

بررسی هم‌تنظیمی و هم‌بیانی تعدادی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری در گندم نان (*Triticum aestivum* L.)

فریبا ابونی مهریزی^۱، علیرضا عباسی^۲، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری^۳، بهمن یزدی صمدی^۴
و هوشنگ علیزاده^{۵*}

۱، ۲، ۳، ۴، ۵، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، استادان و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۶ - تاریخ تصویب: ۹۱/۵/۳)

چکیده

تنش‌های غیرزنده از مهمترین عوامل محدودکننده رشد و عملکرد گیاهان زراعی محسوب شده و همه ساله خسارات قابل توجهی به بار می‌آورند. در بین این تنش‌ها، تنش اسمزی اهمیت قابل توجهی داشته و در مراحل ابتدایی تنش شوری، نیز بروز می‌کند. در مسیر بررسی نحوه پاسخ گیاه به تنش‌ها، روش‌های مختلف آزمایشگاهی و محاسباتی به کار گرفته می‌شوند تا با شناخت بهتری از مکانیسم‌های دخیل در این شرایط، بتوان به درک بهتری از مکانیسم مولکولی پاسخ به تنش دست یافته و همچنین از این شناخت در جهت بهبود تحمل گیاه به شرایط تنش استفاده کرد. یکی از روش‌های محاسباتی، تجزیه و بررسی ناحیه بالادست ژن‌هاست که در بردارنده توالی‌های تنظیمی مختلف می‌باشند. در این بررسی پس از انتخاب ۸ ژن *TSA*، *GCS*، *SOD*، *Tpis*، *AtpE*، *FBA*، *ps16* و *I4-3-3p* که در تنش شوری اثر دارند، بررسی توالی بالادست آنها در برنج انجام شد و به موازات این بررسی، الگوی بیان ارتولوگ این ژن‌ها با روش RT-PCR نیمه کمی، تحت تنش شوری در گندم نان (رقم روشن و فلات) انجام شد. میزان انطباق این دو روش، در ارائه الگوی بیان ژن و همچنین قابلیت هم‌بیانی و هم‌تنظیمی این ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عناصر تنظیمی ژن‌ها و همچنین برنامه‌های تجزیه توالی‌های تنظیمی می‌توانند رابطه نسبی قابل انتظاری بین نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی و تجزیه توالی تنظیمی نشان دهند و ژن‌های موردنظر این تحقیق با الگوی هم‌تنظیم متمایز در دو گروه مجزا قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: هم‌تنظیمی، تنش شوری، RT-PCR نیمه کمی، گندم نان.

مقدمه

تنش‌های غیرزنده یکی از عوامل محدودکننده رشد و عملکرد گیاهان به شمار می‌روند (Qiang et al., 2000; Mahajan et al., 2005). از مهمترین تنش‌های غیرزنده تنش‌های خشکی، شوری و سرما هستند (Chinnusamy et al., 2005; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki,

2006). در اغلب موارد گیاه با بیش از یکی از تنش‌ها مواجه می‌شود (Mittler, 2006) و بین مسیرهای پاسخ‌دهنده به تنش‌های غیرزنده تداخل^۱ وجود دارد (Chinnusamy et al., 2005; Mittler, 2006). به طور

1. Cross talk

ممکن می‌کند (Dieterich et al., 2005). بنابراین برنامه‌های مختلفی برای بررسی توالی‌های راه‌انداز^۵ طراحی شده‌اند تا امکان پیش‌بینی پاسخ ژن را فراهم سازند (Lescot et al., 2002). لازم به توضیح است که استفاده از این عناصر بهتر است با آزمایش عملی توأم شده و ماهیت آنها به اثبات رسد. به عنوان مثال در پاسخ به انواع تنش‌های خشکی، شوری و سرما، دو مسیر عمده وابسته به آبسزیک اسید (ABA) و مستقل از آن وجود دارد. در پاسخ وابسته به ABA، ژن‌ها عموماً دارای موتیف متناظر آن یعنی ABRE^۶ هستند. بنابراین ژنی که دارای چنین توالی باشد پتانسیل واکنش در مقابل ABA را خواهد داشت (Han-Hua et al., 2008; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). همچنین توالی MBS^۷ (عناصر پاسخ به خشکی)، HSE^۸ (عناصر پاسخ به تنش گرما)، LTR^۹ (عناصر پاسخ به سرما)، توالی TC-rich repeat به عنوان یک عنصر عمومی و پاسخ دهنده به تنش و ARE^{۱۰} از عناصر پاسخ دهنده به تنش سرما و خشکی محسوب شده و از جمله مهمترین عناصر موجود در بالادست ژن‌های مسئول مقاومت به تنش هستند و حضور آنها در ژن‌های مورد بررسی، موید نقش آنها در پاسخ به تنش‌ها می‌باشد و بر اساس همین عناصر تنظیمی، Han-Hua et al. (2008) تجزیه و تحلیل ناحیه بالادست ژن‌های miRNA موثر در تنش را انجام دادند (Han-Hua et al., 2008). بنابراین با شناخت کارکرد موتیف‌ها، می‌توان خارج از محیط آزمایشی تا حدودی به بررسی پاسخ ژن‌ها پرداخت. در حال حاضر برنامه‌های مختلفی برای تجزیه توالی راه‌انداز وجود دارد که انواع موتیف‌های موجود بر روی توالی مورد نظر را که ممکن است نشانه‌ای از وجود یک پروتئین تنظیمی متقابل باشند را ارائه می‌کنند (Lescot et al., 2002). به این ترتیب چنانچه مجموعه‌ای از ژن‌های مورد بررسی دارای یک موتیف خاص باشند، انتظار می‌رود که همه آنها پاسخ مشابهی بر اساس خاصیت آن موتیف داشته باشند، بطوری که می‌توان

