دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

جداسازی و بررسی بیان ایزوفرم فتوسنتزی ژن فسفوانول پیروات کربوکسیلاز در گیاه شورزیست آلوروپوس 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 نانوبیوتکنولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی تبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
(نویسنده مسوول: 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 می‌کند. آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPc) واکنش برگشت ناپذیز فسفو انول پیروات را در حضور یون بی کربنات به منظور تولید اگزالو استات در گونه‌هایی کاتالیز می‌کند که در آنها کربو کسیلاسیون اولیه CO_2 مزوفیلی در طول فتوسنتزC4 و متابولیسم اسید کراسولاسه انجام می‌شود. در پژوهش حاضر بخشی از توالی کد شونده (CDS) ژن *pepc* در گیاه شورزیست چمن شور ساحلی یا برت با نام علمی *آلوروپوس لیتورالیس* با طول ۶۷۸ جفت باز جداسازی و با شماره دسترسی KP122945 (EC:4.1.1.31) در بانک ژن NCBI ثبت شد، سپس الگوی تمایل کدونی و آنالیز کمی بیان آن در غلظت‌های شاهد (۰) و ۶۰۰ میلی‌مولار 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 گونه‌های *Eragrostis minor* و *Zoysia japonica* 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 فتوسنتزی *pepc* به عنوان یکی از مکانیسم‌های ایجاد مقاومت به تنش شوری در گیاه *آلوروپوس لیتورالیس* پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلوروپوس لیتورالیس، فسفوانول پیروات کربوکسیلاز، تنش شوری، بیان ژن، تمایل کدنی

مقدمه

یکی از مهم‌ترین چالش‌هایی که کشاورزی دنیا با آن روبرو است وجود و گسترش خاک‌های شور و شور شدن خاک‌های زراعی موجود می‌باشد (۳۰). علاوه بر این گرم شدن فزآینده کره زمین نیز از مشکلات عمده کشاورزی به شمار می‌رود. بررسی مولکولی گیاهان مقاوم به شوری و گرما کمک زیادی به درک مکانیسم مقاومت در این گیاهان می‌کند. بنابراین می‌توان از این مکانیسم‌ها برای انتقال به گیاهان زراعی و بهبود مقاومت در برابر تنش‌های زیستی استفاده نمود. گیاه چمن‌شور ساحلی یا *آلوروپوس لیتورالیس* یک هالوفیت چند ساله ریزوم‌دار تک‌لپه‌ای با سیستم فتوسنتزی C_4 و بومی ایران می‌باشد، که می‌تواند شوری (NaCl) را تا سطح بالاتر از۶۰۰ میلی‌مولار تحمل کند (۲۲). علاوه بر شورزی بودن، سیستم فتوسنتزی C_4 این گیاه نیز یکی از دلایل مقاومت بیشتر آن در برابر تنش های شوری و خشکی است. گیاهان دارای سه تیپ فتوسنتزی C_3، C_4 و CAM هستند به طوری که اکثر گیاهان و عمده گیاهان زراعی جزء گیاهان C_3 بوده و بخش کوچک‌تری به گیاهان C_4 تعلق دارند. فتوسنتز C_3 در شرایط دمایی بالا یک پروسه ناکارآمد است زیرا آنزیم روبیسکو که در قلب چرخه کالوین قرار داشته تثبیت CO_2 را انجام می‌دهد و در دمای بالا بسیار ناکارآمد خواهد شد (۱۹) اما در مقابل مهم‌ترین مزیت گیاهان C_4 این است که غلظت CO_2 را در سلول‌های کرانز تا حدی افزایش می‌دهند که از طریق یک مکانیسم کمکی (تبدیل CO_2 به بی‌کربنات در سلول‌های مزوفیل به وسیله‌ی کربونیک‌آنهیدراز) مانع از اکسیژنه شدن آنزیم روبیسکو در مناطق گرم می‌شود (۳۲). بنابراین گیاهان C_4 با مصرف آب کمتر و عدم نیاز به باز و بسته شدن زیاد روزنه‌ها در شرایط کم آبی کارآیی فتوسنتزی بسیار بالایی دارند (۳۲).

تثبیت اولیه CO_2 به وسیله‌ی آنزیم فسفوانول پیروات‌کربوکسیلاز (PEPc)[۱] (EC= 4.1.1.31) با استفاده از فسفوانول‌پیروات (*PEP*) به عنوان گیرنده‌ی CO_2 انجام می‌شود و در نتیجه یک ترکیب چهار کربنه به نام اگزالواستات تولید می‌شود که نام این مسیر متابولیکی بر همین اساس انتخاب شده است. PEPc یک آنزیم سیتوزولی است که در گیاهان آلی و همچنین در باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های سبز یافت می‌شود (۴،۱۵،۳۴). نقش اصلی و شناخته شده این آنزیم کربوکسیلاسیون اولیه CO_2 مزوفیلی در طول فتوسنتز C_4 و متابولیسم اسیدکراسولاسه است. همچنین این آنزیم در فرآیندهای غیرفتوسنتزی مانند تقسیم‌بندی کربن و نیتروژن در برگ‌های C_3 شکل‌گیری بذر، جوانه‌زنی 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 آنزیم‌های PEPc، PPDK و NADP-ME در گیاهان تحت تنش‌های مختلف غیرزیستی نظیر خشکی، شوری، اوزون، عدم وجود فسفات و آهن و یا حضور فلزات

1- Phosphoenolpyruvate carboxylase

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]

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 هترولوگ 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 فتوسنتز 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 هست.

از جمله راهبردهای تعریف شده در مسیر انقلاب سبز، شناسایی ویژگی‌های مثبت گیاهان هالوفیت نسبت به گلیکوفیت‌ها و انتقال ویژگی‌های مثبت گیاهان C_4 به گیاهان C_3 می‌باشد. به همین منظور استفاده از گیاه آلوروپوس لیتورالیس[1] 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 فتوسنتزی *pepc*، مطالعه الگوی تمایل کدنی و بررسی تغییرات کمی بیان رونوشت‌های این ژن تحت تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس با کمک روش Real-Time PCR بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های گیاهی و سنتز cDNA

بذور گیاه *آلوروپوس 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) و۶۰۰ میلی‌مولار 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 میلی‌مولار در هر نوبت با فاصله زمانی یک روز در میان آبیاری شدند. پس از ۱۰روز بعد از اعمال تنش نمونه‌گیری از برگ‌های بالغ و میانی گیاهان انجام شد.

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

طراحی آغازگرها

از آن جایی که جداسازی توالی کد شونده ژن اخیر در آلوروپوس لیتورالیس برای اولین بار انجام می‌شد، اطلاعات و توالی ژنی این جایگاه در بانک ژن موجود نبود. بنابراین پس از شناسایی ایزوفرم فتوسنتزی ژن مورد نظر در بانک ژن، توالی‌های CDS[2] آن در گونه‌های با قرابت نزدیک مانند *Sorghum bicolor*، *Zea mays*، *Hordeum vulgare*، *Saccharum officinarum*،*Oryza* sativa انتخاب شده و پس از همردیفی 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 وشرایط مناسب طراحی شدند. طول قطعه تکثیر ۹۰ جفت 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 *ACTIN* و *TUB* پایدارترین ژن‌ها در تنش‌های مختلف گرمایی، سرمایی، شوری و خشکی هستند.

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

به منظور تکثیر توالی ژن مورد نظر، ازcDNA سنتز شده و آغازگرهای رفت و برگشت (ISO) در واکنش PCR استفاده شد. چرخه‌های حرارتی PCR شامل واسرشته‌سازی آغازین: ۹۵ درجه (۳ دقیقه) ، ۳۵ چرخه شامل: ۹۴ درجه (۴۵ ثانیه)، دمای اتصال آغازگر (۴۵ ثانیه)، ۷۲ درجه (۱ دقیقه) و بسط نهایی در 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 الکترفورز گردید قطعه مورد نظر از روی ژل بریده وپس از خالص‌سازی طبق دستورالعمل کیت High pure pcr product- Roche، تیوپ حاوی قطعات باندهای توالی مورد نظر برای توالی یابی دو طرفه با آغازگرهای رفت و برگشت ارسال گردید.

1- *Aeluropus littoralis*

2- Coding DNA sequence

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای جداسازی و بررسی بیان ژن *pepc* در گیاه آلوروپوس لیتورالیس
Table 1. Sequence of primers used for isolation and *pepc* gene expression assay in *Aeluropus littoralis* plant

نوع آغازگر	ژن	توالی (۳'.....۵')	طول قطعه (bp)	دمای اتصال
ایزولاسیون (ISO)	*pepc*	F-CTTCGGCCCSTACATCATCTC R-GACAY*CTGAAGAAK**GGCCACTC	۸۹۷	۶۶
بیان ژن (GE)	*pepc*	F- GTCCGAGTACCCGACCATG R- GTGGTGCCGCTGTTCGAGA	۹۰	۵۹
رفرنس (RE)	*β-actin*	F- GTCCGAGTACCCGACCATG R- GTGGTGCCGCTGTTCGAGA	۹۰	۵۹

*: حرف Y نشان‌دهنده ی باز های T یا C است.
**: حرف K نشان‌دهنده ی باز های T یا G است.

بعد از توالی‌یابی، 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 همردیفی توالی شناسایی شده با برخی از گونه‌های گلیکوفیت C_4 و C_3، نواحی همپوشان از هر گونه انتخاب گردید و سپس با استفاده از ابزار CAIcalculater 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 فیلوژنتیک رابطه خویشاوندی توالی رمزکننده *pepc* آلوروپوس لیتورالیس با تعدادی از گیاهان C_4 و C_3 و CAM مورد ارزیابی قرار گرفت. برای رسم درخت فیلوژنیک ابتدا توالی‌ها به وسیله برنامه clustalw نرم‌افزار Mega4 همردیف شدند و سپس درخت فیلوژنتیک برای آن‌ها با روش اتصال مجاور (Neighborjoining) ترسیم شد. به منظور تایید اعتبار درخت فیلوژنیک ترسیم شده از الگوریتم Boosstrap با ۱۰۰۰تکرار 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 صحت توالی و دمای اتصال آغازگرهای طراحی شده و تعیین دقیق شرایط تکثیر بهینه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه PCR معمولی انجام شد. برای انجام مراحل Real time PCR از مخلوط واکنش SYBERGreen 1 شرکت فرمنتاز در حجم ۱۵ میکرولیتر و در حضور ژن β-actinmRNA به عنوان 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 مثبت اختصاص داده شد. چرخه‌های حرارتی PCR شامل واسرشته‌سازی آغازین ۹۵ درجه (۱۵ دقیقه)، ۴۰ چرخه شامل ۹۵درجه (۱۵ ثانیه)، دمای اتصال آغازگر ۵۹ درجه (۳۰ ثانیه)، ۷۲ درجه (۳۰ ثانیه) و بسط نهایی 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):

$$\text{Ratio}= (E_{target})^{\Delta CP}{}_{target}(\text{control-sample})/ (E_{ref})^{\Delta CP}{}_{ref}(\text{control} - \text{sample}) \quad (۱)$$

نتایج و بحث

توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل بخشی از ناحیه رمز کننده 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 تایید 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 *Eragrostis minor* و *Chloris gayana* و در سطح پروتئینی به ترتیب ۹۹٪ و ۹۷٪ با گونه‌های *Eragrosti minor* و *Zoysia japonica* دارد.

جدول ۲- نتایج بلاست توالی نوکلئوتیدی قطعه‌ی ژنی *pepc*
Table 2. Blast results of nucleotide sequence of *pepc* gene fragment

درصد همسانی	ارزش E	میزان پوشش	نام گونه	شماره دسترسی
٪۹۶	0	٪۱۰۰	*Eragrostis minor*	AM690222.1
٪۹۳	0	٪۱۰۰	*Chloris gayana*	AF268091.1
٪۸۸	0	٪۹۹	*Zea mays*	NM_001161348.1
٪۷۳	1.00E-111	٪۹۹	*Oryza sativa Japonica*	AF271995.1
٪۷۲	1.00E-99	٪۹۹	*Arabidopsis thaliana*	AY210895.1
٪۶۹	6.00E-71	٪۹۹	*Glycine max*	NM_001250465.1

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]
[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]

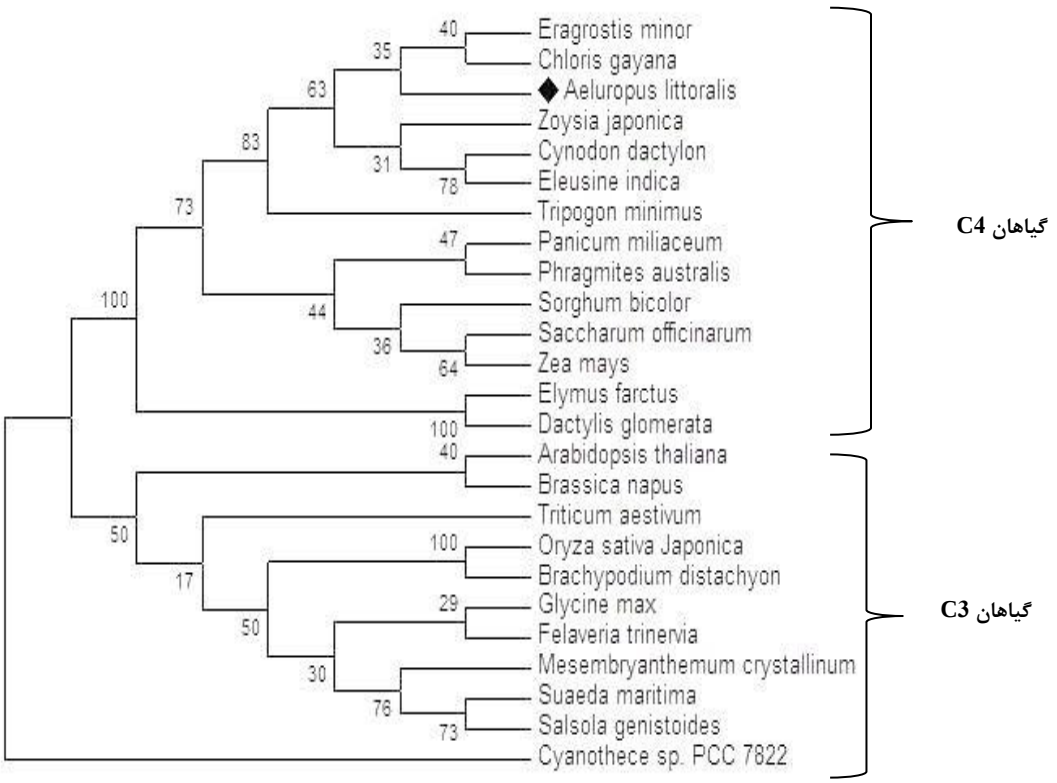
جدول ۳- نتایج بلاست توالی پروتئینی قطعه‌ی ژنی *pepc*

Table 3. Blast results of protein sequence of *pepc* gene fragment

شماره دسترسی	نام گونه	میزان پوشش	ارزش E	درصدهمسانی
CAM84059.1	*Eragrostis minor*	٪۱۰۰	4.00E-164	٪۹۹
CAM84149.1	*Zooysia japnica*	٪۱۰۰	9.00E-161	٪۹۷
CAD60555.1	*Zea mays*	٪۱۰۰	4.00E-133	٪۸۸
P15804.2	*Sorghum bicolor*	٪۱۰۰	5.00E-134	٪۸۹
AAG00180.1	*Oryza sativa Japonica*	٪۱۰۰	3.00E-128	٪۸۳
NP_001237394.1	*Glycine max*	٪۹۹	1.00E-126	٪۸۲
NP_175738.1	*Arabidopsis thaliana*	٪۹۹	7.00E-126	٪۸۲

