد در ریشه گیاه *آلوروپوس لیتورالیس*
Fig. 4: TDF Classification based on their function in A. littoralis root

پروتئین انتقال‌دهنده پتاسیم

در این تحقیق TDF، GABIT55 با کد دسترسی JZ191096 در NCBI مشابه پروتئین potassium transporter شناخته شد. این پروتئین‌ها در غشای پلاسمایی قرار گرفته و در انتقال یون پتاسیم، انتقال ناقلین غشایی یون سدیم (Sodium ion transmembrane transport) در پاسخ به تنش اسمزی و تنش شوری نقش دارد (http.//www.geneontology.org). هموستازی سدیم و پتاسیم در گیاه از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد و گیاه توسط پمپ‌های یونی به‌طور فعال در حال تبادل سدیم و پتاسیم بین سیتوزول و محیط اطراف می‌باشد. داده‌های جدید ژنتیک مولکولی و الکتروفیزیولوژی گیاهی پیشنهاد می‌نماید که توانایی گیاه در بالا نگه داشتن نسبت پتاسیم به سدیم در سیتوزول نقشی کلیدی در مقاومت گیاه به شوری دارد *شابالا و سون* (Shabala and Ciun, 2007). زمانی‌که گیاه در معرض غلظت‌های بالای یون سدیم قرار می‌گیرد و حجم وسیعی از این یون به سمت سیتوزول سرازیر می‌گردد هموستازی پتاسیم-سدیم برهم می‌خورد بنابراین سلول با فعال نمودن انتقال‌دهنده‌های پتاسیم به داخل سلول در جهت مقابله با افزایش سدیم فعالیت می‌نماید. این مطالعه نشان داده است که در غلظت بالای نمک کلریدسدیم ژن پتاسیم ترانسپورتر به‌طور چشمگیری افزایش بیان نشان می‌دهد. احتمالاً این مسأله می‌تواند مؤید استفاده از مکانیسم فوق‌الذکر در گیاه *آلوروپوس* نیز باشد. تغییر نسبت یون موجود در گیاه به‌علت نفوذ یون سدیم از طریق مسیرهای جذب یون پتاسیم می‌باشد *بلوم والد* و همکاران (Blumwald *et al.*, 1987). میزان حساسیت آنزیم‌های موجود در سیتوزول به نمک در گیاهان گلیکوفایت و نمک‌دوست مشابه است و این نشان می‌دهد که حفظ نسبت غلظت بالای K^+/Na^+ در سیتوزول یک نیاز اساسی برای رشد گیاه در حضور تنش شوری می‌باشد *گلن* و همکاران (Glenn *et al.*,1999).

پروتئین‌های ریبوزومی

پروتئین‌های ریبوزومی پروتئین‌هایی هستند که به rRNA متصل می‌شوند و یک واحد عملکردی را به‌وجود می‌آورند که نقش مرکزی را در فرایند ترجمه بر عهده 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 قابل‌توجهی از پروتئین‌های ریبوزومی در حضور تنش افزایش بیان نشان داده‌اند *کاواساکی* و همکاران (Kawasaki *et al.*, 2001). قرار دادن *آرابیدوپسیس* تحت تنش شوری باعث افزایش بیان ۹۲ ژن از زیرواحدهای پروتئین‌های ریبوزومی گردید. این حجم وسیع از تغییرات بیان پروتئین‌های ریبوزومی پیشنهاد می‌کند که تحت شرایط تنش مسیرهای سنتز پروتئین‌ها به شدت تحریک می‌گردند تا نهایتاً بتوانند پروتئین‌های مورد نیاز در مقاومت به تنش را در سریعترین زمان ممکن تولید نمایند *گنگ* و همکاران (Gong *et al.*, 2005). در این تحقیق TDF، GABIT44 با کد دسترسی JZ191085 در NCBI مشابه پروتئین های ریبوزومی شناخته شد.