کلی در پاسخ به تنش‌های غیرزنده، دو گروه عمده از ژن‌ها دخالت دارند. دسته اول ژن‌هایی که به طور مستقیم در تنش نقش دارند و شامل ژن‌های کارکردی^۱، از جمله انواع اسموتین‌ها^۲، چپرون‌ها، آنزیم‌های دخیل در سنتز بتائین، پرولین و قندها، آنزیم‌های آنتی-اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز هستند که موجب تحمل شرایط تنش می‌شوند. گروه دوم که در قالب یک پاسخ اولیه فعال می‌شوند، معمولاً در مسیر بالادست پاسخ به تنش حضور دارند، در این گروه عمدتاً عوامل رونویسی و پروتئین کینازها دخیل هستند (Qiang et al., 2000; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). تنش شوری از تنش‌های مهم غیرزنده به شمار می‌آید (Chinnusamy et al., 2005; Ding et al., 2009; Caruso et al., 2008) و در بخش قابل توجهی از زمین‌های تحت کشت آبی و دیم، به عنوان یک عامل محدودکننده (Zhu, 2001; Yokoi et al., 2002) موجب خسارت و کاهش محصول تا حدود ۵۰ درصد می‌گردد (Caruso et al., 2008; Bartels & Sunkar, 2005). شوری در مراحل ابتدایی تنش، ماهیتی اسمزی داشته (Chinnusamy et al., 2005; Caruso et al., 2008) و در صورت تداوم، به صورت سمیت یونی و اختلال تغذیه‌ای بروز می‌کند (Caruso et al., 2008).

بررسی مولکولی تنظیم بیان ژن‌ها نشان می‌دهد که انعطاف‌پذیری به شرایط مختلف، به توان تغییر و تنظیم ژن‌ها وابسته است و این قابلیت، به عوامل مختلف تنظیمی از جمله عناصر فعال کننده سیس و ترانس^۳ مرتبط می‌باشد (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). برهم‌کنش این عناصر و پروتئین‌های مربوطه در نهایت موجب تغییر بیان ژن و فعالیت یا عدم فعالیت ژن مورد نظر می‌شود. عناصر تنظیم‌کننده سیس که عمدتاً در بالادست ژن‌ها قرار دارند موجب توانایی اختصاصی در پاسخ به شرایط مختلف می‌شوند (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). چون این عناصر از نظر تکاملی توالی‌های حفاظت شده^۴ هستند، استفاده از آنها امکان پیش‌بینی رفتار ژن‌ها را

5. Promoter analysis
6. ABA response element
7. Myb binding site
8. Heat-stress response element
9. Low-temperature-responsive element
10. Anaerobic induction element

1. Functional
2. Osmotin
3. Cis- & Trans-acting elements
4. Conserve

دمای میانگین ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد کاشته شدند. بعد از رویش اولیه و برای تأمین مواد غذایی مورد نیاز از محلول غذایی هوگلند (Hoagland & Syder, 1933) استفاده شد. در مرحله ۵ برگگی و پیش از اعمال تنش شوری، EC ورودی و خروجی گلدان‌ها برای اطمینان از عدم تجمع نمک و یکنواختی محیط، اندازه‌گیری شد که میزانی در حدود ۲ تا ۳ میلی‌زیمنس بر متر را نشان داد. برای اعمال تنش شوری از محلول ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl استفاده شد. قابل ذکر است که بررسی پروتئوم ارقام مورد استفاده در این آزمایش در سطوح شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار اجرا شده بود (Farhadi et al., 2011) و برای ادامه بررسی آنها در این آزمایش سطح ۲۰۰ میلی‌مولار انتخاب شد. نمونه‌های برگگی در زمان ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش، در نیتروژن مایع منجمد و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تجزیه و تحلیل راه‌انداز ژن‌های مورد بررسی

برای بررسی از هشت ژن با کارکردهای مختلف استفاده شد (جدول ۱) و بالادست توالی این ژن‌ها از نظر وجود عناصر تنظیمی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، از طریق برنامه تجزیه و تحلیل راه‌انداز (PlantCARE)، و با در نظر گرفتن ۱۵۰۰ جفت باز بالادست توالی‌های ارتولوگ ژن‌های مورد نظر در برنج، بررسی انجام شد (Lescot et al., 2002)، قابل ذکر است که برای این بررسی متوسط طول راه‌اندازهای گیاهی در نظر گرفته شد.

گفت، مجموعه ژن‌های دارای موتیف مشترک، عامل تنظیمی مشترکی داشته و اصطلاحاً هم‌تنظیم^۱ هستند (Lescot et al., 2002; Perco et al., 2006). بررسی مولکولی پاسخ به تنش‌ها به شناخت بهتری از این مکانیسم‌ها کمک می‌کند و در عین حال در اجرای برنامه‌های هدفمند در جهت ایجاد مقاومت به این شرایط کمک موثری می‌نماید (۱۶). در این بررسی به منظور جستجوی موتیف در ناحیه بالادست ژن‌های موثر در تنش شوری، از ۸ ژن که کارکردهای متفاوتی داشته و در عین حال همگی در مسیر پاسخ به تنش شوری حضور دارند استفاده شد. در انتخاب این ژن‌ها به نتایج پروتئومیکسی که پیش از این تحقیق بر روی همین ارقام گندم انجام شده بود (Farhadi et al., 2011)، توجه شد تا این ژن‌ها مورد بررسی و تجزیه و تحلیل بیشتری قرار گیرند. به این ترتیب الگوی بیان این ژن‌ها در دو رقم متحمل به شوری (روشن) و حساس به شوری (فلات) (Poustini & Siosemardeh, 2004)، با روش RT-PCR نیمه‌کمی^۲ بررسی شد و در ادامه از توالی‌های ارتولوگ این ژن‌ها در برنج برای جستجوی موتیف استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

مواد و تیمارهای آزمایشی

دو رقم گندم مقاوم (روشن) و حساس به شوری (فلات) در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه و محیط پرلیت و کوکوپیت (۲:۱)، در

جدول ۱- مشخصات ژن‌های مورد بررسی در گندم و نام اختصاری آنها

شماره دسترسی	نام اختصاری	نام ژن
gi 11124572	Tpis	Triosephosphat-isomerase
gi 40781605	14-3-3p	14-3-3 protein
gi 22204118	GCS	Putative glycine decarboxylase subunit
gi 2443390	Ps16	Ps16 protein
gi 1572627	SOD	Cu/Zn superoxide dismutase
gi 14017578	AtpE	ATP synthase CF1 epsilon subunit
gi 1805351	TSA	Thiol-specific antioxidant protein
gi 226316441	FBA	Fructose-bisphosphate aldolase, putative

1. Co-regulation
2. Semi-quantitative RT-PCR

استخراج RNA و اجرای RT-PCR نیمه کمی

استخراج RNA از نمونه‌های برگ گی بوسیله RNX-plus طبق دستورالعمل شرکت سیناژن انجام شد. پس از تیمار با DNase I طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز، سنتز رشته اول (sscDNA) با آغازگر اولیگو dt صورت

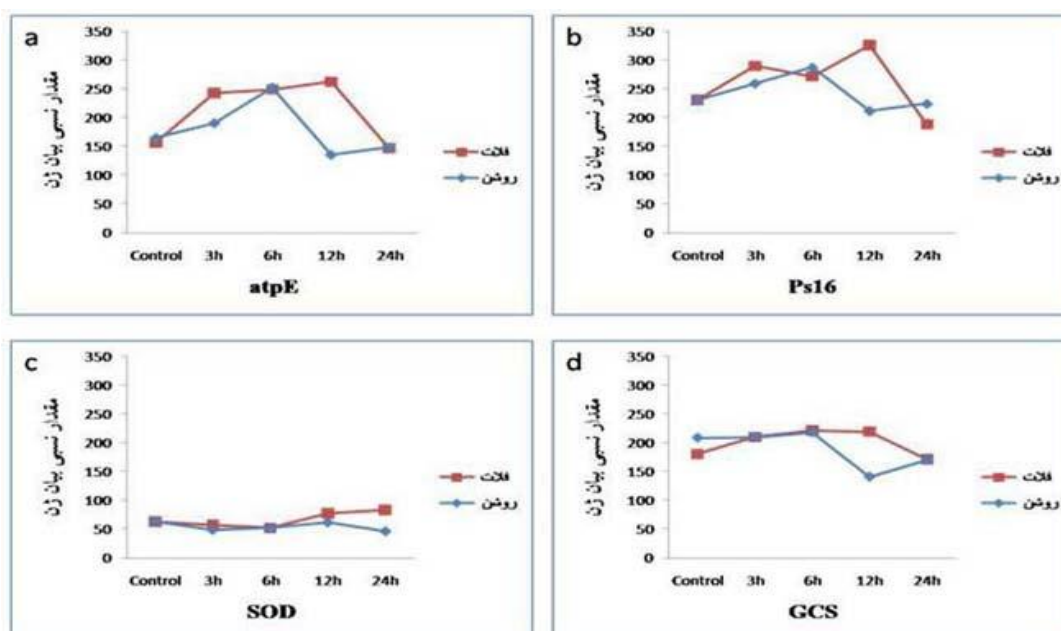
گرفت و با آغازگرهای اختصاصی گندم، RT-PCR ژن‌های مورد نظر انجام شد (جدول ۲). در این آزمایش برای نرمال‌سازی واکنش‌ها از بتا-اکتین، به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده برای ۸ ژن مورد بررسی در ارقام روشن و فلات

نام آغازگر	آغازگر برگشتی	آغازگر پیشرو	اندازه قطعه	دمای اتصال آغازگر (°C)
β -actin	5' gctggaaagtgctaagagagg 3'	5' gcaatgtatgtcgcaatcc 3'	۶۷۰	۶۰
Tpis	5' agettgcgccagttacagat 3'	5' getggacagatcgctctac 3'	۵۶۸	۶۳
GCS	5' ggaacgataatcgagcaagg 3'	5' gcctcaagatttcaagcag 3'	۵۹۴	۶۱
Ps16	5' ggaagcaacaggcagatagc 3'	5' cattgaggaggctgagaagg 3'	۵۴۳	۵۸
AtpE	5' tcggaatattccgccatag 3'	5' acgggttgatgagaggaatg 3'	۵۳۶	۶۲
TSA	5' cttagggtcagggttcacg 3'	5' gttcgaccaggagttcatca 3'	۵۰۸	۶۲
SOD	5' aacgagaatggcgtcttac 3'	5' cagtcgtccgaattgtctc 3'	۵۹۴	۶۳
FBA	5' ctctctcattctcgtcttgc 3'	5' cgctgtgccaagtactacga 3'	۵۶۴	۶۲
14-3-3p	5' cggagggtccagagagtcag 3'	5' ccattgagcagaaggaggag 3'	۵۰۷	۶۳

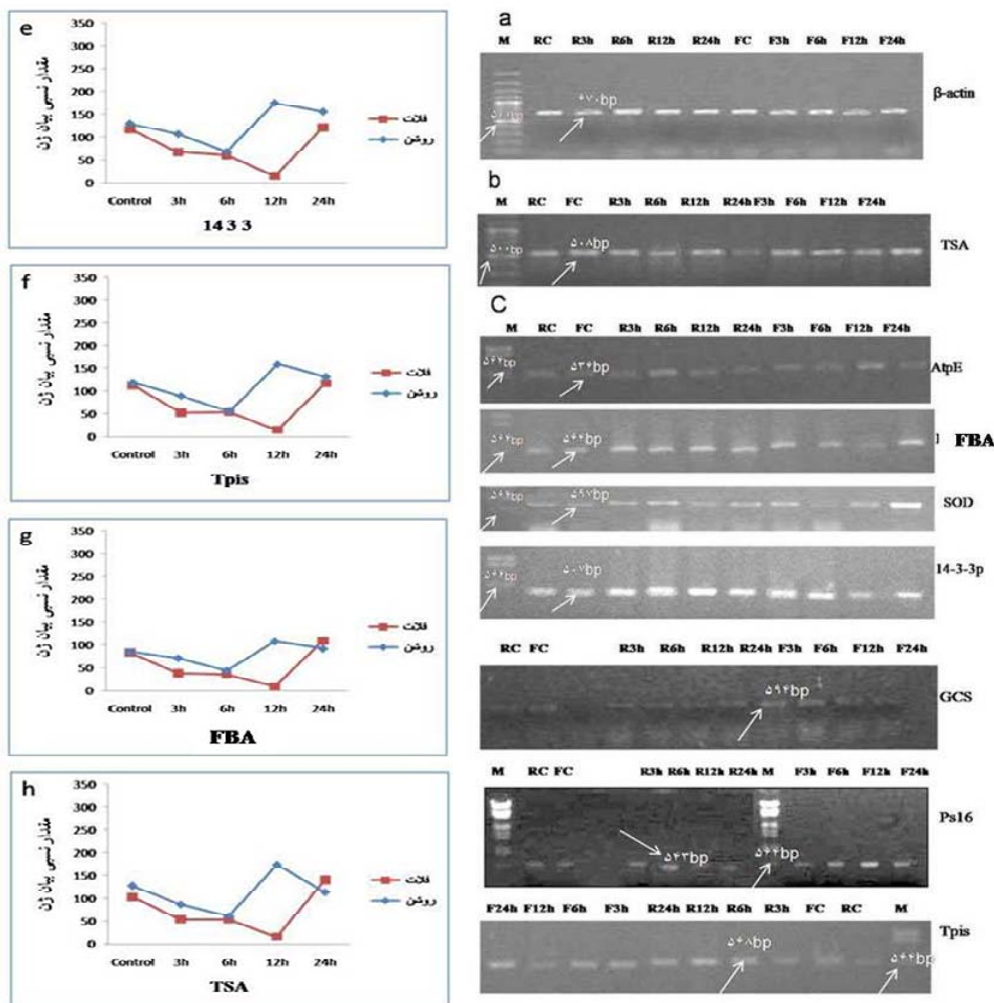
مشاهده شده برای بیان نسبی ژن‌ها پس از نرمال‌سازی داده‌ها با بتا-اکتین مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱).

در بخش مربوط به RT-PCR نیمه کمی بیان ژن‌ها، تصویر ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، با برنامه Quantity one 4.4.1 بررسی و شدت باندهای



شکل ۱- تغییر الگوی بیان ژن‌های مورد بررسی در ارقام گندم نان (روشن و فلات) در تنش شوری (سطح ۲۰۰ میلی مولار).

ادامه شکل ۱-۱



شکل ۱-۱- تغییر الگوی بیان ژن‌های مورد بررسی در ارقام گندم نان (روشن و فلات) در تنش شوری (سطح ۲۰۰ میلی‌مولار). در هر یک از شکل‌های a تا h، تغییرات نسبی بیان هر یک از ژن‌های مورد بررسی در دو رقم گندم نان (روشن و فلات) نشان داده شده است. مقادیر نسبی بیان شده در شکل‌ها بر حسب شدت باند است که توسط برنامه Quantity one اندازه‌گیری شده‌اند. تصویر ژل (a) بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی، جهت نرمال کردن واکنش‌های PCR برای ژن‌های مورد نظر استفاده شد. (b,c) تصاویر ژل‌ها مربوط به ژن‌های *AtpE*، *FBA*، *SOD*، *14-3-3p*، *GCS*، *Ps16*، *Tpis* و *TSA* می‌باشد و اندازه هر قطعه در شکل نشان داده شده است، اطلاعات بیشتر مربوط به هر قطعه، در جدول شماره ۲ آمده است. سایز مارکر استفاده شده (M) برای ژن بتا-اکتین و *TSA* از نوع 100bp DNA ladder و برای سایر ژن‌ها λ /DNA/EcoRI+HindIII marker می‌باشد. در این تصاویر RC و FC به ترتیب نشانه کنترل روشن و فلات و R3,6,12,24h و همچنین F3,6,12,24h به معنای مدت زمان پس از اعمال تنش شوری، در ارقام روشن و فلات است.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه راه‌انداز ژن‌های برنج، نشان داد که ژن‌های مورد بررسی در بالادست خود دارای تعداد زیادی عناصر پاسخ به تنش هستند (جدول ۳). به

عبارت دیگر ارتولوگ ۸ ژن مورد بررسی، همگی دارای ABRE^۱ بودند. طبق منابع موجود نتایج حاصل از

1. ABA responsive element

سرما و همچنین خشکی می‌باشد. این ۶ ژن، همگی دارای هر دو عنصر ABRE و ARE بودند، بنابراین بالقوه امکان پاسخ در هر سه شرایط تنش اسمزی، خشکی، شوری و سرما را دارند. طبق منابع موجود، مشاهده شده است که پاسخ به خشکی، شوری و همچنین سرما با حضور همزمان هر دو عنصر ABRE و ARE، رابطه دارد (Han-Hua et al, 2008). علاوه بر این، ژن‌های مورد بررسی دارای تعداد زیادی عناصر MBS، TC-rich repeat و همچنین LTR بودند (جدول ۳).

آزمایش‌های انجام شده در گیاهان نشان داده‌است که اغلب ژن‌هایی که به ABA پاسخ می‌دهند دارای توالی حفاظت شده ABRE هستند (Han-Hua et al, 2008; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006) و مطابق با نتایج Han-Hua et al (2008) وجود این عنصر می‌تواند نشانه معنی‌داری از نقش ژن مورد بررسی در پاسخ به تنش‌های غیرزنده باشد (Han-Hua et al, 2008). از این میان، ۶ ژن نیز دارای ARE بودند که نشان از امکان پاسخ آنها به شرایط کمبود اکسیژن^۱،

1. Hypoxic stress

جدول ۳- تعداد و نوع عناصر فعال‌کننده سیس در ژن‌های مورد بررسی در برنج. عناصر تنظیمی مورد استفاده در این تجزیه و تحلیل، همگی از عناصر شناخته شده‌ای هستند که به شرایط تنشی پاسخ می‌دهند.

کد ژن	نام اختصاری ژن	ABRE	ARE	MBS	TC-rich repeat	LTR
Os01g0147900	Tpis	۲	۲	۱		۲
Os02g0580300	14-3-3p	۱	۱	۳	۱	
Os01g0118000	FBA	۵		۵	۱	
Os04g0416400	TSA	۳		۳	۱	
Os03g0219200	SOD	۳	۲			۲
Os06g0667600	GCS	۲	۳	۱	۲	۱
Os07g0658200	Ps16	۳	۳	۱		
Os08g0250200	AtpE	۵	۳	۲		

روند تغییرات این ژن‌ها در شکل مشاهده می‌شود، هر دو ژن *AtpE* و *Ps16* دارای الگوی بیان مشابهی هستند. طبق نتایج بدست آمده، رقم حساس فلات، در رسیدن به حداکثر میزان بیان این دو ژن در جریان تنش شوری، نسبت به شرایط مشابه در رقم روشن، تاخیر مشاهده شد. آنزیم *AtpE* یکی از پروتئین‌های مرتبط با انرژی است که طبق بررسی پروتئومیکس انجام گرفته بر روی پروتئوم برگ گندم دوروم، در پاسخ به تنش شوری کاهش می‌یابد و این کاهش منجر به کاهش موقت میزان فتوسنتز می‌گردد (Caruso et al., 2008) بنابراین با توجه به نقش این آنزیم، روند مشاهده شده در نتایج، و افزایش مقدار این ژن تاثیر نامطلوب کاهش میزان فتوسنتز را نداشت. در شکل c، روند تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (*SOD*)^۵ دیده می‌شود که در

بر همین اساس، انتظار می‌رود که ژن‌هایی مانند *Tpis* و *14-3-3p*^۲ توان پاسخ به هر سه تنش خشکی، شوری و سرما را با الگوی بیانی مشابه داشته باشند و با ژن‌هایی مانند *AtpE*^۳ و *Ps16*^۴ که تعداد موتیف‌های مرتبط با تنش بیشتری دارند از نظر سطح و یا الگوی بیان تفاوت داشته باشند (شکل a,b,e,f, ۱).

در شکل ۱، تغییرات نسبی بیان ژن‌ها در زمان‌های ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت (در سطح ۲۰۰ میلی‌مولار) در ارقام روشن و فلات ارائه شده است. در شکل‌های a و b روند افزایشی در بیان ژن‌های *AtpE* و *Ps16* مشاهده شد که برای رقم روشن بیشترین مقدار افزایش در زمان ۶ ساعت و برای رقم فلات این افزایش در زمان ۱۲ ساعت پس از شروع تنش رخ داده است. همان طور که

1. Triosephosphat-isomerase
2. 14-3-3 protein
3. ATP synthase CF1 epsilon subunit
4. Ps16 protein

5. Cu/Zn superoxide dismutase

تبدیل می‌شود. اتانول‌آمین نیز تحت تاثیر متیلاسیون، به کولین^۲ و سرانجام گلايسين بتائين تبدیل می‌شود. این آنزیم تحت تنش شوری، مقدار کمی افزایش نشان می‌دهد (Caruso et al., 2008). همچنین افزایش میزان بیان این آنزیم در تنش خشکی نیز گزارش شده‌است (Way et al., 2005). به همین ترتیب، تغییرات نسبی بیان ژن‌های *14-3-3p*، *Tpis*، *FBA*^۳ و *TSA*^۴ در شکل‌های e تا h نشان داده شده‌است (شکل ۱). بیان هر چهار ژن در رقم فلات تا رسیدن به ۱۲ ساعت، کاهش تدریجی نشان می‌دهد. این تغییرات برای رقم روشن تا زمان ۶ ساعت کاهش و سپس در ۱۲ ساعت افزایش نشان دارد. همان‌طور که در شکل مشخص است هر چهار ژن، الگوی بیان مشابهی را نشان می‌دهند.