به منظور تعیین روابط خویشاوندی این قطعه ژنی، درخت فیلوژنی، براساس توالی پروتئینی و نوکلئوتیدی بدست آمده و در مقایسه با برخی گونه های گیاهی دیگر موجود در پایگاه داده‌ها ترسیم شد. نتایج گروه بندی براساس توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی به ترتیب در شکل ۱ و شکل ۲ نشان داد که، توالی رمزکننده *pepc* آلوروپوس لیتورالیس قرابت نزدیکی با *pepc* دو گونه *Chloris gayana* و *Eragrostis minor* *دارد و در سطح* پروتئینی PEPc آلوروپوس لیتورالیس قرابت نزدیکی با توالی *پروتئینی گونه‌های Sporobolus anglicus, Eragrostis capensis, Eragrostis minor* نشان داد.

پس از تجزیه و تحلیل تمایل کدونی با استفاده از ابزار CAIcalculator (۲۹) میزان GC توالی جداسازی شده ۶۴/۶ درصد، GC در نوکلئوتید سوم کدون‌های توالی ۸۹ درصد و شاخص تمایل کدونی نیز برابر ۰/۸۲ بدست آمد (جدول ۴). همچنین شاخص تمایل کدونی و در صد GC در برخی از گونه‌های گلیکوفیت C_4 , C_3 محاسبه و با شاخص تمایل کدونی *pepc* آلوروپوس لیتورالیس مقایسه گردید. میانگین شاخص تمایل کدونی در گلیکوفیت‌های C_4 ۰/۸۸ و در گلیکوفیت‌های C3 ۰/۷۴ بدست آمد (جدول ۴).

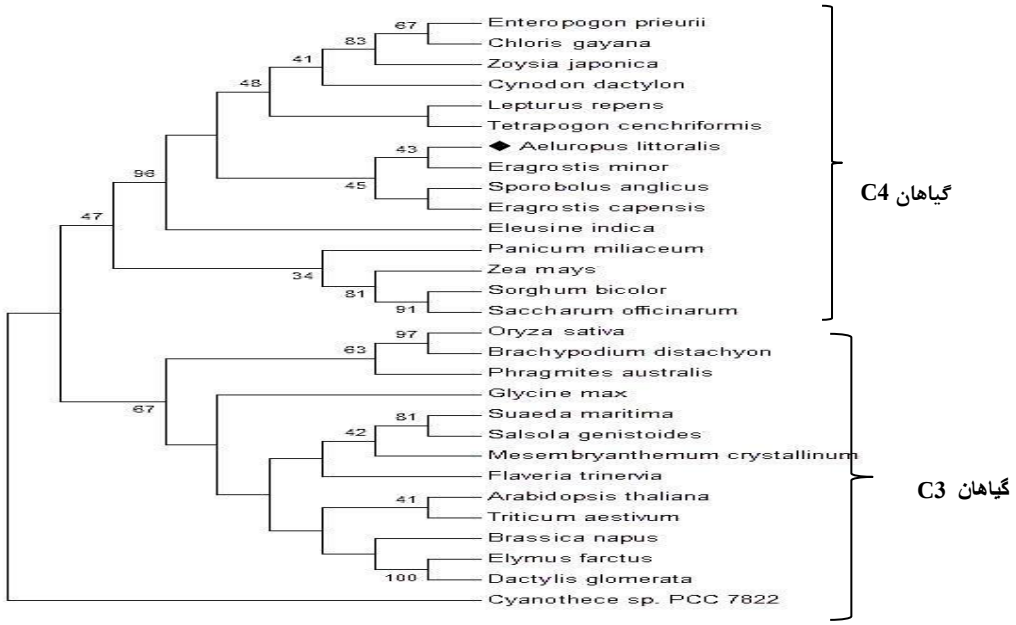


شکل ۱- مقایسه قرابت توالی نوکلئوتیدی *pepc* آلوروپوس لیتورالیس و سایر گونه‌ها. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 و روش اتصال مجاور(neighborjoining) ترسیم شد. و پارامتر تکرار در ترسیم ۱۰۰۰ در نظر گرفته شد.

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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]



شکل ۲- مقایسه قرابت توالی پروتئینی PEPc آلوروپوس لیتورالیس و سایر گونه‌ها. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 و روش اتصال مجاور (neighborjoining) ترسیم شد. وپارامتر 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 ی 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]
Aeluropus littoralis	۶۴/۶	۶۱/۵	۴۵/۹	۸۹	۰/۸۲۲
Sorghum bicolar	۶۴/۵	۶۰/۵	۴۲/۸	۹۳/۵	۰/۸۹۵
Saccharum officinarum	۶۴/۶	۶۱/۴	۴۲/۸	۹۳	۰/۸۶۷
Zea mays	۶۴/۴	۶۳	۴۵/۸	۹۴	۰/۸۷۸
C4 (mean)	۶۵/۱۶	۶۱/۶۳	۴۳/۸	۹۳/۵	۰/۸۸
Oryza sativa	۵۴/۶	۷۲/۰	۵۱/۶	۹۳/۸	۰/۷
Arabidopsis	۴۸/۶	۵۹/۳	۴۲/۶	۴۴/۴	۰/۷۴
Glycine max	۴۶	۶۱/۶	۴۴/۴	۳۱/۹	۰/۷۸۵
C3 (mean)	۴۹/۷۳	۶۴/۳	۴۶/۲	۳۸/۷	۰/۷۴۱

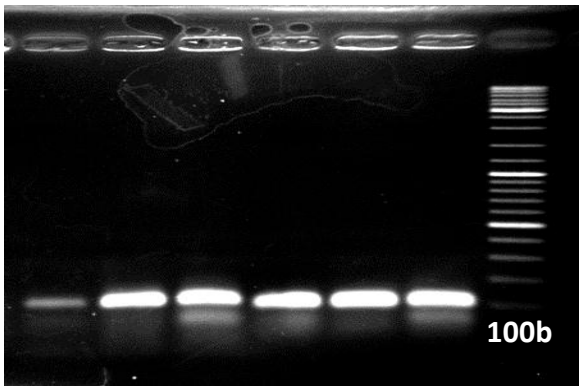
۱: درصد GC کل، ۲: درصد GC در نوکلئوتید اول کدون، ۳: درصد GC در نوکلئوتید دوم کدون، ۴: درصد GC در نوکلئوتید سوم کدون، ۵: شاخص تمایل کدونی

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

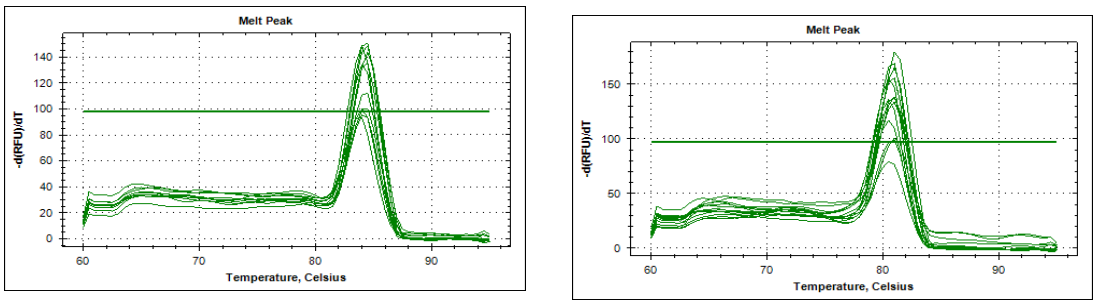
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]



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

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



شکل ۴- آنالیز 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 سانتی‌گراد است.

