ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۱۴۰- ۱۲۹

تجزیه و تحلیل منابع EST در گندم، برنج، پنبه و فستوکا تحت تنش خشکی به منظور بررسی بیان ژن و ژنومیکس عملکردی

پیوند حیدری*[۱]، بهرام ملکی زنجانی[۲]، شادی حیدری[۳]

۱ و ۲- فارغ التحصیل کارشناس ارشد، استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، ایران
۳- فارغ التحصیل کارشناس ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: peyvand_heidary@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۷- تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹)

چکیده

تنش خشکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود. این تحقیق به منظور شناسایی ژن‌های دخیل در به کمک تجزیه و تحلیل اطلاعات EST کتابخانه گیاهان گندم، برنج، پنبه و فستوکا انجام شد. اطلاعات اولیه چهار کتابخانه از بانک اطلاعاتی دانشگاه هاروارد جمع‌آوری شدند. در بررسی شباهت بین کتابخانه‌ها، همه توالی‌های EST با استفاده از نرم افزار EGassembler هم‌گذاری شدند. سپس همه کانتیگ‌ها به‌وسیله جستجوگر بلاست X توسط نرم افزار CLC Protein Workbench در مقابل پروتئین‌های غیرتکراری بانک ژن با E-value≤۱×۱۰$^{-۵}$ تجزیه شدند. در شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها، نرم افزارIDEG6 مورد استفاده قرار گرفت. ژن‌های لیپید ترنسفراز، گلوتاتیون اس ترنسفراز، دهیدرین، متالوتیونئین، فسفاتازها، پروتئین‌های فراوان در اواخر جنین زائی از جمله ژن‌های مهم دخیل در پاسخ به تنش خشکی در چهار کتابخانه برنج، گندم، پنبه و فستوکا محسوب می‌شوند. چهار کتابخانه در گروه‌های کارکردی فتوسنتز، مسیر اکسایشی پنتوز فسفات، انتقال الکترون، دیواره سلولی، متابولیسم اسید آمینه، هورمون-ها، اکسایش-کاهش، گروه کارکردی متفرقه، متابولیسم کربوهیدرات، تنش، متابولیسم نوکلئوتید، متابولیسم ثانویه، پروتئین و علامت دهی اختلافات معنی‌دار داشتند که نشان دهنده این است که این چهار گیاه با بکار گیری گروه‌های کارکردی متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

گروه‌های کارکردی، ژنومیکس کارکردی، تنش خشکی، بیان ژن، EST.

مقدمه

صفات چند ژنی همچون مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، به سختی قابل اصلاح هستند به خصوص زمانی که در ترکیب با هم باشند (Neerincx and Leunissen 2005). ژنومیکس علم مطالعه ژنوم است. در مطالعات ژنومیکس تعداد بسیار زیادی ژن به‌طور همزمان با استفاده از ابزارهای خودکار مطالعه می‌شوند. ژنومیکس شامل تجزیه و تحلیل داده‌ها و اطلاعات ژنتیکی، بخصوص ژنوم موجودات است (Naghavi et al. 1388).

Archive of SID

از کاربردهای اصلی ژنومیکس می‌توان به تشخیص ژن‌هایی که نقش کلیدی را در فرایندهای بیولوژیک ایفا می‌کنند و همچنین روشن کردن نقش بیولوژیک تعداد زیادی از ژن‌هایی که عملکرد آن‌ها یا به‌طور ضعیفی شناخته شده و یا هنوز کاملاً ناشناخته‌اند، اشاره نمود (Lein et al. 2008). ژنومیکس، اصلاح گیاهان را به شکل چشم‌گیری تغییر داده است و ما را قادر به دستیابی به فهم ژنتیکی وسیع، همراه با جزئیات عملکرد کلی گیاه می‌سازد (Neerincx and Leunissen 2005). مطالعات ژنومی و مولکولی به همراه تجزیه و تحلیل منابع EST نشان داده که ژن‌های زیادی با عملکردهای متفاوت بوسیله تنش خشکی القاء می‌شوند (Shinozaki and Yamaguchi 2008). تعداد زیادی منابع EST برای گندم و جو ایجاد شده که تجزیه و تحلیل آن‌ها موجب شناسایی ژن‌های دخیل در فرآینده پاسخ به تنش خشکی شده است (varshney et al. 2008). تجزیه فرآیندهای پیچیده‌ای که مکانیسم‌های مقاومت را رقم می‌زنند، در بازدهی گیاهان زراعی نقش دارند (Neerincx and Leunissen 2005). دستاوردهای مبتنی بر ژنومیکس دسترسی به آلل‌های مطلوبی که در مکان‌های ژنی صفات کمی[1] حضور دارند و سبب پاسخ به تنش خشکی می‌شوند را فراهم می‌کند (Tuberosa and Salvi 2006). این تجزیه‌ها می‌توانند با نرم افزارهای مخصوص روی مقادیر بسیار زیادی از داده‌های EST تولید و ذخیره شده در بانک‌های اطلاعاتی و پروژه‌های شاخص ژن[2] مانند وب سایت دانشگاه هاروارد[3] صورت گیرند (Neerincx and Leunissen 2005). از نرم افزارهایی که در تجزیه ESTها بکار می‌رود می‌توان به EGassembler[4]، CLC protein workbench، mapman[5]، IDEG6[6] اشاره نمود. EGassembler به منظور پالایش توالی‌های EST یک مرحله پیش پردازش انجام می‌دهد که این مرحله شامل پاکسازی توالی‌ها، پوشاندن تکرارها، پوشاندن ناقل‌ها، پوشاندن توالی‌های اندامکی وسپس همگذاری[7] توالی‌ها می‌باشد. در طی مرحله همگذاری، توالی‌های EST درون کانتیگ‌ها (شامل دو یا تعداد بیشتری EST) و سینگلتون‌ها (شامل تنها یک EST) قرار می‌گیرند(Masoudi-Nejad et al. 2006). در نرم افزار CLC protein workbench جستجوی بلاست X در مقابل پروتئین‌های غیر تکراری[8] انجام می‌شود. این نرم افزار برای حل مسائل علمی و تحقیقات آزمایشگاهی بر اساس اصول بیوشیمیایی بکار می‌رود. تجزیه‌ها با$E\text{-value} \leq 1\times10^{-5}$ (که ارزش مورد انتظار یا احتمال همردیفی‌های مختلف با امتیاز هم‌ارز نامیده می‌شود) انجام می‌شود که انتظار می‌رود در جستجوی پایگاه‌های اطلاعاتی به صورت شانسی رخ داده باشد. با مقدار E کمتر، احتمال معنی‌دار بودن امتیاز بالاتر می‌رود (McGinnis and Madden 2004). در بلاستx توالی DNA تقاضا ابتدا در شش چهارچوب خواندن ترجمه و سپس با یک توالی پروتئینی موجود در پایگاه های اطلاعاتی مقایسه می‌شود(Skuse and Du 2008). برای شناسایی ژنها با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها از خروجی نرم افزار CLCbio به عنوان ورودی نرم افزار IDEG6 [9] استفاده می‌شود. استفاده از آزمون کای دو جنرال برای کشف ژن‌هایی با بیان متفاوت برای تشخیص مجموعه‌ای از ژن‌های مشخص در دو یا چندین شرایط متفاوت برای مدیریت و سازماندهی مقدار زیادی اطلاعات ضروری است (Romualdi et al. 2003). گروه‌های کارکردی کاربردهای متفاوتی دارد که عبارتند از: تفسیر دستی ژنوم، تفسیر کارکردی خودکار ژن‌های پیش‌بینی شده، تجزیه داده‌های مطالعات ژنومیکس بزرگ مقیاس و پروتئومیکس (Ruepp et al. 2004). برای تعیین گروه‌های کارکردی پایگاه‌های اطلاعاتی متنوعی وجود دارد، سایت موسسه ماکس پلانک (mapman) به صورت آنلاین، یکی از این پایگاه‌ها می‌باشد. برای آزمون تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کارکردی، خروجی نرم افزار mapman به‌عنوان ورودی نرم افزار IDEG6 استفاده می‌شود (Man et al. 2004). تنش‌های محیطی از قبیل تنش خشکی یکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی در بسیاری از نقاط دنیا به ویژه مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران محسوب