ژن *14-3-3p* در متابولیسم گلوکز و فروکتوز نقش دارد. این پروتئین‌ها با مهیا ساختن امکان فسفوریلاسیون در تنظیم پروتئین‌های هدف نقش دارند (Chung et al., 1999)، علاوه‌براین در مکانیسم‌های بیولوژیکی مختلفی از جمله انتقال پیام^۵، کنترل چرخه سلولی و همچنین به عنوان یک چارپون در پاسخ به استرس گرمایی نقش دارد (Yano et al., 2006). آنزیم *TSA* نیز که به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم مطرح می‌باشد (Chae et al., 1994) از اولین آنزیم‌های پروکسی‌ردوکسین^۶ شناخته شده بود (Caruso et al., 2008). در جریان فرآیندهای سلولی، گونه‌های فعال سولفوراز تیول^۷ تولید می‌شوند و همچنین گونه‌های فعال کسین^۸ در جریان فعالیت‌های سلولی بوجود می‌آیند که توان آسیب‌رسانی به همه انواع ماکرومولکول‌ها را داشته و منجر به اکسیداسیون و تخریب پروتئین‌ها، پروکسیداسیون چربیها و تغییر بازهای DNA و همچنین شکستگی رشته DNA می‌شوند (Chae et al., 1994). آنزیم *TSA* به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، در کاهش میزان پروکسیدهدیروژن و

زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت در هر دو رقم افزایش نشان داده است و تغییرات روند بیان این ژن در هر دو رقم حساس و مقاوم نسبتاً مشابه می‌باشد. آنزیم *SOD* نیز به عنوان یکی از آنزیم‌های برطرف‌کننده گونه‌های اکسیژن فعال بوده (Caruso et al., 2008; Sunkar et al., 2006) و در پاسخ به تنش شوری افزایش آن گزارش شده است (Caruso et al., 2008).

این آنزیم به عنوان اولین خط دفاعی در مقابل رادیکال‌های سوپراکسید عمل کرده و آنها را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند (Sunkar et al., 2006). همان‌طور که در شکل ۱c مشاهده می‌شود تغییر شدیدی در میزان این آنزیم مشاهده نشد. طبق منابع موجود در بررسی پاسخ ریشه آرابیدوپسیس به شوری افزایش بیان این ژن مشاهده شده است (Dinneny et al., 2008). علاوه بر این، طبق گزارش منابع در بررسی اثر شوری خاک بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دو وارسته *Catharanthus roseus*، مشاهده شده است که تغییر بیان *SOD* در بافت‌های مختلف گیاه و سطوح مختلف NaCl متفاوت می‌باشد به نحوی که در شوری بالاتر از ۵۰ میلی‌مولار حاصل از نمک کلرید سدیم، میزان بیان آن در هر دو بافت ریشه و ساقه کاهش می‌یابد در حالیکه سطح پایین شوری (در حدود ۵۰ میلی‌مولار) باعث افزایش بیان *SOD* گردید، اما آنزیم‌های دیگری مانند کاتالاز با افزایش سطح شوری، افزایش بیان نشان داده‌اند (Abdul Jaleel, 2009). همچنین تغییرات آنزیم گلیسین دکربوکسیلاز (GCS)^۱ نشان می‌دهد که در رقم فلات، یک روند افزایش تدریجی دیده می‌شود که بیشترین مقدار آن در زمان ۱۲ ساعت اتفاق می‌افتد، در مقابل در رقم روشن تا ۶ ساعت، تغییر خاصی دیده نمی‌شود و بعد به تدریج مقدار این آنزیم کاهش می‌یابد (شکل d).

آنزیم گلايسين دکربوکسیلاز یکی از آنزیم‌های موثر در بیوسنتز اسیدآمیننه می‌باشد و تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرد. گلايسين به عنوان پیش‌ساز گلايسين بتائين شناخته شده و با دکربوکسیله شدن توسط آنزیم GCS به سرین و متعاقباً به اتانول‌آمین

2. Choline

3. Fructose-bisphosphate aldolase, putative

4. Thiol-specific antioxidant protein

5. Signal transduction

6. Peroxiredoxin

7. Thiol

1. Putative glycine decarboxylase subunit

می‌دهد (Dinneny et al., 2008). چنین روندی در مورد سایر ژن‌های مورد بررسی نیز مشاهده شد. به طور کلی طبق نتایج RT-PCR نیمه کمی، از نظر نوع الگوی بیان ژن در تنش شوری دو گروه ژن، مشاهده شد (شکل ۲). گروه اول از این ژن‌ها با سطح بیان بالاتر شامل *Ps16*، *GCS* و *AtpE* بودند که در هر دو رقم فلات و روشن روندی مشابه را نشان دادند. در مقابل در گروه دوم ژن‌ها به جز *SOD*، که الگوی متفاوتی از خودنشان می‌دهد، الگوی بیانی بقیه ژن‌ها تا حد زیادی مشابه است.