NADH دهیدروژناز

گیاهان عالی چندین مکانیسم محافظتی در برابر تنش شوری ازجمله هموستازی یون، بیوسنتز اسمولیت‌ها، مهار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و حمل‌ونقل آب دارند *هاسگاوا و برسان* (Hasegawa and Bressan, 2000). تنش‌های زیادی ازجمله تنش شوری تولید بیش از حد ROS از قبیل O_2 و H_2O_2 را القاء می‌کند که سبب خسارت اکسیداتیو مرتبط با تنش می‌شود *دت و همکاران*، *میتلر* (Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002).

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهان تحت شرایط تنش نیازمند مکانیسم سمیت‌زدایی جهت حذف ROS می‌باشند *گومز* و همکاران؛ *ماتور* و همکاران (Gomez *et al.*, 2004; Mathur *et al.,* 2008). در سلول‌های گیاهی زنجیره انتقال الکترون میتوکندری (ETC) مکان اصلی تولید ROS است و شامل تعدادی از آنزیم‌ها مانند اکسیداز جایگزین (alternative oxidase) و alternative NADH dehydrogenases می‌باشند که در سمیت‌زدایی ROS نقش دارند. این آنزیم‌ها از NADH درون غشا (NDin) و NADH بیرونی (NDex) به‌عنوان پیش‌ماده استفاده می‌کنند وانلربرگ و میکینتوچ، راسموسان (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Rasmusson *et al.,* 1999). به‌دلیل وابستگی آنها به حضور یون کلسیم Ca^{2+}، NADH بیرون غشا (NDex) ممکن است فقط در زمانی‌که سلول گیاه تحت تنش باشد فعال گردد. NADH درون غشا (NDin) در شرایطی که غلظت NADH ماتریس افزایش یابد، مسئول اکسیداسیون مجدد آن می‌باشد *مولر و پالمر*؛ *یان* و همکاران؛ *نوبورگر* و همکاران (Ian *et al.,* 1998; Møller and Palmer, 1982; Neuburger *et al.,* 1984). وظیفه alternative oxidase (اکسیداز جایگزین) و عملکرد احتمالی NDin، محدود کردن تولید ROS میتوکندری از طریق اکسید کردن نسبی ETC می‌باشد؛ بنابراین در این تحقیق بیان رونوشت آنزیم NADH dehydrogenase در طی تنش شوری، بیانگر مکانیسمی قدرتمند جهت مهار ROS در گیاه *آلوروپوس* می‌باشد. TDF، GABIT66 با کد دسترسی JZ191107 در NCBI مشابه آنزیم مربوطه شناخته شد.

این مطالعه بیانگر این است که الگوهای بیانی در گیاه نمک‌دوست *آلوروپوس* تحت تنش کلرید سدیم به نحوی تغییر می‌کند تا گیاه بتواند در شرایط تنش زنده بماند. زنده‌مانی گیاه با افزایش غلظت نمک تا ۴۰۰ میلی‌مولار، این حقیقت را اثبات می‌کند که این گیاه دارای مکانیسم‌هایی جهت مقاومت در برابر تنش نمک می‌باشد. پاسخ به القای تنش در درجه اول در سطح رونویسی رخ می‌دهد و تنظیم زمانی و مکانی الگوهای بیان ژن‌های خاص درگیر در تنش، بخش مهمی از پاسخ گیاه به تنش است *ساین* و همکاران (Singh *et al.,* 2002). تکنیک‌هایی از قبیل خاموش کردن و یا افزایش بیان اجزای خاص سیگنال، ممکن است نقش این ژن‌ها را در مسیرهای خاص تأیید کند. در نتیجه، تجزیه و تحلیل عملکردی و خصوصیات‌یابی بیشتر ژن‌هایی که در این مطالعه مشخص شده‌اند، می‌تواند منجر به درک جامع‌تری از تحمل به تنش شوری در گیاه *آلوروپوس لیتورالیس* گردد. به‌دلیل آنکه این گیاه از خانواده غلات می‌باشد دانش مکانیسم تحمل به خشکی و ژن های کلیدی درگیر در تحمل به شوری در این گیاه، جهت اصلاح و مهندسی ژنتیک ارقام متحمل به خشکی در دیگر اعضای این خانواده ازجمله ذرت، گندم، جو و برنج بسیار مفید خواهد بود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲۲-۲۳ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir