



جداسازی و بررسی بیان ایزوفرم فتوسترنزی ژن فسفوانول پیروات کربوکسیلاز در گیاه سورزیست الوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری

الهام یونسی ملردی^۱, قربانعلی نعمت زاده^۲ و احسان شکری^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استاد و محقق ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی تبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- دکترای نانوپیوتکنولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی تبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
(نویسنده مسؤول: e.shokri62@gmail.com) تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۷

چکیده

با توجه به این که کشاورزی دنیا با دو معضل گرم شدن زمین و شوری خاک روبرو است، بررسی مولکولی گیاهان مقاوم به شوری و گرما کمک زیادی به درک مکانیسم مقاومت و انتقال آن به گیاهان زراعی می کند. آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPc) واکنش برگشت ناپذیر فسفو انول پیروات را در حضور یون بی کربنات به منظور تولید اگزالو استات در گونه هایی کاتالیز می کند که در آنها کربوکسیلاسیون اولیه CO_2 مزوفیلی در طول فتوسترنز C4 و متاپولیسم اسید کراسو لاسه انجام می شود. در پژوهش حاضر بخشی از توالی کد شوند (CDS) ژن *pepc* در گیاه سورزیست چمن شور ساحلی یا برت با نام علمی *Aluroropous litoralis* با طول ۶۷۸ جفت باز جداسازی و با شماره دسترسی (EC:4.1.1.31) KP122945 در بانک ژن NCBI ثبت شد، سپس الگوی تمایل کدونی و آنالیز کمی بیان آن در غلظت های شاهد (۰+) و ۶۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم (NaCl) با استفاده از روش Real-time PCR مطالعه شد. نتایج نشان دادند که قطعه جداسازی شده بیشترین همولوژی در سطح پروتئین را با گونه های *Zoysia japonica* و *Eragrostis minor* دارد. همچنین شاخص تمایل کدنی (CAI) آن ۰/۸۲ برآورد گردید. بررسی کمی بیان ژن تحت تنش ۶۰۰ میلی مولار نمک نشان داد که سطح رونوشت ژن *pepc* در پاسخ به شرایط تنش، حدود ۳ برابر (نسبت به شاهد) افزایش یافته است. بنابراین افزایش بیان ژن فتوسترنز *pepc* به عنوان یکی از مکانیسم های ایجاد مقاومت به تنش شوری در گیاه *Aluroropous litoralis* پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: الوروپوس لیتورالیس، فسفوانول پیروات کربوکسیلاز، تنش شوری، بیان ژن، تمایل کدنی

CO_2 به بی کربنات در سلول های مزو فیل به وسیله ای کربونیک آنہیدراز (مانع از اکسیژنه شدن آنزیم رو بیسکو در مناطق گرم می شود (۳۲). بنابراین گیاهان C4 با مصرف آب کمتر و عدم نیاز به باز و بسته شدن زیاد روزنده ها در شرایط کم آبی کار آبی فتوسترنزی بسیار بالای دارند (۳۲).

ثبت اولیه CO_2 به وسیله ای آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPc) (EC= 4.1.1.31)^(۱) با استفاده از فسفوانول پیروات (PEP) به عنوان گیرنده CO_2 انجام می شود و در نتیجه یک ترکیب چهار کربنی به نام اگزالو استات تولید می شود که نام این مسیر متabolیکی بر همین اساس انتخاب شده است. PEPc یک آنزیم سیتوزولی است که در گیاهان آلی و همچنین در باکتری ها، سیانوبکتری ها و جلبک های سبز یافت می شود (۴، ۱۵، ۳۴). نقش اصلی و شناخته شده این آنزیم کربوکسیلاسیون اولیه CO_2 مزو فیلی در طول فتوسترنز C4 و متاپولیسم اسید کراسو لاسه است. همچنین این آنزیم در فرآیندهای غیر فتوسترنزی مانند تقسیم بندی کربن و نیتروژن در برگ های C3 شکل گیری بذر، جوانه زنی و رسیدگی میوه فعال است (۱۵، ۴).

مطالعات متعددی در خصوص مشارکت آنزیم PEPc در پاسخ به انواع شرایط تنشی و ایجاد سازگاری در گیاهان انجام شده است (۶، ۱۲، ۳۵). دوبنرووا و ریسلوا (۱۱، ۲۰) گزارش کردند که فعالیت آنزیم های PEPc، PPDK و NADP-ME در گیاهان تحت تنش های مختلف غیر زیستی نظیر خشکی، شوری، اوزون، عدم وجود فسفات و آهن و یا حضور فلزات

مقدمه

یکی از مهم ترین چالش هایی که کشاورزی دنیا با آن روبرو است وجود و گسترش خاک های شور و شور شدن خاک های زراعی موجود می باشد (۳۰). علاوه بر این گرم شدن فرآینده کره زمین نیز از مشکلات عمدۀ کشاورزی به شمار می رود. بررسی مولکولی گیاهان مقاوم به شوری و گرما کمک زیادی به درک مکانیسم مقاومت در این گیاهان می کند. بنابراین می توان از این مکانیسم ها برای انتقال به گیاهان زراعی و بهبود مقاومت در برابر تنش های زیستی استفاده نمود. گیاه چمن شور ساحلی یا *Aluroropous litoralis* یک هالوفیت چند ساله ریزوم دار تک لپه ای با سیستم فتوسترنز C4 و بومی ایران می باشد، که می تواند شوری (NaCl) را تا سطح بالاتر از ۶۰۰ میلی مولار تحمل کند (۲۲). علاوه بر شوری بودن، سیستم فتوسترنز C4 این گیاه نیز یکی از دلایل مقاومت بیشتر آن در برابر تنش های شوری و C4 خشکی است. گیاهان دارای سه تیپ فتوسترنزی C3، C4 و CAM هستند به طوری که اکثر گیاهان و عده گیاهان زراعی جزء گیاهان C3 بوده و بخش کوچک تری به گیاهان C4 تعلق دارند. فتوسترنز C3 در شرایط دمایی بالا یک پروسه ناکارآمد است زیرا آنزیم رو بیسکو که در قلب چرخه کالوین قرار داشته ثبت CO₂ را انجام می دهد و در دمای بالا بسیار ناکارآمد خواهد شد (۱۹) اما در مقابل مهم ترین مزیت گیاهان C4 این است که غلظت CO₂ را در سلول های کرانز تا حدی افزایش می دهند که از طریق یک مکانیسم کمکی (تبديل

آبیاری شدند. پس از ۱۰ روز بعد از اعمال تنش نمونه‌گیری از برگ‌های بالغ و میانی گیاهان انجام شد.

استخراج RNA با کمک معرف ترایزول انجام شد (۲۹). پس حذف الودگی احتمالی DNA از RNA استخراج شده با استفاده از دستورالعمل تیمار با آنزیم I DNAase شرکت فرمتاز، RNA استخراج شده با کمک آنزیم Reverse Transcriptase به cDNA transcriptase (EP0441) تبدیل گردید.

