مجله علوم کشاورزي ایران
جلد ۳۶، شماره ۶، سال ۱۳۸۴

افزایش بیان ژنهای سوکسینات دهیدروژناز و پروفوبیلینوژن دی آمیناز در پاسخ به تنش شوری درگندم ماهوتی

فرهاد قوامی[۱]، محمد علی ملبوبی[۲]، محمد رضا قنادها[۳]، تهمینه لهراسبی[٤]، بهمن یزدی صمدی[٥]، جواد مظفری[٦] و آنیا پلنت[۷]
۱، ۳، ۵، دانشجوی دوره دکتری و استادان، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،
۲، ٤، دانشیار پژوهش مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی
٦، محقق بخش ژنتیک و ذخایر توارثی، موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، جاده ماهدشت،
۷، محقق گروه بیولوژی دانشگاه علوم دانشگاه سیمون فریزر، ونکوور، کانادا
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۱۲/۲۵

خلاصه

به منظور شناسایی مکانیسم های درگیر در تحمل به شوری ، ژنهای پاسخ دهنده به تنش شوری از گندم ماهوتی که از متحمل ترین ارقام بومی کشور به تنش شوری می باشد توسط روش نمایش افتراقی جداسازی گردید. دو ژن که تعداد نسخه های آنها در اثر شوری افزایش می یابد wsr1 و wsr2 نامیده شدند. wsr1 شباهت بسیار زیادی به آنزیمی بنام سوکسینات دهیدروژناز داشت. افزایش رونوشت این ژن در اثر شوری احتمالا" مربوط به واکنشی است که گندم ماهوتی برای رفع مسمومیت ناشی از یون سدیم در چرخه تنفسی سلول بکار می برد. ترجمه توالی wsr2 شبیه به آنزیم پروفوبیلینوژن دی آمیناز می باشد که آنزیم کلیدی در ساخت تتراپیرولهاست که پیش ماده ساخت کلروفیل ها هستند. به نظر می رسد که در تنش شوری بلند مدت، گیاه متحمل برای جایگزین کردن کلروفیل های از دست رفته اقدام به افزایش این آنزیم و سنتز بیشتر تتراپیرولها می نماید.

واژه های کلیدی: **پروفوبیلینوژن دی آمیناز، سوکسینات دهیدروژناز، شوری، گندم، نمایش افتراقی**

مقدمه

امروزه جداسازی ژن های مربوط به صفات تک ژنی و انتقال آنها به گیاهان توسط روش های مهندسی ژنتیک به صورت معمول در آمده است. در این ارتباط، طرح های اصلاحی زیادی برای بهبود تولیدات گیاهی و مقاومت به طیف گسترده‌ای از آفات و بیماری ها با موفقیت به انجام رسیده و در سطح گسترده و تجاری استفاده می‌گردد. اما پیشرفت در صفات چند ژنی نظیر تحمل به شوری و خشکی در گیاهان زراعی و زینتی با دشواری‌ها و کندی زیادی همراه بوده است. شاید به این دلیل که این صفات کمی بوده و فقط قسمتی از پاسخ های چند ژنی تحت شرایط خشکی و شوری قابل ردیابی است (۲۳). روش‌های سنتی اصلاح نباتات نیز که بر اساس به کارگیری تنوع ژنتیکی حاضر در ژرم پلاسم موجود، تلاقی بین گونه ای و بین جنسی، ایجاد موتاسیون و تنوع سوماکلونال سعی در ایجاد ارقام متحمل به شوری و خشکی داشته اند به خاطر پیچیده بودن این صفات چندان موفق نبوده اند(۷).

با این وجود، در طی دو دههٔ گذشته امکاناتی فراهم شده است که کاربرد زیست شناسی ملکولی را برای حل مشکلات پیچیده فیزیولوژیک ممکن ساخته است(۳). بر همین اساس امروزه اطلاعات زیادی دربارهٔ اساس ملکولی تحمل به تنش‌ها در دسترس بوده و روش های جداسازی، تجزیه و تحلیل ساختمان و عملکرد ژن های گیاهی راه‌اندازی گردیده است. از آنجا که برخی ژن ها نقش کلیدی در پاسخ به چنین تنش های محیطی را دارند، امید می رود بتوان با استفاده از امکانات موجود این ژن‌ها را شناسایی نمود. به موازات این تلاش‌ها، ایجاد گیاهان تراریخت برای بسیاری از گیاهان زراعی میسر گردیده و باعث

مکاتبه کننده: فرهاد قوامی

Archive of SID
www.SID.ir

شکل گیری استراتژی های آزمایشی مناسب برای افزایش تحمل به تنش ها در گیاهان گردیده است (۵، ۲۳).

با وجود پیشرفت‌های اخیر، مکانیسم‌های ملکولی و بیوشیمیایی درگیر در تحمل به شوری به خصوص در تنش های طولانی مدت هنوز عمدتا" ناشناخته است. بدیهی است قبل از مهندسی گیاهان متحمل به شوری بایستی اطلاعات کافی در زمینه اساس ملکولی و ژنتیکی مقاومت به تنش‌ها بدست آید (۳). این اطلاعات کمک خواهد کرد تا استراتژی های مناسب را جهت دستکاری گیاهان و به نژادی آنها با استفاده از روش های ملکولی و اصلاح نباتات کلاسیک در پیش گیریم (۱۷).

اگرچه افزایش و یا کاهش تعداد رونوشت های یک ژن دلیل بر نقش کلیدی آن در واکنش های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نمی باشد، اما جستجو برای اینگونه ژنها تنها راهی است که می‌توان در جهت شناسایی و جداسازی ژنهای پاسخ دهنده به تنش‌ها بکار برد(۱۲). یکی از روشهای متداول در این رابطه روش نمایش افتراقی[1] می‌باشد که اولین بار توسط لیانگ و پاردی (۱۱) معرفی گردید. بر همین اساس از سال ۱۹۹۲ تاکنون که روش نمایش افتراقی معرفی گردیده است، ژن های زیادی توسط این روش از گیاهان مختلف جداسازی شده اند که می‌توان از این میان به جداسازی ژن های القاء شونده در اثر شوری از Mangrove (۲)، شناسایی ژن های مربوط به تنش سرما در یونجه و برنج (۱۰)، جداسازی ژن های القاء شونده در اثر ABA از گوجه فرنگی (۲۲)، جداسازی ژن های پاسخ دهنده به تنش اکسیداتیو از گیاه توتون (۲۱)، شناسایی ژن های تنظیم شونده توسط تنش خشکی در برنج (۱۹) و گندم دوروم (۱۶) ، جداسازی ژن های القاء شونده در اثر شوری از جو (۱۳، ۲۰) و برنج (۶)، و بالاخره جداسازی ژن های پاسخ دهنده به تنش شوری در مراحل اولیه تنش از گندم (۱۴) اشاره نمود.

این تحقیق، به منظور شناسایی، جداسازی و تجزیه و تحلیل ژن های مربوط به پاسخ شوری در تنش طولانی مدت در مرحله گیاهچه ای گندم طراحی گردید. بدین ترتیب ژن هایی که بیان آنها برای بازگشت متابولیسم سلولی به حالت عادی لازم می‌باشند از میان صدها ژن دیگر که بیان آنها در اثر مواجه شدن گیاه با شرایط تنش و شوک اولیه تغییر می نماید، شناسایی می‌گردند. با توجه به اینکه گندم ماهوتی از گندم های متحمل بومی ایران می باشد و در کارهای قبلی ما (۱) نیز تحمل بالایی نسبت به دیگر ارقام متحمل به شوری از خود نشان داده است، شناخت مکانیسم های تحمل در این رقم می‌تواند کمک شایانی در جهت دستکاری ژئتیکی و بکارگیری استراتژی های اصلاحی مناسب جهت ارتقاء تحمل گندم های زراعی موجود به تنش شوری با توجه به اقلیم کشور ایران باشد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان و تیمارهای شوری

دانه‌های گندم ماهوتی که از متحمل‌ترین گندمهای بومی ایران به شوری می باشد ابتدا در محلول ۲۰٪ وایتکس تجاری و ۰/۰۲ ٪ Tween 20 به مدت ۱۲ دقیقه ضدعفونی گردیدند. پس از شستشوی بذور در آب مقطر استریل، تعداد ۲۰ عدد بذر بر روی توری های استیل ضدزنگ که به صورت مربع به ابعاد ۶ سانتی متر بریده شده بودند و در درون محیط MS ½ به همراه ۰/۸ ٪ آگار قرار داده شده بودند، کشت شدند. ظروف پتری به مدت ۵ روز به اتاقک کشت با دمای ۲۵°C و فتوپریود ۱۶ ساعت در روز منتقل گردیدند. گیاهچه های سالم پس از مدت مذکور (۵ روز) به همراه توری هایشان به بطری های ۲ لیتری حاوی ۸۰ میلی لیتر محیط MS ½ بدون شکر انتقال یافتند و بر روی شیکر با سرعت ۶۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از ۲ روز، تیمارهای شوری ۰ (شاهد) ، ۵۰ ، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی مولار NaCl بر روی گیاهان اعمال گردید.

محیط های غذایی هر ۳ روز یکبار تعویض شده و گیاهان پس از ۱۱ روز تیمار شوری (۱۸ روزگی) برداشت شدند. ریشه و برگ گیاهان به طور جداگانه وزن گردیده، در ازت مایع قرار داده شدند و برای استفاده های بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.و در شرایط کاملا" استریل در شیشه های ۲ لیتری حاوی محیط غذایی 1/2MS کشت گردیدند. گیاهان پس از هفت روزگی به مدت ۱۱ روز در معرض

1. Differential display (DD)

Archive of SID

www.SID.ir

تنش های متفاوت نمک طعام با غلظت های ۰، ۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ میلی مولار قرار گرفتند.

جداسازی RNA

برای DD-PCR مقدار ۱۰۰ میلی گرم از برگ های گیاهان در ازت مایع به خوبی آسیاب گردید و RNA کل توسط کیت Plant RNeasy System شرکت کیاژن (Qiagen, SantraClarita, CA, USA) مطابق دستورالعمل موجود استخراج گردید. پس از استخراج، غلظت RNA موجود توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Smart Spec 3000 شرکت BioRad تحت طول موج ۲۶۰nm اشعه ماوراء بنفش اندازه گیری شد. برای لکه گذاری نورترن، RNA کلی توسط روش کلرید لیتیم- فنل که بوسیله پرسکات و مارتین (۱۵) معرفی شده بود، استخراج گردید.

نمایش افتراقی

نمایش افتراقی مطابق با روش لیانگ و پاردی (۱۱) که متعاقبا توسط بوئر و همکاران (۳) تغییر یافته است، انجام شد. برای رونویسی معکوس از ۰/۵ میکرو گرم RNA کلی به همراه و پرایمرهای آنکورد (T11GC, T11CG, T11AC, T11CA) استفاده گردید. ۲ میکرولیتر از محصول RT به همراه آغازگرهای آنکورد قبلی و ۱۵ آغازگر اختیاری در واکنش زنجیره ای پلیمراز بعدی استفاده شد که در آن از P^{33}-dATP جهت نشاندار کردن محصولات حاصله استفاده گردید. واکنش زنجیرهای پلیمراز به تعداد ۴۰ چرخه شامل دمای $94^{\circ}C$ برای ۳۰ ثانیه، $40^{\circ}C$ برای ۲ دقیقه و $72^{\circ}C$ برای ۳۰ ثانیه انجام شد و در آخر محصولات برای ۵ دقیقه در $72^{\circ}C$ باقی ماندند.

همسانه سازي و توالی یابی cDNA ها

قطعات cDNA با ابراز متفاوت از روی ژل توالی یابی جدا شده و به منظور همسانه سازی با استفاده از آغازگرهای مربوطه و در همان شرایط پیشین توسط PCR دوباره تکثیر گردیدند. سپس قطعات تکثیر یافته با استفاده از کیت همسانه سازی Topo TA Cloning System (Invitrogen, Sandiego, CA, USA) و مطابق دستورالعمل موجود در درون ناقل PCR2.1 Topo همسانه سازی گردیدند. قطعات همسانه سازی شده برای توالی یابی به آزمایشگاه توالی یابی در دانشگاه UBC کانادا فرستاده شدند و با استفاده از آغازگرهای استاندارد M13 Forward و یا M13 Reverse توسط دستگاه ABI 377 توالی‌یابی گردیدند.

لکه‌گذاری نورترن

RNA کلی به میزان ۲۰ میکرو گرم از ژل آگارز حاوی ۱/۲٪ فرمالدئید عبور داده شد. پس از الکتروفورز و عکسبرداری از ژل، RNA از ژل به غشاء نایلونی با بار مثبت منتقل گردید. غشاءهای لکه گذاری شده پیش از دورگ گیری به مدت ۱ ساعت در ۱۰ میلی لیتر از بافر FSB (شامل ۱۰۰ میلی مولار تتراسدیم پیروفسفات، ۵۰ میلی مولار سدیم فسفات و ۱ میلی مولار EDTA) حاوی ۷ ٪ SDS و ۱ میلی گرم DNA اسپرم ماهی واسرشته شده در دمای $65^{\circ}C$ قرارداده شدند. دورگ گیری در همان بافر قبل با اضافه کردن کاوشگر های cDNA نشاندار شده توسط P^{32}-dCTP که شدت پرتوتابی آنها بیش از 10^{8} cpm/µg بود، در تمام طول شب ادامه یافت. صبح روز بعد غشاءها سه مرتبه توسط 2X SSC حاوی ۰/۱٪ از SDS در دمای اتاق شسته شدند. سپس یک مرتبه به مدت ۴۵ دقیقه توسط 1X SSC حاوی ۰/۱٪ از SDS در دمای $65^{\circ}C$ و یک بار دیگر توسط 0.5X SSC حاوی ۰/۱٪ از SDS در همان دمای قبلی و همچنین در دمای $68^{\circ}C$ به مدت ۴۵ دقیقه شسته شدند. پس از شستشوها، غشاءها در داخل پوشش نایلونی قرار داده شدند و در تاریک خانه بر روی فیلم عکاسی (Kodak X-Omat Blue) قرار داده شدند