[1] Quantitative trait loci (QTLs)
[2] The gene index project
[3] Http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi
[4] Http://egassembler.hgc.jp/
[5] Http://mapman.mpimp-golm.mpg.de
[6] Http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/
[7] Assembly
[8] Non redundant (Nr)
[9] Http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/

Archive of SID
www.SID.ir

می‌شود. برنج[1] و گندم[2] مهم‌ترین غلاتی هستند که بطور وسیع درسیستم‌های متنوع اکولوژیکی کاشته می‌شود و تنش خشکی یکی از بزرگ‌ترین علت ناپایداری عملکرد این دو گیاه در مناطق مختلف کشت این دو محصول می‌باشد (Mostajeran and Rahimi-Eichi 2009). ژنومیکس عملکردی شناسایی مبانی ژنتیکی و مولکولی فرایندهای بیولوژیک در گیاهان را فراهم آورده است (Gorantla et al. 2005). موفقیت در شناسایی ژن‌های دخیل در تنش خشکی موجب کمک به اصلاح ژنتیکی برای افزایش توانمندی گیاه در تولید محصول می‌باشد. تاکید اصلی روی شناسایی ژن‌های جدید پاسخ به تنش خشکی درگونه‌های مختلف و نقش آن‌ها در سازگاری است که به اصلاح تحمل به خشکی محصولات حساس کمک خواهد کرد و عملکرد قابل قبول را در چالش با خشکی حفظ می‌کند (Reddyet al. 2008). پنبه[3] یکی از گیاهان زراعی مقاوم به خشکی است و بازده اقتصادی آن بخاطر هزینه بالای مرتبط با رشد پنبه بسیار مهم می‌باشد. بنابراین هر چند که پنبه گیاهی مقاوم به خشکی است برای تولید بالای محصول به آب کافی نیاز دارد، بنابراین تشخیص ژن‌های دخیل در مکانیسم مقابله با تنش خشکی از اهمیت زیادی برخوردار است (Pospisilova et al. 2000). گیاهان گونه فستوکا[4] فستوکا[4] یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای فصل سرما و گراس‌های چمنی مناطق معتدل هستند. علوفه‌های فصل سرما یا گونه‌های گراس‌های چمنی اغلب از خشکی زیان می‌بینند (Sheffer et al. 2001). در آزمایشی حدود ۲۵۰۰ EST از کتابخانه تحت تنش نخود فرنگی توالی‌یابی شد و تجزیه مقایسه‌ای از ژن‌های با بیان متفاوت انجام شد، نتایج بدست آمده در فهم اساس مولکولی ژن‌های متحمل به خشکی در نخود فرنگی مفید بود (Gao et al. 2008). درآزمایش دیگری برای توصیف ژن‌های شرکت کننده درپاسخ به تنش‌های غیر زیستی در نوعی لوبیا EST۱۰۵۰ جداسازی و توالی‌یابی شد و نتایج نشان داد که ۵۳۱ توالی منحصربه فرد بودند و ۳۰ درصد از آن‌ها هیچ شباهتی با پروتئین‌های شناخته شده موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی نداشتند که به عنوان ژن جدید معرفی شدند (Reddy et al. 2008) با وجود این‌که تشخیص و ارزیابی ژرم پلاسم‌های مقاوم به خشکی فرایند بسیار سخت و زمان‌گیر است روش EST یکی از موثرترین روش‌ها برای کشف ژن‌های کارکردی جدید از تمام ژنوم است (Chen et al. 2005). یکی از مؤثرترین راه‌های کاهش خسارت خشکی و اصلاح گیاهان در کشور می‌باشد. امروزه با بکارگیری روش‌های تجزیه و تحلیل EST انجام برنامه‌های تحقیقاتی گسترده با هدف اصلاح گیاهان مقاوم به تنش خشکی در گیاهان مهم زراعی مانند گندم و برنج با سرعت و دقت بیشتری امکان‌پذیر می‌باشد (Bausher et al. 2003). با تکمیل پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم در تعدادی از گیاهان، ESTهای فراوانی برای مطالعه سایر گیاهان فراهم شده است. چنانچه یک EST با یک ژن مشخص همانندی قابل قبولی داشته باشد عملکرد بالقوه مشابهی برای آن EST در نظر گرفته می‌شود. تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر ESTها با مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، موجب افزایش آگاهی مسیرهای بیوشیمیایی ژن‌های کنترل کننده مقاومت می‌شود. با گسترش اطلاعات ESTها در بانک‌های اطلاعاتی، امکان شناسایی و جداسازی ژن‌های کاندیدای مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی میسر می‌شود (Hide et al. 1999). در این پژوهش به منظور شناسایی و مقایسه دقیق ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی در چهار گیاه گندم، برنج، پنبه و فستوکا تجزیه ESTهای موجود در کتابخانه تحت تنش این چهار گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

اطلاعات اولیه چهار کتابخانه پنبه تحت تنش با ۱۰۷۲ EST، فستوکا تحت تنش با ۴۹۷۲ EST، کتابخانه برنج تحت تنش با ۵۵۰۴ EST و گندم تحت تنش با ۱۰۲۶ EST تجزیه و تحلیل شد. اطلاعات از بانک اطلاعاتی دانشگاه هاروارد[5] جمع‌آوری شدند و توالی‌های EST در فرمت FASTA بود.

بیان ژن

[1] *Oryza sativa*
[2] *Triticum aestivum*
[3] *Gossypium hirsutum*
[4] *Festuca spp*
[5] Http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi

Archive of SID
www.SID.ir

در مطالعه شباهت بین دو کتابخانه، همه توالی‌های EST با استفاده از نرم افزار EGassembler هم‌گذاری شدند. سپس همه کانتیگ‌ها به وسیله جستجوگر بلاست X توسط نرم افزار CLC protein workbench در مقابل پروتئین‌های غیر تکراری بانک ژن تجزیه و تحلیل شدند. برای شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها، نرم افزار IDEG6[1] مورد استفاده قرار گرفت. الگوریتم این نرم‌افزار با آزمون کای دو جنرال برای شناسایی ژن‌ها با بیان متفاوت به ما کمک می‌کند (Romualdi et al. 2003).

تجزیه کارکردی

در تعیین همردیفی و ادغام توالی‌های رونوشت ژن (EST)، نرم افزار EGassembler مورد استفاده قرار گرفت. این روش برای هم‌گذاری توالی‌های EST با ضریب درصد همپوشانی[2] N≥95 و حذف دیگر گزینه‌ها از قبیل فرایندهای پوشاندن اندامک‌ها و روشن سازی توالی، پوشاندن تکرارها و پوشاندن ناقل‌ها استفاده شد. نرم افزار EGassembler یکسری EST را در فرمت FASTA می‌پذیرد. توالی‌های مربوط به فایل‌های کانتیگ و سینگلتون از هر کتابخانه به وسیله نرم افزار CLC protein workbench و برنامه BLASTX (Evalue≤۱×۱۰$^{-۵}$) در برابر پایگاه اطلاعاتی آرابیدوپسیس که از منبع اطلاعاتی آرابیدوپسیس TAIR[3] دانلود شد مورد تجزیه قرار گرفت. برای طبقه بندی گروه‌های کارکردی، ابزار طبقه بندی کارکردی و مقایسه‌ای mapman[4] موسسه ماکس پلانک[5] به صورت آنلاین استفاده شد. خروجی‌های mapman برای توصیف کاتالوگ‌های متفاوت در بین کتابخانه‌ها که می‌تواند گروه‌های کارکردی را در آزمایشات نمونه‌ای چندگانه کشف کند مورد استفاده قرار گرفت. در اینجا از تست کای‌دو جنرال برای تشخیص گروه‌های کارکردی متفاوت استفاده شد. سپس برای یافتن گروه‌های کارکردی متفاوت بین دو کتابخانه از نرم افزار IDEG6 استفاده گردید.

نتایج و بحث

به منظور بررسی دقیق پروفایل بیان ژن و گروههای کارکردی، ابتدا مقایسه بصورت دو به دو بین کتابخانه گندم و برنج، پنبه و فستوکا انجام شد. سپس پروفایل بیان ژن هر چهارگیاه به صورت توام بررسی شد. در دستیابی به گروه‌های کارکردی و نقش سلولی ESTها از دو کتابخانه تحت تنش خشکی گندم و برنج بعد از هم‌گذاری ۵۵۰۴ EST، در کل ۷۴۰ کانتیگ و ۲۲۸۸ سینگلتن در کتابخانه تحت تنش برنج با استفاده از نرم افزار EGassembler تشکیل شد و در کتابخانه تحت تنش گندم تعداد ۷۵ کانتیگ و ۸۱۵ سینگلتن بعد از هم‌گذاری ۱۰۲۶ EST تشکیل شد. نتایج تجزیه در جدول یک آمده است.

جدول۱- تعداد ESTهای موجود در هر کتابخانه و تعداد کانتیگ و سینگلتن‌های هر کتابخانه بر اساس خروجی نرم افزار EGassembler

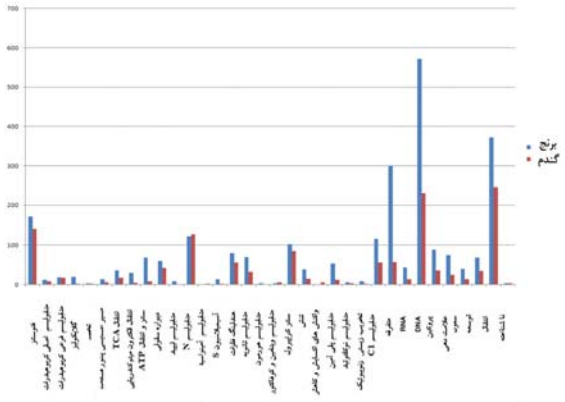
کتابخانه گندم تحت تنش خشکی	کتابخانه برنج تحت تنش خشکی	کتابخانه
۱۰۲۶	۵۵۰۴	تعداد کل EST ها
۷۵	۷۴۰	تعداد کانتیگ ها
۲۱۱	۳۲۱۶	تعداد EST درکانتیگ
۸۱۵	۲۲۸۸	تعداد سینگلتن
۲۵	۱۹۷	کانتیگ‌هایی که hit مشخصی ندارند
۳۱۵	۱۱۹۶	سینگلتن‌هایی که hit مشخصی ندارند

با استفاده از نرم افزار CLCBio، بلاست موضعی (بلاست در برابر بانک اطلاعاتی آرابیدوپسیس) کانتیگ‌ها و سینگلتن‌ها انجام شد و تبدیل رمزهای ژنتیکی کانتیگ‌ها و سینگلتن‌های دو کتابخانه به رمزهای ژنتیکی گیاه آرابیدوپسیس صورت گرفت. از آن‌جا که گروه‌های کارکردی گیاه آرابیدوپسیس به طور کامل شناخته شده است تبدیل این رمزها به رمزهای ژنتیکی گیاه آرابیدوپسیس به منظور تعیین گروه‌های کارکردی کتابخانه‌های گندم و برنج تحت تنش خشکی انجام شد. گروه‌های کارکردی هر دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman به ۳۴ دسته طبقه بندی شد. مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه در شکل یک نمایش داده شده است. در تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های کارکردی دو کتابخانه گندم و برنج تحت تنش خشکی از نرم افزار IDEG6 استفاده گردید. بیان ۷ گروه کارکردی (جدول۲) بین این دو کتابخانه اختلاف معنی‌داری داشتند که بیانگر این حقیقت است که گیاه گندم و

[1] Http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/
[2] Overlap percent identity cutoff N≥95
[3] Ftp://ftp.arabidopsis.org
[4] Http://mapman.mpimp-golm.mpg.de
[5] MapMan Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology

Archive of SID
www.SID.ir

برنج تحت تنش خشکی با بکارگیری گروه‌های کارکردی متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند.



شکل۱- مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman

جدول۲- نتایج نرم افزار IDEG6 و تعیین گروه‌های کارکردی متفاوت بین دو کتابخانه را نشان می‌دهد

گروه های کارکردی متفاوت در دو کتابخانه برنج و گندم	کتابخانه برنج	کتابخانه گندم	کای اسکوئر
PS	173	142	0.000004*
Cell wall	69	8	0.000016*
Amino acid metabolism	122	127	0*
Polyamine metabolism	0	6	0.000526*
RNA	299	57	0*
not assigned	372	245	0.000249*
stress	103	85	0.000395*

مقایسه توزیع گروه‌های کارکردی میان ESTها نشان داد که درگروه کارکردی PS یا فتوسنتز بین دو کتابخانه گندم و برنج تحت تنش خشکی، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. این امر تفاوت در کارایی سیستم فتوسنتزی دو گیاه در مقابله با تنش خشکی را نشان می‌دهد. رونوشت‌های مربوط به گروه‌های کارکردی دیواره سلولی و استرس در دو کتابخانه تفاوت معنی‌داری را نشان داد. تعداد زیادی از پروتئین‌های سنتز دیواره سلولی هستند که جز پروتئین‌های دخیل در شرایط استرس هم محسوب می‌شدند این امر به این حقیقت بر می‌گردد که دیواره سلولی گیاهان به عنوان سپر دفاعی است که نقش مهمی را در مکانیسم تحمل به تنش خشکی ایفا می‌کند. با توجه به جدول بالا، ژنهای دسته‌بندی شده در فرایند رونویسی[1] در دو کتابخانه تفاوت معنی‌داری داشتند که نشان‌دهنده تفاوت در شدت بیان این ژن‌ها در دو کتابخانه تحت تنش خشکی است. رونوشت‌های مربوط به گروه‌های کارکردی بیوسنتز پلی‌آمین‌ها در دو کتابخانه گندم و برنج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. رابطه بین بیوسنتز پلی‌آمین‌ها و تحمل خشکی اولین بار در گیاه جو نشان داده شد (Richards and Coleman 1952). در آزمایشی نشان داده شده که با دست‌کاری ژنتیکی در بیوسنتز پلی آمین‌ها در گیاهان می‌توان ژرم پلاسم مقاوم به خشکی ایجاد کرد(Capell et al. 2004). بیان ژن‌های رمز کننده پلی‌آمین‌ها در گیاه گندم تحت تنش خشکی بیشتر بود که نشان دهنده این است که گندم در بکارگیری سنتز پلی‌آمین‌ها در مکانیسم تحمل به خشکی نسبت به برنج کارآمدتر می‌باشد. ژن‌های دخیل در متابولیسم اسیدهای آمینه نیز در دو کتابخانه بیان متفاوتی داشتند. از این نتایج ما به شناسایی بخشی از گروه‌های کارکردی دخیل درمکانیسم تحمل به خشکی که نقش مهمی در فهم فرآیند تحمل به خشکی در دو گیاه گندم و برنج ایفا می‌کنند دست یافتیم. دسته‌بندی، هم‌گذاری و جستجوی بلاست توالی‌های EST به منظور بررسی بیان ژن‌های دو گیاه برنج و گندم تحت تنش خشکی نشان داد که در کتابخانه برنج تحت تنش خشکی، ۱۹۲۹ EST (۳۵/۰۴ درصد) و در کتابخانه گندم تحت تنش ۳۷۶ EST (۳۶/۶۴ درصد) سهم خیلی ضعیفی ($\leq 10^{-5}$نمره بلاست) در همولوژی با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها داشتند و یا هیچ توالی مشابهی با آن‌ها وجود نداشت و کاندیدای خوبی هستند که به عنوان ژن‌های جدید مد نظر قرار گیرند، در حالی‌که ۳۵۷۵ EST در کتابخانه برنج تحت تنش و ۶۵۰ EST در کتابخانه گندم، همولوژی بالا یا متوسطی را نشان دادند ($<10^{-5}$ نمره بلاست). بر پایه این نتایج توالی‌هایی که درنشان دادن همولوژی معنی‌دار برای هر پروتئین در پایگاه داده‌های عمومی شکست خوردند کاندیدای مناسبی برای ژن‌های جدید هستند. به‌عنوان مثال کانتیگ ۴۴ در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی می‌تواند به‌عنوان کاندیدای ژنی که هنوز شناخته نشده است جداسازی و توالی‌یابی شود و به‌عنوان یک ژن جدید در پاسخ به تنش خشکی معرفی گردد و در برنامه‌های انتقال ژن و اصلاح گونه‌های دیگر بکار گرفته شود. در این تحقیق به کمک نرم‌افزار IDEG6 نشان داده شد که از بین ۳۰۶ ژن که بیان متفاوتی در دو کتابخانه برنج و گندم نشان دادند ۱۳ ژن از نظر

[1] Transcription

Archive of SID
www.SID.ir

آماری تفاوت معنی‌داری داشتند، این ۱۳ ژن در جدول ۳ مشخص شده است.

جدول۳- ژن‌های با بیان متفاوت برحسب تعداد EST های هر کانتیگ در دو کتابخانه گندم و برنج تحت تنش خشکی را نشان می دهد.

ژن ها	تعداد EST در کتابخانه برنج	تعداد EST در کتابخانه گندم
lipid transfer protein precursor	۰	٦
lipid transfer protein 7a2b	۰	٤
dehydrin	۰	۳
ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform	۰	۷
Oxygen-evolving enhancer protein 2	۰	۵
ribulose-bisphosphate carboxylase activase	۰	۶
metallothionein	۰	۳
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	۰	۶
stress responsive protein kinases	۰	۶
Contig 44	۰	۱۰
putative acid phosphatase	۲	۷
ADP-ribosylation factor 1	۱	۳
glutathione s-transferase	۲	۶

تلاش شد که ژن‌هایی که در تحمل به تنش خشکی نقش دارند را در دو گیاه برنج و گندم شناسایی کنیم و بیان آن‌ها را در دو کتابخانه مورد مقایسه قرار دهیم. محصولات ژن‌های القا شده تحت تنش به طور وسیعی در دو گروه طبقه بندی می‌شوند. محصولات ژن‌های گروه اول به طور مستقیم سلول را در برابر تنش حمایت می‌کند مانند چاپرون‌ها[1]، پروتئین‌های LEA[2]، پروتئین‌های حفاظت کننده در برابر تنش‌های اسمزی[3]، آنزیم‌های دخیل در دفع مواد سمی از گیاه[4]، حذف کننده‌های رادیکال‌های آزاد[5] و پروتئازهای مختلف (Iuchi et al. 2007)، گروه دوم شامل فاکتورهای رونویسی، پیغام‌برهای ثانویه و فسفاتازها و کینازها مانند کینازهای فعال‌کننده تقسیم سلول[6] و پروتئین‌های وابسته به کلسیم[7] و کینازهای وابسته به رشد و تمایز سلول[8] که بیان ژن‌های دیگر در پاسخ به تنش خشکی را تنظیم می‌کنند (Kovtun et al. 2000). فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و آنتی‌اکسیدان در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی افزایش معنی‌داری را نشان داد. از دسته اول می‌توان به گلوتاتیون‌اس ترانسفرازها اشاره نمود. گلوتاتیون‌اس ترانسفرازها جز گروه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هستند، این دسته از آنزیم‌ها سلول‌ها را در برابر اکسیژن‌های فعال حفاظت می‌کنند. در گیاه فرفیون[9] رونویسی و فعالیت این آنزیم به طور گسترده‌ای در بافت‌هایی که تحت تنش‌های محیطی هستند افزایش می‌یابد (Anderson and Davis 2003). گلوتاتیون اس‌ترانسفراز نقش مهمی را در حذف کردن اکسیژن‌های واکنش پذیر(ROS)[10] سلول بازی می‌کند. ظرفیت سیستم حذف کردن گلوتاتیون اس‌ترانسفرازها، بستگی به شدت بیان این ژن در گیاهان مختلف دارد (Tausz, 2003). بالابردن سطوح بیان ژن گلوتاتیون‌اس‌ترانسفراز به نظر می‌رسد که توسط گیاهان مقاوم به تنش خشکی کنترل می‌شود (Chugh and Khurana 2002). سطوح رونوشت‌های گلوتاتیون اس–ترنسفراز در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی افزایش داشت. از نتایج این مطالعه و نتایج مشابه سایر محققین می‌توان استنباط نمود که در گندم تحت تنش خشکی، گلوتاتیون اس– ترانسفراز در محدود کردن آسیب‌های اکسیداتیو و دیگر پاسخ‌ها به تنش‌ها مشارکت می‌کند. این پروتئین‌ها با متابولیسم گیاهی و دفاع در برابر تنش با انواع اکسیژن واکنش‌پذیر مرتبط هستند. در حقیقت ایزوفرم‌های گلوتاتیون اس–ترانسفراز گروه بزرگ و متنوعی از آنزیم های اکسیداتیو، با چندین فعالیت متنوع و الگوهای توالی متفاوت هستند. گیاهان مکانیسم‌های دفاعی موثر متنوعی در برابر صدمات اکسیداتیو استرس‌ها دارند، یکی از آن‌ها گلوتاتیون s–ترنسفراز (GSTs) است که انجام دهنده طیفی از نقش‌های عملکردی با استفاده از تری پپتید گلوتاتیون (GSH) به‌عنوان کوآنزیم است (Lederer and Boger 2005). از ژن دیگری که در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی بیان افزایشی داشت می‌توان به متالوتیونئین اشاره نمود. نقش اصلی این ژن این است که به‌عنوان دفع کننده مسمومیت ناشی از فلزات سنگین عمل می‌کند و در تنظیم متابولیسم فلزات ضروری نقش دارد. اما اخیراً مشخص شده است که متالوتیونئین‌ها به‌عنوان حذف کننده‌های رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و نقش مهمی در تحمل به خشکی ایفا می‌کند (Sato and Bremner 1993). دسته دوم یعنی ژن‌هایی که بیان ژن‌های دیگر

[1] Chaperons
[2] Late embryogenesis abundant proteins
[3] Osmoprotectant
[4] Detoxifying enzymes
[5] Free radical scavengers
[6] Mitogen-activated kinases (MAPKS)
[7] Calcium dependent protein kinases (CDPKs)
[8] SoS kinases

[9] *Euphorbia esula*
[10] Reactive oxygen species

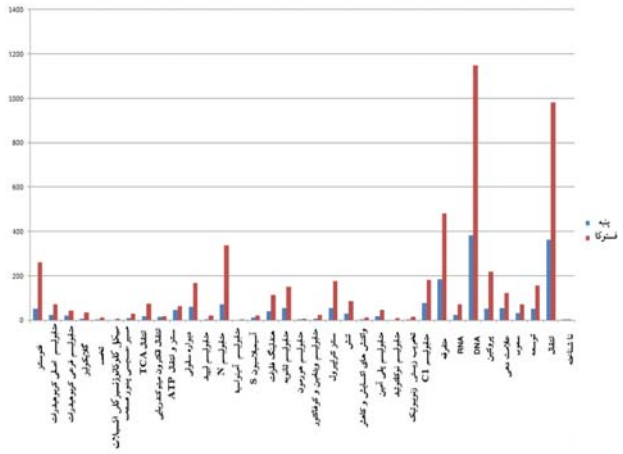
Archive of SID
www.SID.ir

در پاسخ به تنش خشکی را تنظیم می‌کنند کینازهای پاسخ به تنش هستند که در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی بیان افزایشی داشتند، این دسته از ژن‌ها نقش کلیدی را در هماهنگی بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی گوناگون دارند (Dunand-Sauthier et al. 2005). در آزمایشی نشان داده شد که بخشی از پاسخ سلولی به تنش‌ها به وسیله نقشی که کینازهای پاسخ به استرس به عنوان پیام رسان[1] ایفا می‌کنند، اتفاق می‌افتد (Tibbles and Woodgett 1999). لیپید ترانسفرازها در انتقال چربی ازمیان زمینه خارج سلولی به منظور تشکیل موم کوتیکولی نقش دارند. اهمیت تشکیل موم کوتیکولی به تحمل تنش خشکی در گیاه مربوط می‌شود (Kimberly et al. 2006). این پروتئین‌ها به‌طور غیر مستقیمی در دفاع گیاه و ممانعت از کاهش آب در برابر تنش‌های محیطی نقش دارند (Chugh and Khurana 2002). یکی از پاسخ‌های بیولوژیکی گیاه به تنش خشکی، تجمع پروتئین‌های دهیدرین می‌باشد. این پروتئین‌ها غشاها و ماکرومولکول‌ها را ازتغییر ماهیت حفاظت می‌کنند (Lopez et al. 2003). این ژن یکی از گزینه‌های مناسب به منظور استفاده در برنامه‌های اصلاح گیاهان از جمله برنج برای افزایش مقاومت به تنش خشکی می‌باشد. برای دستیابی به گروه‌های کارکردی و نقش سلولی ESTها از دو کتابخانه تحت تنش خشکی پنبه و فستوکا بعد از هم‌گذاری ۱۰۷۲ EST، در کل ۱۰۵ کانتیگ و ۶۹۵ سینگلتن در کتابخانه تحت تنش پنبه با استفاده از نرم افزار EGassembler تشکیل شد و در کتابخانه تحت تنش فستوکا تعداد ۵۳۹ کانتیگ و ۳۲۵۹ سینگلتن بعد از هم‌گذاری ۴۹۷۲ EST تشکیل شد. نتایج این تجزیه در جدول ۴ آمده است. گروه‌های کارکردی هر دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman طبقه‌بندی شد. مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه در شکل دو نمایش داده شده است. بیان ۷ گروه کارکردی(جدول ۵) بین این دو کتابخانه اختلاف معنی‌داری داشت که بیانگر این حقیقت است که گیاه پنبه و فستوکا تحت تنش خشکی با بکارگیری گروه‌های کارکردی متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند.

[1] Signalling

جدول۴- تعداد ESTهای موجود در هر کتابخانه و تعداد کانتیگ و سینگلتن‌های هر کتابخانه بر اساس خروجی نرم افزار EGassembler

کتابخانه فستوکا تحت تنش	کتابخانه پنبه تحت تنش	کتابخانه
۴۹۷۲	۱۰۷۲	تعداد کل ESTها
۵۳۹	۱۰۵	تعداد کانتیگ‌ها
۱۷۱۳	۳۷۷	تعداد EST درکانتیگ
۳۲۵۹	۶۹۵	تعداد سینگلتن
۱۱۰	۱۲	کانتیگ‌هایی که hit مشخصی ندارند
۱۲۵۹	۳۶۳	سینگلتن‌هایی که hit مشخصی ندارند



شکل۲- مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman

جدول۵- نتایج نرم افزار IDEG6 و تعیین گروه‌های کارکردی متفاوت بین دو کتابخانه را نشان می‌دهد.

گروه های کارکردی متفاوت در دو کتابخانه پنبه و فستوکا	کتابخانه پنبه	کتابخانه فستوکا	کای اسکوئر
PS	53	261	0.000021*
Mitochondrial electron transport / ATP synthesis	16	19	0.001183*
Cell wall	46	63	0.000014*
Amino acid metabolism	73	338	0.000014*
redox.regulation	30	86	0.000047*
Misc	78	182	0.000432*
Signaling	53	218	0.001168*

توالی‌های مربوط به کتابخانه پنبه تحت تنش خشکی در ۳۱ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند و توالی‌های مربوط به کتابخانه فستوکا تحت تنش خشکی در ۳۴ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند. کتابخانه‌های پنبه و فستوکا در سه گروه کارکردی فتوسنتز، دیواره سلولی، متابولیسم اسید آمینه با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. این نشان دهنده اهمیت این سه گروه کارکردی در مکانیسم مقابله با تنش خشکی ما بین گیاهان مختلف می‌باشد. از دیگر گروه‌های کارکردی که بین دو گیاه پنبه و فستوکای تحت

Archive of SID
www.SID.ir

تنش اختلاف داشتند، گروه کارکردی سیگنالینگ و گروه کارکردی انتقال الکترون میتوکندریایی و متفرقه و تنظیم واکنش‌های اکسایش–کاهش هستند. در گروه کارکردی انتقال الکترون میتوکندریایی اختلاف معنی‌داری بین کتابخانه‌های پنبه و فستوکای تحت تنش خشکی وجود دارد. گروه کارکردی زنجیره انتقال الکترون مجموعه‌ای است از پروتئین‌های پیچیده که انرژی ذخیره شده‌ی ناقلین الکترونی حاصل از واکنش‌های اکسیداسیون و احیای سلول را برای تشکیل ATP و سایر مولکول‌های پرانرژی مصرف می‌کنند و عملکرد مهمی در تولید انرژی برای سلولهای تحت تنش بازی می‌کنند که نشان دهنده نیاز سلول های گیاه تحت تنش خشکی به انرژی بیشتر به منظور مقابله با تنش خشکی می‌باشد (Wagner and Krab 2006). ژن‌های دخیل در فرایند انتقال پیام کلسیم[1] نیز در دو کتابخانه تفاوت معنی‌داری داشتند. یون Ca^{+} به طور گسترده‌ای در گیاهان و حیوانات بکار گرفته می‌شود. نه تنها در تولید ولتاژ غشایی بلکه به‌عنوان یک مکانیسم پیام دهی عمل می‌کند، کلسیم یک ملکول کوچک[2] است که اثر تنظیمی روی خیلی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها دارد. از ژن‌هایی که در فرایند پیام‌دهی کلسیم در کتابخانه فستوکا نقش دارند می‌توان به کلمودولین[3] و کلسینورین[4] اشاره نمود. کلمودولین جز پروتئین‌های باند شونده با کلسیم است و می‌تواند با پروتئین‌های دیگر باند شود و عملکرد آن‌ها را تنظیم کند و به این وسیله روی خیلی از عملکردهای سلول نقش داشته باشد. کلسینورین‌ها جز پروتئین فسفاتازها هستند و به‌طور گسترده‌ای در پاسخ به استرس‌های محیطی بیان می‌شوند (Kudla et al. 1999). تنش‌های محیطی معمولاً وقتی در گیاهان اعمال می‌شوند منجر به افزایش موقتی و زودگذر در کلسیم آزاد سیتوپلاسمی می‌شود. این پیام‌های کلسیم سلولی (ca2+) در نهایت منجر به افزایش پاسخ‌های ژنی در گونه‌های گیاهی نسبت به تنش‌ها می‌شود که این ژن‌ها پروتئین‌هایی را رمز می‌کنند که وظیفه حفاظتی را به عهده دارند (Zhu, 2002). خانواده‌های بزرگی از آنزیم‌ها که نمی‌توانند به هر مسیری نسبت داده شوند (گروه کارکردی متفرقه یا misc) نامیده می‌شوند. در کتابخانه پنبه و فستوکا چندین زیر گروه این گروه کارکردی با همدیگر متفاوت بودند (Lederer and Boger 2005). تنظیم واکنش‌های اکسایش–کاهش در کتابخانه پنبه و فستوکای تحت تنش خشکی متفاوت بود. اکسیژن برای گیاهان مثل سایر موجودات هوازی، همانند یک تیغ دو لبه است. اگرچه برای رشد و نمو عادی ضروری است ولی تماس مداوم با آن منتج به صدمه دیدن سلولها و در نهایت مرگ آنها میگردد. در کتابخانه فستوکای تحت تنش خشکی بیان بالایی از توالی‌های شرکت کننده در این زیر گروه کارکردی مشاهده شد (Mittler et al. 2004). درESTهای کتابخانه پنبه تحت تنش خشکی، ۱۲۲ EST (۳۳/۲۴ درصد) و در کتابخانه فستوکا ۱۹۱۴ EST (۳۴/۷۷ درصد) سهم خیلی ضعیفی (نمره بلاست $\leq 10^{-5}$) در همولوژی با توالی‌های موجود در پایگاه داده غیر تکراری Nr داشتند و یا هیچ توالی مشابهی با آن‌ها وجود نداشت، بنابراین به‌عنوان ژن‌های جدید مدنظر قرار گرفتند و ۲۴۵ EST باقیمانده در پنبه و ۳۵۹۰ EST باقیمانده در فستوکا همولوژی بالا یا متوسطی را نشان دادند (نمره بلاست$\leq 10^{-5}$). بر پایه نتایج ما، توالی‌هایی که درنشان دادن همولوژی معنی‌دار برای هر پروتئین در پایگاه داده‌های عمومی شکست خوردند کاندیدای مناسبی برای ژن‌های جدید هستند و در برنامه‌های انتقال ژن و اصلاح گونه‌های دیگر بکار گرفته می‌شوند. در این تحقیق مابه کمک نرم‌افزار IDEG6 و آزمون کای دو جنرال نشان دادیم که از بین ۲۵۶ ژن که بیان متفاوتی در دو کتابخانه پنبه و فستوکا نشان دادند ۱۴ ژن از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشتند، این ۱۴ ژن در جدول ۶ مشخص شده است. لیپید ترانسفراز، گلوتاتیون اس ترانسفراز، دهیدرین، متالوتیونئین از جمله ژن‌هایی هستند که در کتابخانه‌های فستوکا و پنبه تحت تنش خشکی مانند کتابخانه‌های برنج و گندم اختلاف داشتند. ازنتایج این مطالعه و نتایج مشابه سایر محققین می‌توان استباط نمود که احتمالاً این ژن‌ها با توجه به نقش بسیار مهمی که پیشتر در مورد آن‌ها توضیح داده شد در مقابله با تنش خشکی در گونه‌های مختلف گیاهی اهمیت حیاتی دارند.

[1] Calcium signaling
[2] Allosteric
[3] Calmodulin
[4] Calcineurin

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۶- ژن‌های با بیان متفاوت برحسب تعداد ESTهای هر کانتیگ در دو کتابخانه پنبه و فستوکا تحت تنش خشکی را نشان می‌دهد.

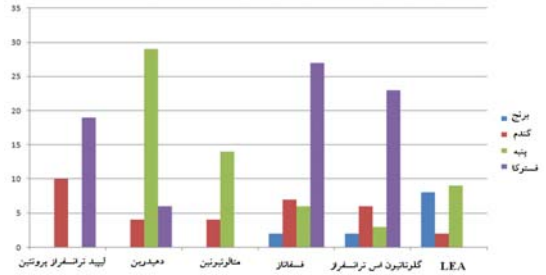
ژن ها	تعداد EST در کتابخانه پنبه	تعداد EST در کتابخانه فستوکا
lipid transfer protein	۰	۱۹
glutathione s-transferase	۳	۲۳
dehydrin	۲۹	۶
metallothionein	۱۳	۰
Ubiquitin	۲۲	۵
Glutathione peroxidase	۵	۲۱
Amine oxidase	۰	۱۸
Peroxidases	۶	۳۷
Heat shock protein	۱۸	۴
Phosphatases	۶	۲۷
Alcohol dehydrogenase	۰	۱۴
pyruvate decarboxylase	۴	۲۴
LEA	۹	۰
chaperonins	۶	۲۷