طراحی آغازگرها

از آن جایی که جداسازی توالی کد شونده ژن اخیر در آلو روپوس لیتورالیس برای اولین بار انجام می‌شد، اطلاعات و توالی ژنی این جایگاه در بانک ژن موجود نبود. بنابراین پس از شناسایی ایزوفرم فتوستتری ژن مورد نظر در بانک ژن، توالی‌های CDS آن در گونه‌های با قرایت نزدیک *Hordeum*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum*, *Oryza sativa* و *vulgare* انتخاب شده و پس از همدمی با استفاده از نرمافزار BioEdit (۱۳) و بر اساس نواحی حفظ شده بین گونه‌ای، آغازگرهای مناسب با استفاده از نرمافزار Oligo5 طراحی شدند (جدول ۱). برای بررسی بیان ژن (Real time PCR) پس از تایید صحت توالی جداسازی شده توسط بلاست، آغازگرهای داخلی با طول و شرایط مناسب طراحی شدند. طول قطعه تکثیر ۹۰ چفت باز در نظر گرفته شد. در پژوهش حاضر بیان نسبی ژن *pepc* در مقایسه با ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی اندازه‌گیری شد. بتا اکتین یکی از پرکاربردترین ژن‌های مرجع در مطالعات بیان ژن می‌باشد. تیان و همکاران (۴۱) نشان دادن که ژن‌های *TUB* و *ACTIN* پایدارترین ژن‌ها در تنش‌های مختلف گرمایی، سرمایی، شوری و خشکی هستند.

جداسازی، توالی‌یابی و آنالیز بیوانفورماتیکی بخشی از ناخیه رمز کننده ژن *pepc*

به منظور تکثیر توالی ژن مورد نظر، از cDNA سنتز شده و آغازگرهای رفت و برگشت (ISO) در واکشن PCR استفاده شد. چرخه‌های حرارتی PCR شامل واسرشته‌سازی آغازین: ۹۵ درجه (۳ دقیقه)، ۳۵ چرخه شامل: ۹۴ درجه (۴۵ ثانیه)، ۷۲ درجه (۱ دقیقه) و سطح دمای اتصال آغازگر (۴۵ ثانیه)، ۷۲ درجه (۷ دقیقه) اعمال گردید. پس از حصول اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، حدود ۱۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۲/۵ درصد و با بافر TAE الکتروفورز گردید قطعه مورد نظر از روی ژل بریده و پس از خالص‌سازی طبق دستورالعمل کیت High pure pcr product- Roche نظر برای توالی یابی دو طرفه با آغازگرهای رفت و برگشت ارسال گردید.

سنگین در خاک و تنش‌های زیستی نظیر ویروس‌ها افزایش می‌یابد. آنها پیشنهاد کردند که نقش این آنزیم‌ها در شرایط تنش مهم‌تر از نقش آنها در شرایط طبیعی است. سانچز و همکاران (۳۴) بیان ایزوفرم‌های مختلف ژن *pepc* را در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا تحت تنش‌های شوری و خشکی بررسی کردند. نتایج نشان داد که ایزوفرم‌های PEPc بیان افتراقی را در ارگان‌های مختلف آرابیدوپسیس در پاسخ به تنش‌های شوری و خشکی نشان می‌دهند. در این میان ایزوفرم PEPc4 بیشترین بیان را تحت تحریک شوری و خشکی نشان داد. نتایج به دست آمده نشان داد که PEPc بخشی از سازگاری گیاه در مقابل تنش‌های خشکی و شوری را تشکیل می‌دهد. انتقال ژن بصورت همو یا هترولوج و بیش‌بیانی آنزیم PEPc در گیاهان مختلف مثل ذرت و برنج نیز نشان می‌دهد افزایش بیان این ژن باعث بهبود راندمان مصرف آب و افزایش نرخ فتوستتر در شرایط تنش‌های شوری، خشکی و دمای زیاد می‌گردد (۲). اگرچه مطالعات زیادی به اهمیت عملکرد آنزیم PEPc در شرایط تنشی اشاره کرده‌اند، با این وجود هنوز برای تعیین دقیق مکانیسم مولکولی ایجاد مقاومت به انواع تنش‌ها— بویژه شوری و خشکی— به مطالعات جامع‌تری نیاز است.

از جمله راهبردهای تعریف شده در مسیر انقلاب سبز، شناسایی ویژگی‌های مثبت گیاهان هالوفیت نسبت به گلیکوفیتها و انتقال ویژگی‌های مثبت گیاهان *C₄* به گیاهان *C₃* می‌باشد. به همین منظور استفاده از گیاه آلو روپوس لیتورالیس^۱ به عنوان یک مدل برای مطالعات مولکولی و شناسایی مکانیسم‌ها و ژن‌های درگیر در ایجاد مقاومت این گیاه در مقابل تنش شوری، در این مسیر کمک شایان توجهی خواهد نمود. بنابراین هدف از پژوهش حاضر جداسازی توالی کد شونده ژن فتوستتری *pepc*، مطالعه الگوی تمايل کدنی و بررسی تغییرات کمی بیان رونوشت‌های این ژن تحت تنش شوری در گیاه آلو روپوس لیتورالیس با کمک روش Real-Time PCR بوده است.

مواد و روش‌ها تهیه نمونه‌های گیاهی و سنتز cDNA

بذور گیاه آلو روپوس لیتورالیس در ماسه کشت و با محلول مغذی هوگلند (۱۰) ۱۰۰ درصد که حاوی عناصر ماکرو و میکرو می‌باشد، آبیاری شد. بررسی اثر تنش شوری در پژوهش حاضر در دو سطح شامل بدون نمک (شاهد) و ۶۰۰ میلی مولار نمک کلریدسدیم با در نظر گرفتن سه تکرار بیولوژیک انجام شد. جهت آماده کردن گیاهان برای پذیرش شوری، گیاهان در چهار نوبت با افزایش میزان نمک به میزان ۱۵۰ میلی مولار در هر نوبت با فاصله زمانی یک روز در میان

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای جداسازی و بررسی بیان ژن *pepc* در گیاه آلوروپوس لیتورالیس

نوع آغازگر	نام ژن	توالی (۳'.....۵')	طول قطعه (bp)	دماه اتصال
(ISO) ایزو لاسیون	<i>pepc</i>	F-CTTCGGCCSTACATCATCTC R-GACY CTGAAGAAK GGCCTAC	۸۹۷	۶۶
(GE) بیان ژن	<i>pepc</i>	F- GTCCGAGTACCCGACCATG R- GTGGTGCCGCTGTTCGAGA	۹۰	۵۹
(RE) رفرنس	β -actin	F- GTCCGAGTACCCGACCATG R- GTGGTGCCGCTGTTCGAGA	۹۰	۵۹

*: حرف Y نشان‌دهندهٔ باز های T یا C است.

**: حرف K نشان‌دهندهٔ باز های T یا G است.

کنترل داخلی استفاده شد. همچنین برای افزایش دقت آزمایش سه تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی (Technical) برای هر تیمار آزمایشی مد نظر قرار گرفت. در کنار تکثیر نمونه‌های اصلی چاهک‌هایی به نمونه‌های کنترل منفی (NTC) و کنترل مشتبه اختصاص داده شد. چرخه‌های حرارتی PCR شامل واسرشته‌سازی آغازین ۹۵ درجه (۱۵ دقیقه)، ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه (۱۵ ثانیه)، دماه اتصال آغازگر ۵۹ درجه (۳۰ ثانیه)، اعمال گردید. در نهایت، از روش در ۶۰ درجه (۵ ثانیه) اعمال گردید. در نهایت، از روش تصحیح کارآیی طبق فرمول (۱) زیر برای تعیین بیان ژن *pepc* استفاده شد (۲۸):

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP}_{\text{target}}(\text{control-sample})}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP}_{\text{ref}}(\text{control - sample})} \quad (1)$$

نتایج و بحث

توالی یابی و تجزیه و تحلیل بخشی از ناحیه رمز کنندۀ ژن *pepc*

پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، قطعه مورد نظر با استفاده از آغازگرهای (ISO) تکثیر شد. الکتروفورز محصول PCR وجود یک باند با اندازه تقریبی ۸۹۷ جفت باز را مربوط به ژن *pepc* در آلوروپوس لیتورالیس نشان داد. نتایج تجزیه و تحلیل بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی، صحت قطعه جداسازی شده را تأیید نمود (جداول ۳ و ۲). همچنین این نتایج نشان داد که در سطح نوکلئوتیدی توالی بدست آمده از آلوروپوس لیتورالیس به ترتیب ۹۶ و ۹۳ درصد همسانی *pepc* گونه‌های *Chloris gayana* و *Eragrostis minor* و در سطح پروتئینی به ترتیب ۹۹ و ۹۷٪ با گونه‌های *Zoysia japonica* و *Eragrosti minor* دارد.

بعد از توالی یابی، بررسی‌های بیوانفورماتیک از جمله آنالیز بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی برای تایید توالی جداسازی شده و همچنین مقایسه همولوژی آن با قطعات ژنی سایر گونه‌ها انجام گردید. همچنین توالی شناسایی شده ژن *pepc* پس از تعیین ORF، برای محاسبه شاخص تمایل کدونی و مقایسه آن با شاخص تمایل کدونی سایر گونه‌ها، آنالیز گردید. بدین منظور پس از هم‌دیفیت توالی شناسایی شده با برخی از گونه‌های گلیکوپروتئین C₄ و C₃، نواحی همپوشان از هر گونه CAIcalculator انتخاب گردید و سپس با استفاده از ابزار شاخص تمایل کدونی قطعه جداسازی شده و توالی‌های متناظر با آن که از بانک ژن استخراج شده بودند محاسبه گردید. در این پژوهش با کمک رسم درخت فیلوجنیک رابطه خویشاوندی توالی رمزکننده *pepc* آلوروپوس لیتورالیس با تعدادی از گیاهان C₄ و C₃ و CAM مورد ارزیابی قرار گرفت. برای رسم درخت فیلوجنیک ابتدا توالی‌ها به وسیله برنامه clustalw مگا4 هم‌دیف شدن و سپس درخت فیلوجنیک برای آن‌ها با روش اتصال مجاور (Neighbourjoining) ترسیم شد. به منظور تایید اعتبار درخت فیلوجنیک ترسیم شده از الگوریتم Bootstrap با تکرار استفاده شد (۳۹).

آنالیز کمی بیان ژن، Quantitative RT-PCR

به منظور آنالیز کمی بیان ژن، غلظت یکسانی از RNA برای سنتز cDNA در هر تکرار مورد استفاده قرار گرفت. بعد از سنتز cDNA برای حصول اطمینان از صحبت توالی و دماه اتصال آغازگرهای طراحی شده و تعیین دقیق شرایط تکثیر پهنه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه PCR معمولی انجام شد. برای انجام مراحل اولی Real time PCR از مخلوط واکنش SYBERGreen 1 شرکت فرمتوتاز در حجم ۱۵ میکرولیتر و در حضور ژن β -actin mRNA به عنوان

جدول ۲- نتایج بلاست توالی نوکلئوتیدی قطعه‌ی ژنی *pepc*

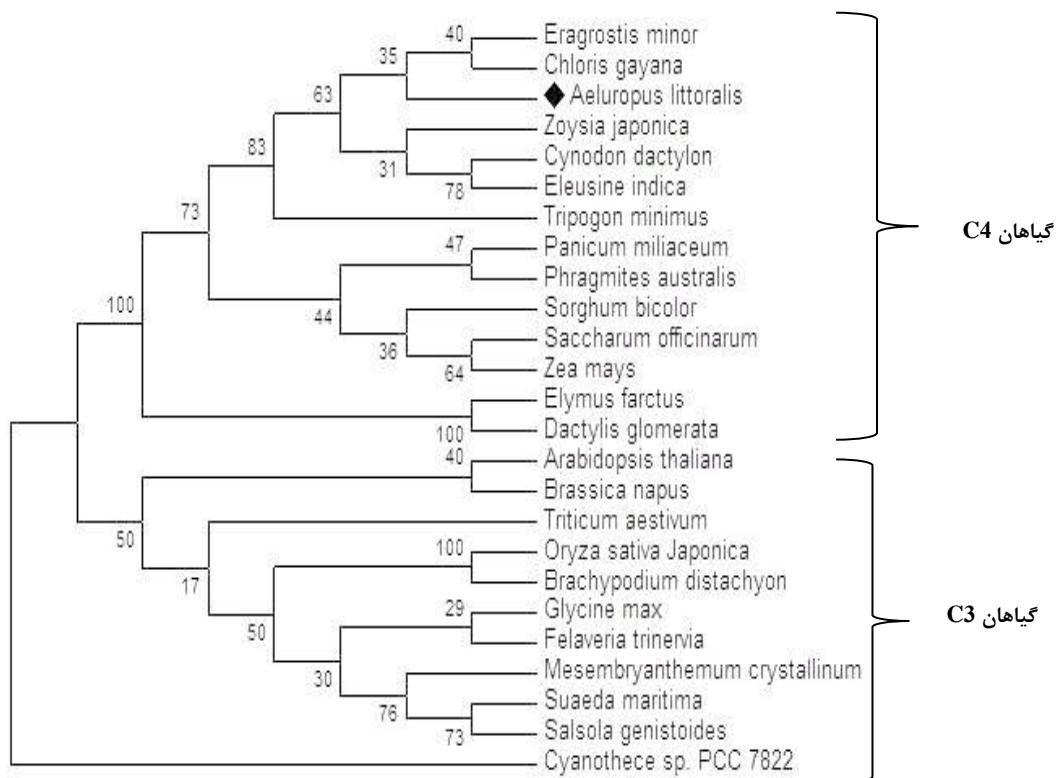
شماره دسترسی	نام گونه	میزان پوشش	ارزش E	درصد همسانی
AM690222.1	<i>Eragrostis minor</i>	%100	0	%96
AF268091.1	<i>Chloris gayana</i>	%100	0	%93
NM_001161348.1	<i>Zea mays</i>	%99	0	%88
AF271995.1	<i>Oryza sativa Japonica</i>	%99	1.00E-111	%63
AY210895.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	%99	1.00E-99	%72
NM_001250465.1	<i>Glycine max</i>	%99	6.00E-71	%69

جدول ۳- نتایج بلاست توالی پروتئینی قطعه ژنی *pepc*Table 3. Blast results of protein sequence of *pepc* gene fragment

ردیف	شماره دسترسی	نام گونه	میزان بوشش	E ارزش	درصد همسانی
۱	CAM84059.1	<i>Eragrostis minor</i>	%۱۰۰	4.00E-164	%۹۹
۲	CAM84149.1	<i>Zoysia japonica</i>	%۱۰۰	9.00E-161	%۹۷
۳	CAD60555.1	<i>Zea mays</i>	%۱۰۰	4.00E-133	%۸۸
۴	P15804.2	<i>Sorghum bicolor</i>	%۱۰۰	5.00E-134	%۸۹
۵	AAG00180.1	<i>Oryza sativa Japonica</i>	%۱۰۰	3.00E-128	%۸۳
۶	NP_001237394.1	<i>Glycine max</i>	%۹۹	1.00E-126	%۸۲
۷	NP_175738.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	%۹۹	7.00E-126	%۸۲

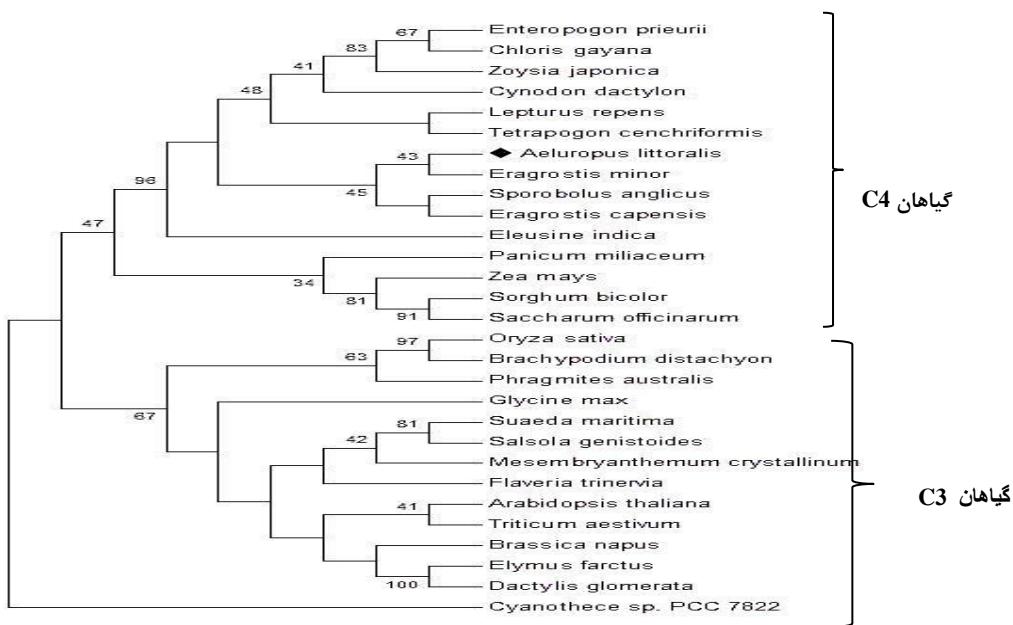
پس از تجزیه و تحلیل تمایل کدونی با استفاده از ابزار CAIcalculator GC (۲۹) میزان GC توالی جداسازی شده ۶۴/۶ درصد، GC در نوکلئوتید سوم کدون های توالی ۸۹ درصد و شاخص تمایل کدونی نیز برابر ۸۲/۰ بودست آمد (جدول ۴). همچنین شاخص تمایل کدونی و درصد GC در برخی از گونه های گلیکوفیت C₃ ، C₄ ، C₄ محاسبه و با شاخص تمایل کدونی *pepc* آلوروپوس لیتورالیس مقایسه گردید. میانگین شاخص تمایل کدونی در گلیکوفیت های C₄ ۸۸/۰ و در گلیکوفیت های C₃ ۷۴/۰ بودست آمد (جدول ۴).

به منظور تعیین روابط خویشاوندی این قطعه ژنی، درخت فیلوجنی، براساس توالی پروتئینی و نوکلئوتیدی بدست آمده و در مقایسه با برخی گونه های گیاهی دیگر موجود در پایگاه داده ها ترسیم شد. نتایج گروه بندی براساس توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی به ترتیب در شکل ۱ و شکل ۲ نشان داد که، توالی رمز کننده *pepc* آلوروپوس لیتورالیس قرابت نزدیکی با *Eragrostis minor* و *Chloris gayana* دو گونه *pepc* آلوروپوس لیتورالیس درد و در سطح پروتئینی PEPC آلوروپوس لیتورالیس قرابت نزدیکی با توالی پروتئینی گونه های *Eragrostis minor*, *Eragrostis capensis* نشان داد.



شکل ۱- مقایسه قرابت توالی نوکلئوتیدی *pepc* آلوروپوس لیتورالیس و سایر گونه ها. درخت فیلوجنیکی با استفاده از نرم افزار MEGA4 و روش اتصال مجاور(neighborjoining) ترسیم شد. و پارامتر تکرار در ترسیم ۱۰۰۰ در نظر گرفته شد.

Figure 1. Comparison of *pepc* gene nucleotide sequences relationship with other species. Phylogenetic tree generated using MEGA4 software and neighborjoining method. The bootstrap value was considered as 1000.



شکل ۲- مقایسه قرابت توالی پروتئینی PEPc آلوروپوس لیتورالیس و سایر گونه‌ها. درخت فیلوزنیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 و روش اتصال مجاور (neighborjoining) ترسیم شد. پارامتر تکرار در ترسیم ۱۰۰۰ در نظر گرفته شد.

Figure 2. Comparison of PEPc protein sequences relationship with other species. Phylogenetic tree generated using MEGA4 software and neighborjoining method. The bootstrap value was considered as 1000.

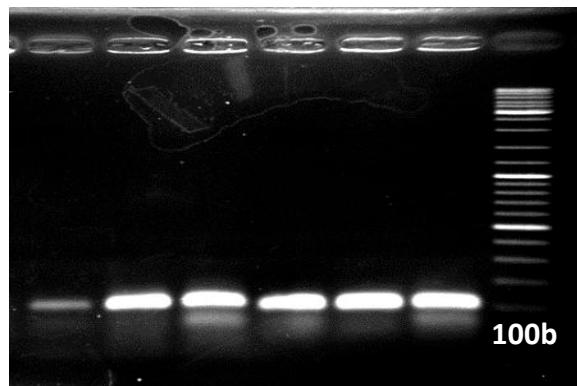
جدول ۴- مقایسه ای نتایج تجزیه و تحلیل تمایل کدنی قطعه جداسازی شده با برخی از گیاهان
Table 4. Comparation of results of codon biase analysis isolated fragment with other species

Species name	GC ^۱ %	GC1 ^۲ %	GC2 ^۳ %	GC3 ^۴ %	CAI ^۵
<i>Aeluropus littoralis</i>	۶۴/۶	۶۱/۵	۴۵/۹	۸۹	-/۸۲۲
<i>Sorghum bicolor</i>	۶۴/۵	۶۰/۵	۴۲/۸	۹۳/۵	-/۸۹۵
<i>Saccharum officinarum</i>	۶۴/۶	۶۱/۴	۴۲/۸	۹۳	-/۸۹۷
<i>Zea mays</i>	۶۴/۴	۶۳	۴۵/۸	۹۴	-/۸۷۸
C4 (mean)	۶۵/۱۶	۶۱/۶۳	۴۳/۸	۹۳/۵	-/۸۸
<i>Oryza sativa</i>	۵۴/۶	۷۲/۰	۵۱/۶	۹۳/۸	-/۷
<i>Arabidopsis</i>	۴۸/۶	۵۹/۳	۴۲/۶	۴۴/۴	-/۷۴
<i>Glycine max</i>	۴۶	۶۱/۶	۴۴/۴	۳۱/۹	-/۷۸۵
C3 (mean)	۴۹/۷۳	۶۴/۳	۴۶/۲	۳۸/۷	-/۷۴۱

۱: درصد GC کل، ۲: درصد GC در نوکلوتید اول کدون، ۳: درصد GC در نوکلوتید دوم کدون، ۴: درصد GC در نوکلوتید سوم کدون، ۵: شاخص تمایل کدونی

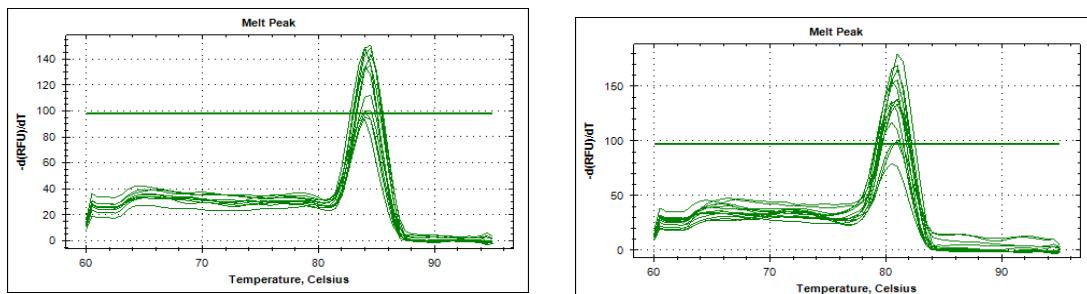
نتایج PCR اخصوصی بودن محصولات تکثیر یافته با آنالیز منحنی ذوب بررسی شد. پیک (peak) اخصوصی محصول برای ژن *pepc* در دمای ۸۴ درجه سانتی گراد و ژن کنترل داخلی بتا اکتین در دمای ۸۱ درجه سانتی گراد نشان داده شده است (شکل ۴). نتایج حاصل عدم حضور پرایمر دایمر و تکثیر اخصوصی را تایید کرد.

نتایج بررسی تغییر بیان ژن *pepc* تحت تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس به منظور تعیین شرایط بهینه تکثیر، تایید صحت عملکرد آغازگرهای (GE ، RE) و بررسی کیفیت cDNA تهییه شده از واکنش PCR معمولی استفاده شد. به دست آمدن تک باند با اندازه ۹۰ جفت باز، صحت تکثیر ژن مورد بررسی را تایید نمود (شکل ۳). در انتهای چرخه‌های تکثیر Real time



شکل ۳- نمونه هایی از محصول PCR برای تایید صحت عملکرد آغازگرهای RE, GE. طول قطعه تکثیر شده ۹۰ جفت باز است.
شانگر وزن مولکولی (#SM1153)

Figure 3. Samples of PCR products for performance confirmation of RE & GE primers. Length of amplified fragments is 90 bp. molecular weight marker #SM0311 (Fermentas).



شکل ۴- آالیز منحنی ذوب. در این منحنی اختصاصی بودن محصولات واکنش Real time PCR بررسی شد. دمای ذوب محصولات واکنش ژن *pepc* (چپ) و بتا اکتین (راست) به ترتیب ۸۴ و ۸۱ درجه سانتی گراد است.

Figure 4. Melting curve analysis. The specificity of Real-time PCR products were confirmed by this curve. melting temperature of *pepc* (top figure) and beta actin (down figure) gene products were 84 and 81 °C, repectively.

در گروه اول و گیاه *C₄* و هالوفیت *Phragmites australis* در گروه دوم و در ارتباط تکاملی بسیار نزدیک با آلو روپوس قرار گرفته اند. در سطح نوکلئوتیدی آلو روپوس نزدیکترین رابطه تکاملی را با گیاهان *C₄* و هالوفیت *Chloris gayan* و *Eragrostis minor* نشان می دهد. ولی در سطح پروتئینی همچنان رابطه تکاملی خود را با گونه هی *Eragrostis minor* حفظ می کند ولی از گونه هی *Chloris gayan* فاصله می گیرد. با توجه به نتایج حاصل از بلاست پروتئینی و نوکلئوتیدی و همچنین ترسیم درخت فیلوجنتیک و با در نظر داشتن آنکه *PEPC* یک آنزیم فتوستتری است می توان پیش بینی کرد که در الوبت اول تکاملی، نوع چرخه فتوستتری تعیین کننده همولوژی توالی هاست.

وجود کدون های متراوف، روش کنترلی ژنوم برای تخفیف و خنثی کردن اثرات جهش های نقطه ای و تنظیم بیان ژن می باشد. کدون های متراوف در ژنوم گونه های مختلف و هم در بین ژن های ژنوم یک موجود با فراوانی متفاوتی استفاده می شوند، که به این پدیده تمایل کدونی اطلاق می شود. نتایج تجزیه و تحلیل تمایل کدونی قطعه ی ژنی *pepc* با استفاده از ابزار CAIcalculator در جدول ۴ نشان داده شده

در نهایت بررسی میزان تغییر در بیان ژن تحت تیمار با شوری نشان داد که اعمال تشن (غلظت نمک ۶۰۰ میلی مولار)، باعث افزایش بیان ژن *pepc* به میزان ۲/۷۶ برابر در برگ های گیاه نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در این پژوهش بخشی از توالی رمز کننده ژن *pepc* برای اولین بار از گیاه آلو روپوس لیتوالیس جداسازی شده و پس از بررسی بیوانفورماتیک، میزان بیان رونوشت های آن تحت تیمار شوری مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز های فیلوجنتیکی تخمینی از چگونگی اشتراق اعضای یک خانواده در طی تکامل هستند. این روابط به وسیله مطالعه جهش های جایگزینی، حذف، ازدیاد و جهش با آرایش مجدد تعیین می شود که در معرض انتخاب طبیعی می باشد (۱۱). در پژوهش حاضر به طور کلی درخت فیلوجنتیکی در سطح پروتئینی و نوکلئوتیدی نمونه های مورد نظر را به دو گروه عمده تقسیم کرد (شکل های ۱ و ۲): گروه اول عمدتاً گیاهان *C₃* مانند *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* و در گروه دوم عمدتاً گیاهان *C₄* مانند *Sorghum bicola*, *Zea mays* قرار گرفتند، به طوری که آلو روپوس لیتوالیس نیز در این دسته قرار گرفت. در هردو گروه *C₄* و گیاهان هالوفیت دیده می شوند مثلاً گیاه *C₃* و هالوفیت

گیاهان تحت تیمار آبسیزیک اسید فعالیت آنزیم PEPc افزایش می‌یابد که احتمالاً این افزایش در اثر افزایش کمیت پروتئین ایجاد شده است. بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که یکی از عوامل افزایش رونوشت در ژن مورد مطالعه افزایش هورمون اسید آبسیزیک می‌باشد.

PEPc در گیاهان C4 توسط یک فرایند فسفریلاسیون تنظیمی وابسته به نور تنظیم می‌شود (۴۳،۸،۴). که فسفریلاسیون توسط آنزیم فسفو انول پیروات کربوکسیلاز کیناز (PEPck) منجر به فعال شدن آنزیم و دفسفریلاسیون توسط آنزیم فسفریلاز باعث غیر فعال شدن آنزیم می‌شود (۵،۱۷). افزایش بسیار زیادی در فعالیت آنزیم PEPck، در برگ‌های سورگوم تیمار شده با نمک مشاهده شده است (۹). همچنین یافته‌های پیشین نشان دادند که تنش شوری فعالیت آنزیم PEPc را در *Sorghum bicolor* و *Hurdeum vulgar* افزایش می‌دهد (۱۰،۳۶) لی و جولت (۲۰) نشان دادند که نمک در گیاه *Mesembryanthemum crystallinum* فعالیت آنزیم PEPck و PEPc می‌شود.

با توجه نتایج گزارش شده می‌توان بیان داشت که افزایش فعالیت آنزیم PEPck در اثر نمک باعث افزایش فسفریله شدن و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم PEPc می‌شود و لازمه‌ی این افزایش فعالیت، افزایش کمیت پروتئین و در نتیجه افزایش بیان ژن است. البته مکانسیم پیام رسانی این اتفاق نیاز به بررسی بیشتر دارد. از طرف دیگر در سطح مولکولی، تنظیم فرا دستی به وسیله فاکتورهای رونویسی می‌تواند باعث افزایش بیان این ژن تحت تحریک شوری شود. گزارش شده است که در ذرت بخشی از بیان ژن‌های فتوستتری (از جمله *pepc*) به وسیله دو فاکتور *DOF1* و *DOF2* کنترل می‌شود. مطالعات بیان ژن نشان داد که *DOF1* یک فعال کننده و *DOF2* یک مهارکننده بیان است (۴۱). همچنین مشخص شد که *DOF1* از طریق کنش متقابل با پرموتور ژن *pepc* و افزایش فعالیت آن بیان ژن *pepc* نوع C4 را در ذرت افزایش می‌دهد. شیفر و همکاران (۳۷) رونویسی افزایش یافته ژن کدکننده ایزووفرم و پیشنهاد کردند که تنظیم فرادستی این ژن تحت تنش شوری احتمالاً به وسیله فاکتورهای رونویسی نوع MYB میانجی‌گری می‌شود.

از طرف دیگر آنزیم PEPc در چرخه فتوستتری شرکت دارد که محصول نهایی این چرخه گلوکزی است که طی گلیکولیز و چرخه کربس به انرژی تبدیل می‌شود. فروکنوز ۱۶ بی فسفات و استیل کوانزیم-A که در مراحل اولیه‌ی و انتها‌ی گلیکولیز تولید می‌شوند فعال کننده‌های الوستریک آنزیم PEPc هستند (۱۷،۲۳). پیش‌بینی می‌شود در شرایط تنش، گیاه به انرژی بیشتر نیاز دارد و در نتیجه فرایند گلیکولیز و تولید فروکنوز ۱۶ بی فسفات و استیل کوانزیم A به عنوان فعال کننده‌های الوستریک آنزیم با سرعت بیشتری انجام می‌شود. در نهایت این فعال کننده‌ها الوستریک با افزایش فعالیت آنزیم باعث آفزایش جذب CO₂ و افزایش

است. نتایج نشان دادند که تمایل کدونی در ژن‌های با سطح بیان بالا شدیدتر است و در این ژن‌ها برخی کدونی‌ها نسبت به کدون‌های دیگر ترجیح داده می‌شوند (۱۴). این مقدار می‌تواند نشان‌دهنده سطح بالای بیان این ژن و نیاز استفاده از کدون‌های پهینه در آن باشد.

همچنین میانگین شاخص تمایل کدونی و درصد GC در برخی از گونه‌های گلیکوفیت C₃ و C₄ محسابه و با شاخص تمایل کدونی *pepc* آلوروپوس لیتووالیس مقایسه گردید (جدول ۴). میانگین درصد GC و شاخص تمایل کدونی در گونه‌های گلیکوفیت C₄ و C₃ به ترتیب ۴۵/۱۶ و ۴۹/۳۳ و ۷۴/۰ به دست آمد که نشان‌دهنده آن است که شاخص تمایل کدونی ژن آلوروپوس لیتووالیس به گیاهان C₄ تزدیک‌تر است. علاوه بر این، مشاهده شد که در گونه‌های مورد بررسی با افزایش درصد GC شاخص تمایل کدونی افزایش یافته است که با نتایج پالیدور و همکاران (۲۶) مطابقت داشت. با توجه به این نتایج می‌توان اظهار داشت که *pepc* در گیاهان C₄ و آلوروپوس لیتووالیس و C₃ از جمله ژن‌های پر بیان محسوب می‌شود. اما پیش‌بینی سطح بالای بیان ایزووفرم کلروپلاستی PEPc در گونه‌های C₃ مورد انتظار نمی‌باشد که می‌توان دلیل آن را کوتاه بودن قطعه مورد بررسی دانست و پیشنهاد می‌شود که این مقایسه با استفاده از توالی‌های بلندتر انجام شود.

بر اساس نتایج بررسی بیان ژن *pepc*، افزایش بیان در سطح رونوشت در تیمار ۶۰۰ میلی‌مولا ر نسبت به شاهد مشاهده گردید. اولین مرحله در پاسخ به نمک نتیجه تاثیر نمک در خارج از گیاه (تنش اسمزی) است. فرآیندهای مولکولی و متابولیکی درگیر در این مرحله در تنش خشکی نیز انجام می‌گیرد (۲۱). در نتیجه می‌توان گفت تنش خشکی اولین پاسخ گیاه به تنش شوری است که در اثر بر هم خوردن تعادل اسمزی بین خاک و گیاه ایجاد می‌شود. اعتقاد براین است که تنش خشکی باعث افزایش میزان ABA گیاه می‌شود. در این ارتباط شواهدی وجود دارد که تأیید می‌نماید غلظت بالای نمک منجر به افزایش هورمون‌های گیاهی مثل آبسیزیک‌اسید می‌شود (۹،۲۵). افزایش غلظت ABA بافت برگ، هدر رفت آب به وسیله تعرق را از طریق بستن روزنۀ ها کم می‌کند (۳۸،۴۲) احتمالاً به علت تنش خشکی تحمیل شده به گیاه، و بسته شدن روزنۀ به علت افزایش ABA میزان CO₂ ورودی در برگ نیز کم می‌شود، در حالیکه بسته شدن روزنۀ تاثیر ناچیزی در میزان O₂ درونی دارد لذا افزایش نسبی غلظت O₂ به CO₂ باعث تحریک فعالیت اسیب‌زناری روییسکو و هدر رفت بخشی از انرژی و کربن می‌شود. گیاه با افزایش بیان ژن *pepc* در شرایط تنش سعی می‌کند تا از مقدار کم CO₂ موجود استفاده بهینه کندو فعالیت کربوکسیلازی روییسکو را حفظ کند (۵). شاهین و همکاران گزارش کردند که در پاسخ گیاه آلوروپوس لیتووالیس به تنش شوری الگوهای بیانی متفاوت مشاهده می‌شود که می‌توان آنرا به شش گروه مجازی افزایش بیان، کاهش بیان، خاموش شدن، روشن شدن، ثبات بیان و ناپایداری بیان تقسیم کرد (۳۳). نتایج مطالعه چو و همکاران (۵) نشان داد که در

رهیافت‌های مهندسی ژنتیک برای انتقال ویژگی‌های مثبت این گیاه به برخی از گیاهان استراتژیک مثل برنج، ذرت و گندم استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت‌های مالی و آزمایشگاهی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی تبرستان به انجام رسید.

سرعت فرآیند فتوستتری می‌شوند و این افزایش فعالیت با افزایش کمیت پروتئین و افزایش بیان همراه خواهد بود.

بنابراین پیشنهاد می‌شود که برای بررسی بیشتر اساس مولکولی تنظیم بیان این ژن تحت تنش شوری، نواحی تنظیمی آن در مورد مطالعه قرار گیرد. مکانیزم‌های تنظیم‌کننده بیان ژن در سطح پروتئین نیاز بررسی بیشتر دارد. در نهایت می‌توان از اطلاعات فراهم شده درباره مکانیسم‌های مولکولی مقاومت در برابر تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس در

منابع

- Amzallag, G.N., H.R. Lerner and A. Poljakoff-Mayber. 1990. Exogenous ABA as a modulator of the response of sorghum to high salinity. *Journal of Experimental Botany*, 41: 1529-1534.
- Bandyopadhyay, A., K. Datta, J. Zhang, W. Yang, S. Raychaudhuri, M. Miyao and S.K. Datta. 2007. Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica rice expressing pepc gene cloned from maize. *Plant Science*, 172: 1204-1209.
- Baroza, M.Y.K., A.G. Kakar and M. Din. 2012. The relationship between codon usage bias and salt resistant genes in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Pure and Applied Biology*, 1: 48-51.
- Chollet, R., J. Vidal and M.H. O'Leary. 1996. Phosphoenolpyruvatecarboxylase: a ubiquitous ,highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 273-298.
- Chu, C., Z. Dai, M.S.B. Ku and G.E. Edwards. 1990. Induction of crassulacean acid metabolism in facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. *Plant Physiol*, 98-3: 1253-1266.
- DaSilva, J.M. and M.C. Arrabaca. 2004. Photosynthetic enzymes of C₄ grass *Seteria sphacelata* under water stress: a comparison between rapid and slowly imposed water deficit. *Photosynthetica*, 42: 43-47.
- Doubnerova, V. and H. Ryslava. 2011. What can enzymes of C₄ photosynthesis do for C₃ plants under stress? *Plant Science*, 180: 575-583.
- Echevarri'a, C., J. Vidal, J. A. Jiao and R. Chollet. 1990. Reversible light activation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase in maize leaves. *FEBS Letter*, 275: 25-28.
- Echevarri'a, C., S. Garcí'a-Maurin, O.R. Alvarez, A. Soler and J. Vidal. 2001. Salt stress increases the Ca²⁺-independent phosphoenolpyruvatecarboxylase kinase activity in Sorghum plants. *Planta*, 214: 283-287.
- Epstein, E. 1972. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. Wiley and Sons, New York.
- Golovnina, K.A., S.A. Glushkov, A.G. Blinov, L.R. Adkison and N.P. Goncharov. 2007. Molecular phylogeny of the genus *Triticum*. *Plant Systematics and Evolution*, 264: 195-216.
- Gonzalez, M.C., R. Sanchez and F.J. Cejudo. 2003. Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta*, 216: 985-992.
- Hall, T. 1999. BioEdit computer program, version 7.0.9, Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad CA. Available from: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Harrison, R.J. and B. Charlesworth. 2011. Biased gene conversion affects patterns of codon usage and amino acid usage in the *Saccharomyces* sensu stricto group of yeasts. *Molecular biology and evolution*, 28: 117-129.
- Izui, K., H. Matsumura, T. Furumoto and Y. Kai. 2004. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu. Rev. Plant Biology*, 55: 69-84.
- Izui, K., M. Taguchi and H. Katsuki. 1980. Regulation of *Escherichia coli* Morikawa phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors *in vivo*. Estimation of the activities in the cells grown on various compounds. *Journal of Biochemistry*, 87(2): 441-449.
- Kai, Y., M. Yasushi, M. Hiroyoshi and I. Katsura. 2003. "Phosphoenolpyruvate carboxylase: threedimensionalstructure and molecular mechanisms". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414 (2): 170-179.
- Kai, Y., M. Hiroyoshi, T. Inoue, K. Terada, Y. Nagara, T. Yoshinaga, A. Kihara, K. Tsumura and K. Izui. 1999. "Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for allostericinhibition". *Proceedings of the National Academyof Sciences*, 96(3): 823-828.
- Leegood Richard, C. 2013. Strategies for engineering C4 photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 170: 378-388.
- Li, B. and R. Chollet. 1994. Salt induction and the partial purification/ characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase protein serinekinase from an inducible crassulacean-acid-metabolism (CAM) plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 307: 416-419.
- Manns, R., R.A. James and A. Lauchi. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance in wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1025-1043.
- Mohseni, A., Gh.A. Nematizadeh, A. Dehestani Kelagari, B. Shahin Kaleybar and E. Soleimani. 2016. Cloning and bioinformatics analysis of MDHAR gene from *Aeluropus littoralis* and over-expression analysis in *Nicotina Tabacum*. *Journal of Crop Breeding*, 8: 219-230 (In Persian).