نتایج و بحث

چهار آغازگر لنگری برای انتهای ′۳ و همینطور ۱۵ آغازگر اختیاری (۶۰ ترکیب متفاوت از آغازگرها) برای بدست آوردن قطعات cDNA در نمایش متفاوت mRNA های برگ گندم مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به این تعداد ترکیب از آغازگرها و ایجاد ۸۰ تا ۱۵۰ نوار متفاوتی که در هر ژل توالی یابی قابل مشاهده بود، حدود ۶۰۰۰ قطعه متفاوت ازmRNA های بیان شده درون گیاه مورد غربال قرار گرفت. با توجه به تخمین ژن های بیان شونده در گیاهان عالی که ۱۵ تا ۳۰ هزار

Archive of SID

www.SID.ir

می‌باشد (۱۲)، می توان گفت که mRNAهای غربال شده یک سوم تا یک پنجم از کل mRNAهای موجود در گندم را پوشش می دهند. از میان قطعات غربال شده ۱۱ قطعه با تظاهر متفاوت از روی ژل توالی یابی جداسازی گردید که از میان آنها ۷ قطعه تنظیم یافته کاهشی[1] و۴ قطعه تنظیم یافته افزایشی[2] بودند. مثال هایی از این گونه قطعات در شکل ۱ نمایش داده شده است.

تعداد اندک قطعات متفاوت و یکسانی الگوی تظاهر mRNA در گیاهان تحت تنش و شاهد نشان از آن دارد که گندم ماهوتی پس از چند روز تنش شوری توانسته است به حالت اولیه خود برگشته و تنها با تغییر الگوی چندین ژن به زندگی عادی خود ادامه دهد. کاواساکی و همکاران (۱۰) نیز در بررسی گروهی بیان ژن ها در گیاهان برنج حساس و متحمل به شوری از طریق روش ریز آرایه[3] گزارش کرده اند که تفاوت در الگوی تظاهر ژن ها میان گیاهان در معرض شوری و شاهد در رقم متحمل با وجود تغییرات فراوان اولیه، پس از مدت کوتاهی کاهش می یابد.

پس از لکه گذاری نورترن و بررسی چگونگی تظاهر ژن های مربوط به قطعات با بیان افتراقی توسط کاوشگرهای مربوطه، مشخص شد که تعداد رونوشت های دو ژن توسط تنش شوری افزایش یافته‌اند (شکل ۲). این ژنها به ترتیب *wsr1* و*wsr2* نامیده شدند.*Wsr1* حاوی یک قطعه ۲۱۵ جفت نوکلئوتیدی است که در GenBank تحت شماره دسترسی CK136974 ثبت گردید. جستجو در بانک اطلاعاتی TIGR توسط این قطعه EST های مشابه را در گندم مشخص نمود که برخی از آنها تحت تنش خشکی و ABA جداسازی شده بودند.EST های ذکر شده به همراه *wsr1* برای بدست آوردن توالی بزرگتری از ژن مربوطه در گندم توسط نرم افزار Seqman با یکدیگر ادغام شده و در نهایت توالی ۱۰۱۴ جفت بازی *wsr1*contig را بوجود آوردند. لازم به ذکر است توالی *wsr1* برای جستجو در بانک اطلاعاتی پروتئین ها بسیار کوتاه بوده و اکثراً ناحیه ۳′-UTR را شامل می شود، لذا *wsr1*contig برای جستجو در بانک اطلاعات پروتئین ها توسط برنامه BLASTX مورد استفاده قرار گرفت. نتیجه جستجو نشان داد که فراوردهٔ ترجمه ESTمزبورشباهت بسیار زیادی به زیر واحد آهن- سولفور آنزیمی بنام سوکسینات دهیدروژناز از گیاه گندم دارد. این آنزیم نقش کلیدی در کمپلکس II نقل و انتقال الکترونی در میتوکندری دارد (۸). نشان داده شده است که تنها یک نسخه از این ژن در هسته وجود دارد که پروتئین ریبوزومی میتوکندریایی (rsp14) و سوکسینات دهیدروژناز را رمز می کند. روتوشت های های این دو ترکیب متفاوت از طریق پیرایش متناوب[4] بوجود آمده و پس از ترجمه آنها پروتئینشان به میتوکندری انتقال می یابد (۷).

پروتئین هایی که بیشترین شباهت را با ترجمه توالی مذکور نشان دادند به ترتیب زیر واحد آهن- سولفور آنزیم سوکسینات دهیدروژناز از گیاهان گندم (۲۸۱ آمینو اسید با ۹۳/۹٪ شباهت)، برنج (۲۸۱ آمینو اسید با ۸۶/۴٪ شباهت) و ذرت (۲۸۲ آمینو اسید با ۸۵/۱٪ شباهت) بودند. همانطور که در شکل ۳ دیده می شود توالی پروتئین های مربوط به زیر واحد آهن- سولفور این آنزیم به خوبی در طی تکامل حفظ شده است و در این گیاهان بسیار شبیه به هم می باشد.