یوبی کوئیتین‌ها[1]،که در کتابخانه پنبه افزایش بیان داشتند، پروتئین‌های کوچکی هستند که در انواع سلولهای وکاریوتی وجود دارد. حضور وسیع این پروتئین در جایگاه‌های مختلف و ثابت ماندن ساختار مولکولی آن در گونه‌های مختلف، حاکی از نقش مهم یوبی کوئیتین در حیات سلولی می‌باشد. اتصال کولان یوبی کوئیتین به پروتئین‌ها یکی از مهم‌ترین راه‌های هدایت بسیاری از بیومولکول‌های پروتئینی به سمت تجزیه پروتئوزومی[2] بشمار می‌رود (Kimura and Tanaka 2010). ما پیشنهاد می‌کنیم که ژن‌های دخیل در فرایند اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی نقش بسیار مهمی در مقابله با تنش خشکی بازی می‌کند. افزایش بیان ژن‌های دخیل در استرس‌های اکسیداتیو درکتابخانه فستوکای تحت تنش خشکی دیده شد. از این ژن‌ها می‌توان به پراکسیدازها[3]، آمین اکسیدازها[4]، گلوتاتیون پراکسیدازها[5] اشاره نمود. این ژن‌ها احتمالاً به دنبال وقوع تنش خشکی در این کتابخانه تولید می‌شوند (Kerr et al. 1972)، از طرفی بیان ژن‌های پاسخ به استرس نیز در این کتابخانه افزایش داشت که این می‌تواند به این علت باشد که پراکسیدهای تولید شده باید از سلول‌ها دفع شوند تا از صدمات ناشی از تنش جلوگیری کنند. از ژن‌هایی که در پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو در دو کتابخانه بیان شده و اختلاف بیان داشتند می‌توان به ژن‌های شوک حرارتی[6] اشاره نمود. پروتئین‌های شوک حرارتی به مجموع پروتئین‌هایی گفته می‌شوند که در شرایط استرسی در سلول بیان می‌گردند نقش این سلول ها جلوگیری از تغییر کونفورماسیون پروتئین‌ها تحت عوامل استرسی می‌باشند. پروتئین‌های HSP بواسطه چندین نوع از عوامل استرس زا همچون استرس‌های اکسیداتیو، فلزات سنگین و استرس‌های محیطی مانند استرس خشکی القاء می‌گردند (Loones and Morange 1998). بنابراین شاید بتوان اینگونه استدلال نمود که پروتئین‌های HSP با تنظیم پروتئین‌های دخیل در مقابله با تنش خشکی نقش کلیدی را در مقابله با تنش بازی می‌کند. خیلی از چاپرون‌ها پروتئین‌های شوک‌های حرارتی هستند که پروتئین‌های بیان شده در پاسخ به تنش خشکی و یا دیگر استرس های سلولی هستند. علت این رفتار این است که چین خوردگی پروتئین به شدت تحت تاثیر تنش قرار می‌گیرد، از این‌رو بعضی از چاپرون‌ها برای تعمیر صدمات ایجاد شده عمل می‌کنند. تجمع ماکرومولکول‌ها می‌تواند در عملکرد چاپرون‌ها مهم باشد. بیان بالای این ژن‌ها در کتابخانه فستوکای تحت تنش دیده شد(Ellis and van 1991). فرایند تخمیر الکل به همراه تنفس سلولی در طی تنش خشکی اتفاق می‌افتد که در آن انرژی مشتق شده از اکسیداسیون ترکیبات آلی از قبیل کربوهیدرات‌ها استفاده در سایر واکنش‌های مهم سلولی در فرایندهای دخیل در نقل و انتقالات درون سلولی و به طور کلی در تمام واکنش‌های سلولی دخیل در مقابله با تنش خشکی صرف می‌شود. گروه های کارکردی تخمیر و ژنهای شرکت کننده در این گروه‌ها در کتابخانه فستوکای تحت تنش خشکی افزایش بیان داشتند(Persson et al. 2008). پروتئین LEA[7] در کتابخانه پنبه تحت تنش خشکی افزایش بیان داشت. این پروتئین نقش ویژه‌ای را در حفاظت سیتوپلاسم در برابر از دست دادن آب و حفاظت گیاهان بوسیله کاهش سمیت ایجاد شده بوسیله غلظت بالای یون‌ها دارد(Chugh and Khurana 2002). پروتئین‌های LEA، پروتئین‌هایی هستند که از دیگر پروتئین‌ها در برابر استرس‌های خشکی و اسموتیک حمایت می‌کنند. مطالعات بیوانفورماتیکی اخیر پیشنهاد می‌کند که این پروتئین‌ها، رفتاری مانند چاپرون‌های[8] مولکولی دارند و به

[1] Ubiquitin
[2] Proteasomes
[3] Peroxidases
[4] Amine oxidase
[5] Glutathione peroxidase
[6] Heat shock protein
[7] Late embryogenesis abundant
[8] Chaperonins

Archive of SID
www.SID.ir

وسیله استرس‌های خشکی و اسموتیک القا می‌شوند و ساختارهای مولکولی و سلولی را از اثرات صدمات کاهش آب حفاظت می‌کنند (Shiota et al. 1998). آنزیم‌های فسفاتاز به‌طور وسیعی در گیاهان یافت می‌شوند. به عبارت دیگر فسفاتازها دفسفریلاسیون فسفات آلی و تبدیل آن به فسفات معدنی را بر عهده دارند (Barret-Lennard et al. 2008). نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش آنزیم‌های فسفاتاز به ویژه در کتابخانه فستوکای تحت تنش خشکی گردیده و با افزایش سطح تنش، بیان این آنزیم‌ها افزایش یافت. عوامل محیطی مانند تنش خشکی می‌توانند سبب افزایش فعالیت درون سلولی و برون سلولی این آنزیم شود. اهمیت این آنزیم در تولید و انتقال فسفر می‌باشد (Julie et al. 2000). بعد از مقایسه دو به دوی کتابخانه‌ها و پیدا کردن اهمیت آن‌ها در این گیاهان مقایسه آماری بین نتایج بدست آمده از این تفاوت‌ها در چهار گیاه انجام شد و بررسی ژن‌های مهم دخیل در تنش خشکی در چهار کتابخانه تحت تنش خشکی نشان داد که لیپید ترانسفراز، گلوتاتیون اس ترانسفراز، دهیدرین، متالوتیونئین، فسفاتازها، LEA که پیشتر اهمیت آن‌ها در مقاومت به تنش خشکی بیان شد، از جمله ژن‌های مهم دخیل در تنش خشکی در چهار کتابخانه برنج، گندم، پنبه و فستوکا تحت تنش بودند. بررسی توزیع این ژن‌ها در چهار کتابخانه تحت تنش خشکی در شکل ۳ آورده شده است. بررسی توزیع ژن‌های دخیل در تنش خشکی در چهار گیاه نشان داد که اکثر ژن‌های مهم دخیل در تنش خشکی، به ترتیب در گیاه فستوکا، پنبه، گندم و به‌مقدار کمتری در گیاه برنج تحت تنش خشکی افزایش بیان داشتند که نشان دهنده کارآمدتر بودن گیاه فستوکا و سپس پنبه در مقاومت به تنش خشکی می‌باشد.



شکل۳- بررسی توزیع ژن‌های دخیل در تنش خشکی در چهار کتابخانه تحت تنش خشکی

پیشنهادات

با توجه به اهداف پژوهش در تعیین ژن‌های دارای بیان افتراقی و شناسایی ژن‌های کلیدی در فرایند مقاومت به تنش خشکی بوده، موارد زیر در ادامه این تحقیق پیشنهاد می شود:

۱- جدا سازی و بررسی مولکولی ژن‌های دارای بیان افتراقی

۲- شناسایی ارتباطات بین عوامل تاثیر گذار در فرآیند مقاومت به تنش خشکی

۳- با توجه به تعیین ژن‌های کلیدی دخیل در فرایند مقاومت به تنش خشکی در گیاهان مختلف در این پژوهش می‌توان به دست ورزی این ژن‌ها به منظور افزایش مقاومت گیاهان مهم زراعی به تنش خشکی اقدام نمود.