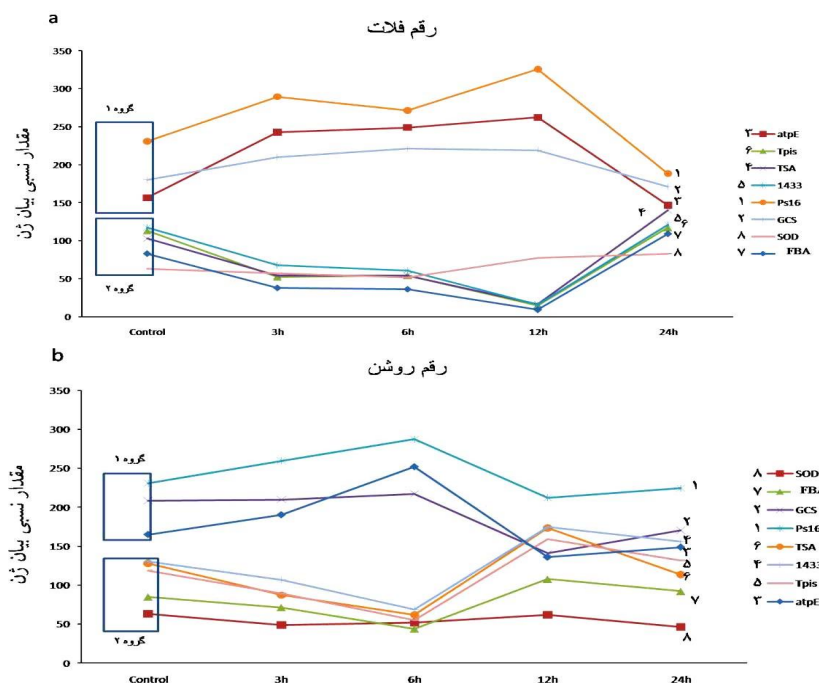
می‌توان چنین در نظر گرفت که ژن‌های گروه اول با هم و ژن‌های گروه دوم نیز با هم دارای خاصیت هم‌تنظیمی می‌باشند. طبق نتایج حاصل از تجزیه راه‌انداز، رفتار *AtpE* متفاوت از ژن‌هایی مانند *14-3-3p* و *Tpis* است که در نتایج حاصل از RT-PCR هم دیده می‌شود. در مجموع و علیرغم عدم وجود توالی کامل ژنوم گندم، می‌توان با استفاده از توالی ژنوم برنج و در نظر گرفتن ارتباط تکاملی حفاظت شده، بررسی‌های اولیه‌ای از نظر پاسخ به تنش انجام داد. البته محدودیت‌های فراوانی در برنامه‌های موجود برای بررسی عناصر تنظیمی و بررسی غیرآزمایشگاهی الگوی بیان ژن‌ها وجود دارد، که مسلماً در آینده کامل‌تر شده و نقش آنها در بررسی بیان ژن‌ها به خصوص در مباحث هم‌بیانی و هم‌تنظیمی و گسترش علم سیستم بیولوژی قابل توجه خواهد بود و به شناخت ما از شبکه‌های درگیر در مسیرهای سیگنالی درون سلولی کمک زیادی خواهد کرد (Century et al., 2008). حسن کار در بررسی ژن‌های هم‌تنظیم در این است که با شناخت ژن‌های درگیر در مسیر مورد نظر می‌توان از عامل تنظیم‌کننده بالادست این ژن‌ها استفاده کرده و بیشترین تاثیر را در تغییر یا بهبود مکانیسم مورد نظر بدست آورد (Century et al., 2008).

بنابراین چنانچه در کنار طرح‌های مختلف بهبود ظرفیت گیاه در مقابله با انواع تنش‌ها، به این زمینه نیز توجه شود می‌توان به نتایج هدفمندتر و کاراتری در ایجاد گیاهان متحمل به تنش دست یافت.

جلوگیری از آسیب‌های حاصل از گونه‌های فعال اکسیژن کمک موثری می‌کند (Caruso et al., 2008; Chae et al., 1994) و بر اساس شواهد موجود در پاسخ به تنش شوری افزایش می‌یابد (Caruso et al., 2008). همچنین گزارش شده است که سطح پروتئین *Tpis* در پاسخ به شوری افزایش بیان نشان می‌دهد. این آنزیم که در متابولیسم کربوهیدرات‌ها نقش دارد (Caruso et al., 2008) در پاسخ به تنش‌های خشکی و شوری منجر به افزایش میزان فندهای محلول گردید (Chaves et al., 2009). بررسی بر روی آنزیم *FBA* که در متابولیسم قندها دخالت دارد نیز، نشان داده است که میزان افزایش بیان این آنزیم در شوری و خشکی در ریشه بیشتر از برگ و ساقه است (Fan et al., 2009) این در حالی است که در نتیجه بررسی پروتئوم برگ گندم دوروم در تنش شوری، کاهش بیان *FBA* گزارش شده است (Caruso et al., 2008). طبق گزارش Dinneny et al. (2008) از نتایج میکروآرای ارزیابی ریشه آرابیدوپسیس در پاسخ به شوری (Dinneny et al., 2008)، روند تغییرات ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق مشابه با بیان ارتولوگ این ژن‌ها در آرابیدوپسیس بود که البته تغییرات بیان در ریشه آرابیدوپسیس از نظر زمانی جلوتر از تغییراتی است که در برگ مشاهده شد.