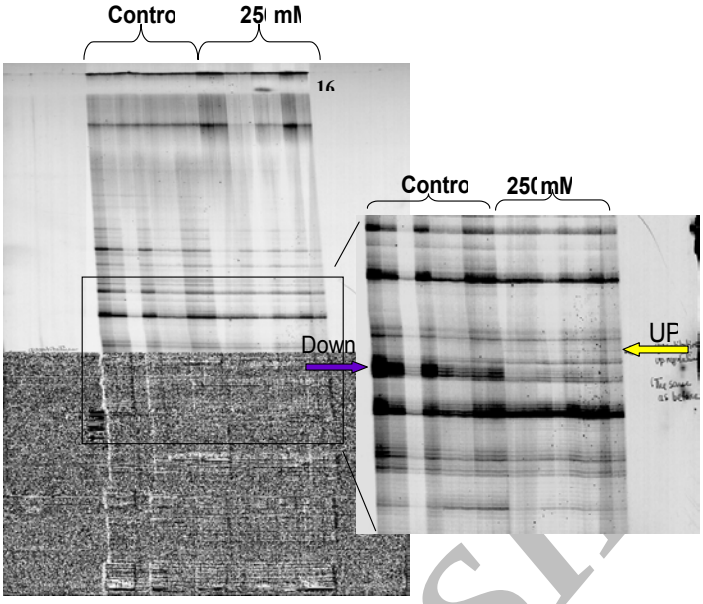
آزمایش نورترن بلات افزایش بیان این قطعه در اثر تنش شوری را تایید نمود(شکل ۲). گزارش شده است که آنزیم سوکسینات دهیدروژناز (کمپلکس II) توسط سمیت یون سدیم غیر فعال می شود در حالی که کمپلکسI توسط تنش اکسیداتیو حاصل از شوری مورد آسیب قرار می گیرد (۸).

همانطور که در شکل ۲- الف دیده می شود بیان این ژن تا شوری ۱۵۰ میلی مولار افزایش چندانی نیافته و در شوری ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی مولار افزایش می یابد. تحقیق قبلی ما (۱) نشان داد که محتوای یون سدیم در برگ گندم ماهوتی تا تیمار ۲۰۰ میلی مولار افزایش اندکی داشته و پس از آن افزایش چشمگیری می یابد. به نظر می رسد گندم ماهوتی با افزایش

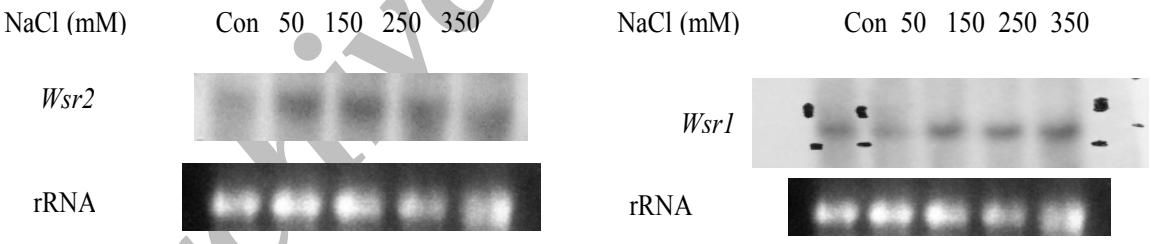
1. Down- regulated
2. Up-regulated
3. Microarray
4. Alternative splicing

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- ژل توالی یابی مربوط به جداسازی قطعات تکثیر یافته توسط RT-PCR با استفاده از آغازگرهای $T_{11}CA$ و پرایمر اختیاری 5′TTTTGGCTCC3′ که بخشی از آن در سمت راست بزرگنمایی شده است. مسیرهای ۱تا ۸ مربوط به گیاهان شاهد(۲ تکرار از استخراج RNA، ۲ تکرار نسخه برداری معکوس برای هر استخراج و ۲ واکنش PCR برای هر کدام) و مسیرهای ۹ تا ۱۶ مربوط به گندم های کشت شده در ۲۵۰ میلی مولار نمک می باشند. همانطور که در شکل دیده می شود نوارهایی که با فلشهای Down و Up در شکل مشخص شده اند مربوط به نوارهایی است که به ترتیب به طور کاهش یافته و افزایش یافته از روی ژل جداسازی گردیده اند.