سپاسگزاری

از دانشگاه زنجان بخاطر پشتیبانی مالی از پژوهش انجام شده و همچنین از اساتید محترم جناب آقایان دکتر بهرام ملکی و مرحوم دکتر علی حق نظری به‌خاطر پشتیبانی علمی دراجرای این پروژه تحقیقاتی کمال تشکر را داریم و نیز از همکاری‌های صمیمانه و پشتیبانی معاونت علمی و پژوهشی دانشگاه زنجان قدردانی می‌نماییم.

منابع

Anderson J, Davis D (2003) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione *S*-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in (*Euphorbia esula*). Plant Biology. 32:430-441.

Barret-Lennard EG, Robson AD, Greenway H (2008) Effect of phosphorous deficiency and water defiction phosphatase activities from wheat leaves. J Exp Bot 33:682-695.

Bausher M, Shatters R, Chaparro J, Niedz R (2003) An expressed sequence tag (EST) set from Citrus sinensis L. Osbeck whole seedling and implications of further perennial source investigations. Plant Science 165:415-422.

Capell T, Bassie L, Christou P (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Plant Biology. 26:9909-9914.

Chen L, Zhao LP, Gao QK (2005) Generation and analysis of expressed sequence tags from the tender shoots cDNA library of tea plant (*Camellia sinensis*). Plant Science. 168:359-363.

Chugh A, Khurana P (2002) Gene expression during drought stress recent advances. Current Sience 83:6-25.

Archive of SID
www.SID.ir

Dunand-Sauthier I, Walker C, Humphrey T (2005) Stress-Activated Protein Kinase Pathway Functions To Support Protein Synthesis and Translational Adaptation in Response to Environmental stress in Fission Yeast. Eukaryotic Cell 11:1785-1793.

Ellis RJ, van SM (1991) Molecular chaperones embryogenic gene. Plant Physiology 94:690-695.

Gao WR, Wang XS, Liu QY, Peng H, Chen Ch, Li JG, Zhang J, Hu SN, Ma H (2008) Comparative analysis of ESTs in response to drought stress in chickpea (*C. arietinum* L.). Biochemical and Biophysical Research Communication 376:578-583.

Gorantla M, Babu PR, Lachagari VB, Feltus FA, Paterson AH, Reddy, AR (2005) Functional genomics of drought stress response in rice: Transcript mapping of annotated unigenes of an indica rice (*oryza sativa* L.cv. Nagina 22). Current Science. 89:496-513.

Hide W, Miller R, Ptitsyn A, Kelso J, Gopallakrishnan C, Christoffels A (1999) EST Clustering Tutorial. ISMB. p. 24.

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M (2007) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. Plant Journal 27:325-33.

Julie EH, Simpson R J, Richardson AE (2000) The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose-1-phosphate or inorganic phosphate.Plant and Soil 220:165-174.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26 (4):239–57.

Kimberly D, Cameron A, Smart L (2006) Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. Plant Physiology140:176-183.

Kimura Y, Tanaka K (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. Journal of Biochem 147:793-8.

Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proc Natl Acad Sci USA 97:2940-45.

Kudla J, Xu Q, Harter K (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in arabidopsis are differentially regulated by stress signals. Plant Biology 96:4718-4723.

Lederer B, Boger P (2005) A Ligand Function of Glutathione S-Transferase. Plant Physiology. 171:63-87.

Lein W, Usadel B, Stitt M, Reindl A, Ehrhardt T, Sonnewald U, Bornke F (2008) Large-scale phenotyping of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*)to identify essential leaf functions.Plant Biotechnology Journal 6:246-263.

Loones MT, Morange M (1998) Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo Cell 3:237-44.

Lopez C, Banowetz G M , Kronstad W (2003) dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. Crop Science 43:577-582.

Man MZ, Wang X, Wang Y (2002) Power_SAGE: comparing statistical tests for SAGE exprements. Bioinformatics 16:953-959.

Masoudi-Nejad A, Tonomura K, Kawashima Sh, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo T, Goto S (2006) EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. Nucleic Acids Research 34:459-462.

McGinnis S, Madden TL (2004) BLAST: at the core ofa powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res 32:20-25.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Elsevier 9:490-498.

Mostajeran A, Rahimi-Eichi V (2009) Effects of Drought Stress on Growth and Yield of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivarsand Accumulation of Proline and Soluble Sugars in Sheathand Blades of Their Different Ages Leaves. American-Eurasian 5(2):264-272.

Naghavi MR, malbobi M A, rashidi S (1388) bioinformatics.tehran university press,Tehran. Iran (In Farsi).

Neerincx P, Leunissen, J (2005) Evolution of web service in bioinformatics. Briefings in Bioinformatics. 6:178-188.

Persson B, Hedlund J, Jornvall H (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the MDR superfamily. Cell Mol Life Sci 65(24):3879-94.

Pospisilova J, Synkova H, Rulcova J (2000) Cytokinins and water stress. Biologia Plantarum. 43(3):321-328.

Reddy P, Sairanganayakulu G, Thippeswamy M, Reddy S, Reddy MK , Sudhakar Ch (2008) Identification of stress-induced genes from the drought tolerant semi-arid legume crop horsegram (*Macrotyloma uniflorum* Verdc.) through analysis of subtracted expressed sequence tags. Plant Science 175:372-384.

Richards FJ, Coleman RG (1952) the polyamine biosynthetic pathway.Nature 170:460-463.

Romualdi C, Bortolzuzzi S, Dalessi G, Danieli GA (2003) IDEG6: a web tool for etection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. Physiology Genomics 12:159-162.

Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Ulrich Guldener U, Mannhaupt G, Meunsterko M, Mewes HW (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. Nucleic Acids Research 32:5539-5545.

Sato m, Bremner L (1993) Oxygen free radicals and m et allothionein. Biology and Medicine14:325-327.

Sheffer KM, dunn JH, minner DD (2001) summer drought response and rooting depth of tree cool season turfgrasses.HortSci 22:296-297.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2008) Gene expression and signal transduction in water stress response. Plant Physiol 115:327-334.

Shiota H, Satoh R, Watabe K, Harade H, Kamada H (1998) *C-ABI3*, the carrot homologue of the *Arabidopsis ABI3*, is expressed during both zygotic and somatic

Archive of SID
www.SID.ir

Tuberosa R, Salvi S (2006) Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. Plant Science 11:406-412.
Varshney RK, Langridge P, Graner A (2007) Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley.Science direct 58:121-55.
Wagner A, Krab K (2006) The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation. Physiologia Plantarum 95:318-325.
Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. Ann Rev Plant Biol 53:247-273.

embryogenesis and function in the regulation of embryo - specific ABA-Inducible genes.plant cell physiology 39:1184-1193.
Skuse G, Du Ch (2008) Bioinformatics Tools for Plant Genomics. International Journal of Plant Genomics 28:1-2.
Tausz M (2003) The Role of Glutathione in Plant Response and Adaptation to Natural Stress . Plant Ecophysiology 45:102-122.
Tibbles LA, Woodgett J R (1999) The stress-activated protein kinase pathways. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences 55:1230-1254.

Archive of SID

www.SID.ir