این تغییرات به نحوی است که افزایش یا کاهش بیان ژن‌ها در آرابیدوپسیس که در ریشه بدست آمده است سریع‌تر از پاسخ مشاهده شده در برگ گندم مورد بررسی در این تحقیق است. برای مثال طبق نتایج Dinneny et al. (2008)، آنزیم *TSA* در ریشه آرابیدوپسیس، در پاسخ به شوری، بعد از یک ساعت به کمترین مقدار بیان خود در جریان تنش می‌رسد و بعد تا زمان ۱۶ ساعت پس از تنش میزان بیان دوباره افزایش می‌یابد.

این در حالی است که در برگ گندم، کمترین مقدار مشاهده شده در هر دو رقم در زمان ۶ ساعت اتفاق افتاده و سپس یک روند افزایشی در رقم روشن دیده شد. به عبارتی ریشه به عنوان سطح اول پاسخ به تنش، تغییرات سریعتری را نشان



شکل ۲- گروه بندی ژن های مورد بررسی در ارقام گندم نان فلات (a) و روشن (b) بر اساس الگوی بیان آنها در نتایج RT-PCR نیمه کمی. مقایسه الگوی بیان ۸ ژن موردنظر در این آزمایش در ارقام فلات به عنوان رقم حساس به شوری و روشن به عنوان رقم متحمل به شوری در قسمت a و b شکل ترسیم شده است. تغییر الگوی بیان این ژن ها در هر دو رقم به نحوی است که دو گروه متمایز را ایجاد کرده‌اند.

REFERENCES

1. Abdul Jaleel Cheruth. (2009). Soil salinity regimes alters antioxidant enzyme activities in two varieties of catharanthus roseus, *Botany Research International* 2 (2), 64-68.
2. Bartels. D. and Sunkar. R. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 23-58.
3. Caruso G, Cavaliere, C. Guarino, C. Gubbiotti, R. Foglia, P. Laganà A. (2008). Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 391, 381-390.
4. Century, K. Reuber. T, L, & Ratcliffe, O. J. (2008.) Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. *Plant Physiology*, 147, 20-29.
5. Chae, H.Z. Robison, K. Pooleo, L.B. Church, G. Storz, G. & Sue Goo Rhee.(1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 91, 7017-7021.
6. Chaves, M. M., Flexas, J. & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, 551-560.
7. Chinnusamy, V. Jagendorf, A. & Zhu Jian-Kang. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45, 437-448.
8. Chung, H. J, Sehne, P. C., Ferl, R. J. (1999). The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. *Trends Plant Sci* 4, 367-371.
9. Dieterich, C. Grossmann, S. Tanzer, A. Röpckel, S. Arndt, P. F., Stadler, P. F & Vingron, M. (2005). Comparative promoter region analysis powered by CORG. *BMC Genomics* 2005, 6, 24.
10. Ding, D. Zhang, L. Wang, H. Liu, Zh. Zhang, Zu & Zheng Y. (2009). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany* 103, 29-38.
11. Dinneny, J. R. Long, T. A, Wang, J. Y. Jung, J. W. Mace, D. Pointer, S. Barron, C. Brady, S. M. Schiefelbein, J. Benfey, P. N. (2008). Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science* 320, 942-945.

12. Fan W, Zhang Zh, Zhang Y. (2009). Cloning and molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*. *Plant Cell Rep*, 28, 975–984.
13. Farhadi F, Naghavi M R, Zeinali Khaneghah H, Pustini K, Abooei Mehrizi F, Yazdi Samadi B, Alizadeh H. (2011). Proteome analysis of two beard wheat cultivar (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *Modern Genetics Journal*. 6(24), 86-90. (In Farsi)
14. Han-Hua Liu, Xin Tian, Yan-Jie Li, Chang-Ai Wu, and Cheng-Chao Zheng. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14, 836-843.
15. Hoagland D. R., and Syder W. C. (1933). Nutrition of the strawberry plant under controlled conditions: (a) Effects of deficiencies of Boron and certain other elements: (b) Susceptibility to injury from sodium salts. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 30, 288-294.
16. Lescot, M., Dehais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouze, P., and 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.
17. Mahajan S, Tuteja N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444, 139–158.
18. Mittler R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *TRENDS in Plant Science*. 11, 10.
19. Perco P, Rapberger R, Siehs C, Lukas A, Oberbauer R, Mayer G. (2006). Bernd Mayer, Transforming omics data into context: Bioinformatics on genomics and proteomics raw data. *Electrophoresis*, 27, 2659–2675.
20. Poustini, K. and Siosemardeh, A. (2004). Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. *Field Crops Res.*, 85, 125- 133.
21. Qiang L, Nanming Zh, Yamaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K. (2000). Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. *Chinese Science Bulletin* 45 (11), 970-975.
22. Sunkar R, Kapoor A, and Zhu Jian-Kang. (2006). Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in *Arabidopsis* Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance. *The Plant Cell*, 18, 2051–2065.
23. Way H, Chapman S, McIntyre L, Casu R, Xue G.P , Anners J, Shorter R. (2005). Identification of differentially expressed genes in wheat undergoing gradual water deficit stress using a subtractive hybridisation approach. *Plant Science* 168, 661–670.
24. Yamaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781-803.
25. Yano M, Nakamuta S, Xueji Wu, Okumura Y, and Kido H. (2006). A novel function of 14-3-3 protein: 14-3-3₁ is a heat-shock-related molecular chaperone that dissolves, thermal-aggregated proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 4769–4779.
26. Yokoi S, Bressan R. A, and Hasegawa P. M. (2002). Salt Stress Tolerance of Plants, *JIRCAS Working Report* 25-33.
27. Zhu Jian-Kang. (2001). Plant salt tolerance. *TRENDS in Plant Science*. 6 (2).