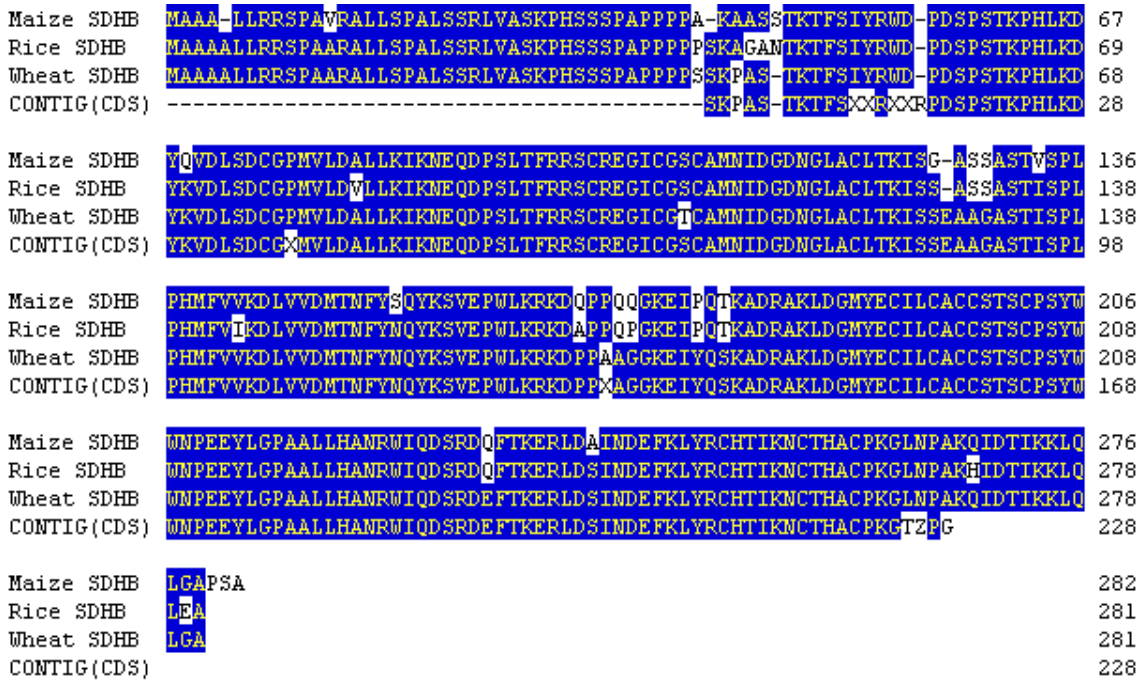


شکل ۲- تجزیه و تحلیل نورترن بلات مربوط به ژن *Wsr1* (الف) و ژن *wsr2* (ب). مسیرهای ۱ تا ۵ بر روی غشاء نیتروسلولز مربوط به RNA کلی استخراج شده از گیاهان کشت شده در شرایط کنترل (Con)، شوری ۵۰ ، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی مولار می باشند که با کاوشگرهای مربوط به قطعات به دست آمده از wsr1 (الف) و wsr2 (ب) دو رگ گردیده اند. به منظور امکان مقایسه میان ابراز ژنها در شرایط مختلف باند مربوط به RNA ریبوزومی (rRNA) نیز در ژل آگارز که در انتقال به غشاء استفاده شده است در زیر هر بلات نشان داده شده است.

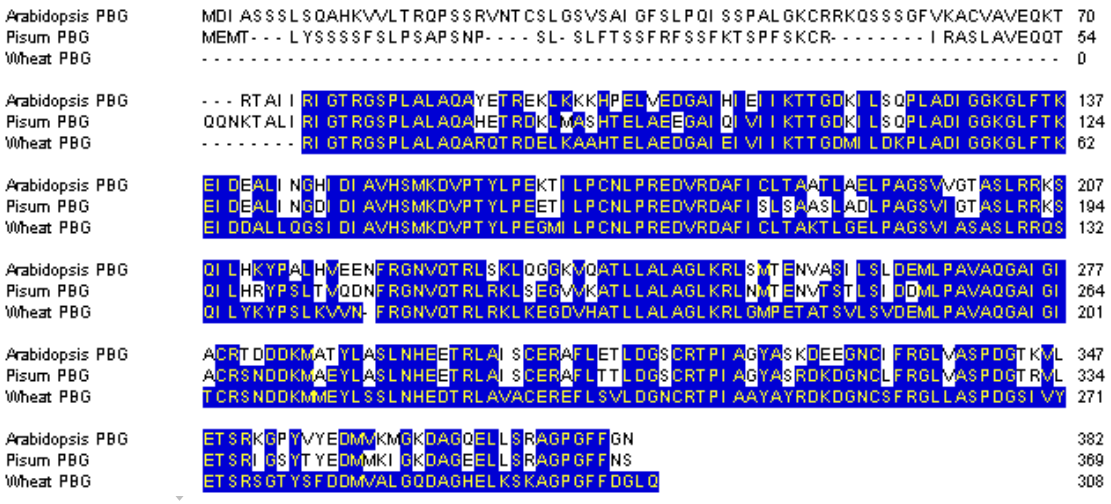
بیان این آنزیم مخصوصاً در شوری های شدید که یون سدیم زیادی وارد سلول می گردد از اثر سمیت یون سدیم برچرخه. تنفسی گیاه جلوگیری کرده و جهت تحمل در برابر شوری از آن بهره می برد.