- ۷۷
23. Morikawa, M., K. Izui, M. Taguchi and H. Katsuki. 1980. Regulation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors *in vivo*. Estimation of the activities in the cells grown on various compounds. *Journal of Biochemistry*, 87(2): 441-449.
 24. Naghavi, M.R., M.A. Malboobi and S. Rashidi. 2009. *Bioinformatics*. University of Tehran Press, (In Persian).
 25. Nilsen, E.T. and D.M. Orcutt. 1996. *The physiology of plants under stress: abiotic factors*. Wiley, New York.
 26. Palidwor, G.A., T.J. Perkins and X. Xia. 2010. A general model of codon bias due to GC mutational bias. *PLoS One*, 5(10): e13431.
 27. Paulus, J.K., D. Schlieper and G. Groth. 2013. Greater efficiency of photosynthetic carbonfixation due to single amino-acid substitution. *Nature Communications*, (2): 1518.
 28. Pfaffle, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. Chapter 3 pages 87 - 112 in: A-Z of quantitative PCR (Editor: S.A. Bustin) International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA publication.
 29. Piotr, Ch. and N. Sacchi. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1: 581-585
 30. Poustini, K. and D. A. Baker. 1994. Photosynthetic responses of two wheat cultivars to salinity. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 25(1): 61-69 (In Persian).
 31. Puigbo, P., I.G. Bravo and S. Garcia-Vallve. 2008. E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinformatics*, 9:65.
 32. Sage, R.F. 2004. The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytol.*, 161: 341-70.
 33. Shahin Kaleybar, B., Gh.A. Nematzadeh, S.H.R. Hashemi, H. Askari and S. Kabirnataj. 2012. Physiological and Genetic Responses of Halophyte *Aeluropus Littoralis* to Salinity. *Journal of Crop Breeding*, 5: 15-29 (In Persian).
 34. Sánchez, R., A. Flores and F.J. Cejudo. 2006. *Arabidopsis* phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta*, 223: 901-909.
 35. Sánchez, R. and F.J. Cejudo. 2003. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 132: 949-957.
 36. Sankhla, N. and W. Huber. 1974. Regulation of balance between C3 and C4 pathway: role of abscisic acid. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 74: 267-271
 37. Schaeffer, H.J., N.R. Forsthoefel and J.C. Cushman. 1995. Identification of enhancer and silencer regions involved in salt-responsive expression of crassulacean acid metabolism (CAM) genes in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Molecular Biology*, 28: 205-218
 38. Schroeder, J.I., J.M. Kwak and G.J. Allen. 2001. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410: 327-330.
 39. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
 40. Tcherkez G.G.B., G.D. Farquhar and T.J. Andrews. 2006. Despite slow catalysis and confused substratespecificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectlyoptimized. *Proc. Natl. Acad. Science, USA*, 103: 7246-51.
 41. Tian, C., Q. Jiang, F. Wang, G. Wang, Z. Xu and Ai. Xiong. 2015. Selection of Suitable Reference Genes for qPCR Normalization under Abiotic Stresses and Hormone Stimuli in Carrot Leaves. *Plos One*, 10(2): e0117569.
 42. Turner, N.C., G.C. Wright and K.H.M. Siddique. 2001. Adaptation of grain legumes (pulse) to water-limited environments. *Advances in agronomy*, 71: 193-231
 43. Vidal, J., J.N. Pierre and C. Echevarri'a. 1996. The regulatory phosphorylation of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase: a cardinal event in C4 photosynthesis. In: Verma DPS (ed) *Signal transduction in plant and development*. Springer, Berlin HeidelbergNew York, pp: 141-166.
 44. Yanagisawa, S. and J. Sheen. 1998. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell*, 10: 75-89.

Isolation and Gene Expression Investigation in Photosynthetic Isoform of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene in Halophytic Grass *Aeluropus Littoralis* under Salinity Stress

Elham Younesi-Melerdi¹, Ghorban Ali Nematzadeh² and Ehsan Shokri³

1- M.Sc. In Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran
2- Profesoore, In Plant Genetics, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari

Agricultural Sciences and Natural Resources University, (SANRU), Sari, Iran

3- PhD. In Nanobiotechnology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan,

Received: August 14, 2015

Accepted: February 6, 2016

Abstract

C₄ plants have very high photosynthetic efficiency under drought stress due to lower water usage and do not require the opening and closing of stomata. This advantage has been created by complementary mechanisms of primary carboxylation in leaves mesophilic cells. In species which are initial carboxylation of mesophilic CO₂ during C₄ photosynthesis and crassulacean acid metabolism done, the PEPC enzyme catalyses the irreversible reaction of phosphoenolpyruvate in the presence of bicarbonate ions to produce oxaloacetate. The aim of the present study was to partial isolation of *pepc* coding sequence from halophytic grass *Aeluropus littoralis*, studying codon bias pattern and also quantitative analysis of its expression in 0 (control) and 600 mM NaCl relative to beta actin gene expression as internal control using Real-time PCR. As a result, a 678 bp fragment of *pepc* gene coding sequence was isolated and registered in NCBI gene bank under KP122945 accession number. The isolated fragment showed highest homology (in protein level) with *Eragrostis minor* and *Zoysia japonica* species and its CAI index was estimated 0.82. Finally, the quantitative analysis of gene expression under 600 mM salt stress showed that the level of *pepc* gene transcription was increased about 3 times (compared to control) in response to stress.

Keywords: *Aeluropus littoralis*, Codon bias, Gene expression, Phosphoenolpyruvate carboxylase, Salinity stress