wsr2 شامل یک قطعه ۲۵۹ نوکلئوتیدی و غنی از نوکلتوتید AT بوده و در نمایش متفاوت با آغازگر لنگری (TnAC) و آغازگر اختیاری (Arbiter4) بدست آمده است. این توالی در GenBank تحت شماره دسترسی CK136975 ثبت گردید. توالی *wsr2* به همراه ESTهای مشابه ای که در نتیجه جستجو در بانک اطلاعاتی TIGR از گندم پیدا شده بودند، برای بدست آوردن توالی بزرگتری از ژن مربوطه در گندم توسط نرم افزار Seqman با یکدیگر ادغام شـــده و در نهایـــت توالـــی

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- همردیفی توالی های پروتئینی مربوط به زیر واحد آهن – سولفور آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در ذرت، برنج، گندم و چارچوب قرائت آزاد در *wsr1*contig که با روش Clustal توسط نرم افزار MegAlign همردیف شده اند.



شکل ۴- مقایسه توالی های پروتئینی مربوط به آنزیم پروفوبیلینوژن دی آمیناز در آرابیدوپسیس، نخود وگندم با روش Clustal V توسط نرم افزار MegAlign. ناحیهٔ بلوک شده مناطق مشابه در پروتئین های دیگر با گندم را نشان می دهد

۱۴۷۳ جفت بازی *wsr2*contig را بوجود آوردند. از آنجا که توالی *wsr2* برای جستجو در بانک اطلاعاتی پروتئین ها بسیار کوتاه بوده و اکثراً ناحیه ۳´-UTR را شامل می شود، لذا *wsr2*contig برای جستجو در بانک اطلاعات پروتئین ها توسط برنامه BLASTX مورد استفاده قرار گرفت. نتیجه جستجو نشان داد که محصول ترجمه Contig مزبور شباهت بسیار زیادی به آنزیم پروفوبیلینوژن دی آمیناز از گیاه گندم دارد. این آنزیم نقش کلیدی در سنتز تتراپیرول‌ها دارد که پیش ماده برای ساخت کلروفیل‌ها در کلروپلاست و پورفیرین‌ها می‌باشند (۱۸). پروتئین‌هایی که بیشترین شباهت را با ترجمه توالی

www.SID.ir

مذکور نشان دادند به ترتیب آنزیم پروفوبیلینوژن دی آمیناز از گیاهان گندم (۳۰۸ آمینو اسید با ۹۹/۴٪ مشابهت)، نخود (۳۶۹ آمینواسید با ۶۸/۸٪ مشابهت) و آرابیدوپسیس (۳۸۲ آمینو اسید با ۶۵/۹٪ مشابهت) بودند (شکل۴). گزارش شده است که در گیاهچه های گندم و خیار که در معرض تنش گرمایی قرار گرفته اند فعالیت این آنزیم کاهش می یابد(۱۸). با وجود این در تنش شوری میزان نسخه های این ژن در گندم ماهوتی افزایش یافته است(شکل۳). به نظر می رسد که در تنش شوری بلند مدت گیاه متحمل برای جایگزین کردن کلروفیلهای از دست رفته اقدام به افزایش این آنزیم و سنتز بیشتر تتراپیرولها می‌نماید.

نتیجه‌گیری

اکثر مطالعات که اثر تنش های کوتاه مدت شوری را بر روی گیاهان مختلف بررسی نموده اند ژن های زیادی توسط تکنیک نمایش افتراقی جداسازی نموده اند که ابراز متفاوت داشته اند (به طور مثال می توان به مقالات ۵ و ۲۰ اشاره نمود). با این وجود داده های مربوط به مطالعات ملکولی در این مطالعه نشان داد که گیاه متحمل ماهوتی می تواند پس از گذراندن تغییرات شدید اولیه در الگوی بیان ژن ها به یک حالت تعادل برسد و با افزایش و یا کاهش بیان تعداد اندکی ژن شرایط شوری سخت را به نحو مطلوبی تحمل نماید. از آنجا که تعداد اندکی ژن در شرایط تنش شوری در گیاه متحمل ماهوتی افزایش یا کاهش داشتند، به نظر می رسد افزایش بیان ژن های مربوط به ساخت آنزیم های سوکسینات دهیدروژناز و پروفوبیلینوژن دی آمیناز از واکنش های کلیدی جهت تحمل به تنش شوری در گندم ماهوتی باشند.

منابع مورد استفاده

REFERENCES

۱. قوامی، ف.، م. ع. ملبوبی، م. ر. قنادها، ب. یزدی صمدی، ج. مظفری و م. جعفر آقایی. ۱۳۸۳. بررسی واکنش ارقام متحمل گندم ایرانی به تنش شوری در مرحلهٔ جوانه زنی و گیاهچه. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۳۵. شمارهٔ ۲. ۴۵۳-۴۶۴

1. Banzai,T. G., D. J. Hershkovits, N. Katcoff, Z. Hanagata, Dubinsky & I. Karube. 2002. Identification and characterization of mRNA transcripts differentially expressed in response to high salinity by means of differentially display in mangrove, Bruguiera gymnorrhiza. Plant Science, 162: 499-505.
2. Bartels, D. & D. Nelson. 1994. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. Plant Cell and Environment. 17: 639-667.
3. Bauer, D., H. Muller, J. Reich, H. Riedel, V. Ahrenkiewl, P. Warthoe & M. Strauss. 1993. Identification of differentially expressed mRNA specious by an improved display technique (DDRT-PCR). Nucl. Acids Res. 21:4272- 4280
4. Bohnert, H.J.,D. Nelson, & R.G. Jensen.1995.Adaptation to environmental stress. Plant Cell, 7: 1099-1111.
5. Cenci, A., R. D'ovidio, O.A. Tanzarella, C. Ceoloni and E. Porceddu. 1999. Identification of molecular markers linked to pm13, an *Aegilops longissima* gene conferring resistance to powdery mildew in wheat. Theor. Appl. Genet. 98: 448-454.
6. Cushman, J.C. & H.J. Bohnert. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. Current Opinion in Plant Biology. 3: 117-124.
7. Figueroa, P., I. Gomez , L. Holuigue, A. Araya & X. Jordana. 1999. Transfer of rsp14 from the mitochondrion to the nucleus in maize implied integration within a gene encoding the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase and expression by alternative splicing. Plant Journal, 18:601-609.
8. Hamilton, E.W. & S. A. Heckathorn . 2001. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins ,where as complex II is protected by proline and betaine. Plant Physiology, 126: 1266-1274.
9. Ivasuta, S., R. Imai,K. Uchiyama & M. Gau. 1999. The coupling of differential display and QAFLP approaches for nonradioactive mRNA fingerprinting. Molecular Biotechnology. 12:137-141
10. Kawasaki, S., C. Bohnert, M. Deyholos, H. Wang, S. Brazille, K. Kawai, D. Galbraith & H. Bohnert. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice.The Plant Cell. 13: 889-905.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Liang, P. & A.B. Pardee. 1992. Differential display of karyotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 257:967-971.
12. Lievens, S., S., Goormachtig & M. Holsters. 2001. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. Nucleic Acids Research.29: 3459-3468.
13. Moramoto, Y.,T. Nakamura,A. Alvarez-Nakase, T. Takabe & G.Garab 1998.Isolation of salt-induced cDNA clones in barely leaves using differential display.Proceeding of the XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungary, Volume IV: 3043-3046.
14. Nemoto,Y., N. Kavakami, & T. Sasakuma. 1999. Isolation of novel early salt-responding genes from wheat (*Triticum aestivum*) by differential display.Theor. Appl. Gene. 98:673-678.
15. Prescott, A. & C. Martin. 1987. A rapid method for the quantitative assessment of levels of specific mRNAs in plants. Plant Mol. Bio. Rep. 4: 219-224.
16. Rampino, P., M. Malatrasi, M. Gulli, N. Marmiroli, & C. Perrotta. 2003. Drought stress-related sequences in durum wheat. Tenth International Wheat Genetics Symposium. Volume1:380-383.
17. Razavi, K., S. Mohsen-zadeh & M.A. Malboobi. 2001.Molecular aspects of osmotic stresses. International Symposium on prospect of saline agriculture in the GCC countries. 18-20th of March, Dubai.
18. Tewari, A. K. & B.C. Tripathy.1998. Temprature stress induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat.Plant physiol. 117:851-858.
19. Tyagi, A., N. Klueva, H. Zheng & H.T. Nguyen. 2002. Isolation of novel transcription factor from rice by differential display of mRNA. Current Science. 83: 1568-1573.
20. Ueda, A., W. Shi, T. Nakamura & T. Takabe. 2002. Analysis of salt-inducible genes in barley roots by differential display. Journal of Plant Research. 115: 119-130.
21. Vranova, E., S. Atichartpongkul, R. Villarroel, M. Van Montagu, D. Inze, & W. Van Camp. 2002. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. 16: 10870-10875.
22. Wei, J.Z., A. Tirajoh, J.Effendy & A.L. Plant. 2000. Characterization of salt-induced changes in gene expression in tomato (*Lycopersicon esculantum*) roots and the role played by abscisic acid. Plant Science, 159: 135-148.
23. Winicov, I. 1998.New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants.Annals of Botany, 82:703-710.

Archive of SID

www.SID.ir