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

در نهایت بررسی میزان تغییر در بیان ژن تحت تیمار با شوری نشان داد که اعمال تنش (غلظت نمک ۶۰۰ میلی‌مولار)، باعث افزایش بیان ژن *pepc* به میزان ۲/۷۶ برابر در برگ‌های گیاه نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در این پژوهش بخشی از توالی رمزکننده ژن *pepc* برای اولین بار از گیاه آلوروپوس لیتورالیس جداسازی شده و پس از بررسی بیوانفورماتیک، میزان بیان رونوشت‌های آن تحت تیمار شوری مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزهای فیلوژنتیکی تخمینی از چگونگی اشتقاق اعضای یک خانواده در طی تکامل هستند. این روابط به وسیله مطالعه جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد و جهش با آرایش مجدد تعیین می‌شود که در معرض انتخاب طبیعی می باشد (۱۱). در پژوهش حاضر به طور کلی درخت فیلوژنتیکی در سطح پروتئینی و نوکلئوتیدی نمونه‌های مورد نظر را به دو گروه عمده تقسیم کرد (شکل‌های ۱ و ۲): گروه اول عمدتاً گیاهان C_3 مانند *Triticum aestivum*، *Oryza sativa* و در گروه دوم عمدتا گیاهان C_4 مانند *Zea mays*، *Sorghum bicola* قرار گرفتند، به طوری که *pepc* آلوروپوس لیتورالیس نیز در این دسته قرار گرفت. در هردو گروه C_4 و C_3 گیاهان هالوفیت دیده می‌شوند مثلا گیاه C_3 و هالوفیت *Phragmites australis* در گروه اول و گیاه C_4 و هالوفیت *Eragrostis minor* در گروه دوم و در ارتباط تکاملی بسیار نزدیک با آلوروپوس قرار گرفته اند. در سطح نوکلئوتیدی آلوروپوس نزدیکترین رابطه تکاملی را با گیاهان C_4 و هالوفیت *Eragrostis minor* و *Chloris gayan* نشان می‌دهد. ولی در سطح پروتئینی همچنان رابطه تکاملی خود را با گونه‌ی *Eragrostis minor* حفظ می‌کند ولی از گونه‌ی *Chloris gayan* فاصله می‌گیرد. با توجه به نتایج حاصل از بلاست پروتئینی و نوکلئوتیدی و همچنین ترسیم درخت فیلوژنتیک و با در نظر داشتن آنکه *PEPc* یک آنزیم فتوسنتزی است می‌توان پیش‌بینی کرد که در الویت اول تکاملی، نوع چرخه فتوسنتزی تعیین‌کننده هموژوئی توالی‌هاست.

وجود کدون‌های مترادف، روش کنترلی ژنوم برای تخفیف و خنثی کردن اثرات جهش‌های نقطه‌ای و تنظیم بیان ژن می‌باشد. کدون‌های مترادف در ژنوم گونه‌های مختلف و هم در بین ژن‌های ژنوم یک موجود با فراوانی متفاوتی استفاده می‌شوند، که به این پدیده تمایل کدونی[1] اطلاق می‌شود. نتایج تجزیه و تحلیل تمایل کدنی قطعه‌ی ژنی *pepc* با استفاده از ابزار CAIcalculator، در جدول ۴ نشان داده شده

1- Codon bias

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]

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

همچنین میانگین شاخص تمایل کدونی و درصد GC در برخی از گونه‌های گلیکوفیت C_3 و C_4 محاسبه و با شاخص تمایل کدونی *pepc* آلوروپوس لیتورالیس مقایسه گردید (جدول ۴). میانگین درصد GC و شاخص تمایل کدونی در گونه‌های گلیکوفیت C_4 و C_3 به ترتیب ۶۵/۱۶، ۰/۸۸ و ۴۹/۷۳ و ۰/۷۴ به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی آن است که شاخص تمایل کدونی ژن *pepc* آلوروپوس لیتورالیس به گیاهان C_4 نزدیک‌تر 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 C_4 و آلوروپوس لیتورالیس و C_3 از جمله ژن‌های پر بیان محسوب می‌شود. اما پیش‌بینی سطح بالای بیان ایزوفرم کلروپلاستی PEPc در گونه‌های C_3 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 میلی‌مولار 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 تائید 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 روزنه ها کم می‌کند (۳۸،۴۲) احتمالاً به علت تنش خشکی تحمیل شده به گیاه، و بسته شدن روزنه به علت افزایش ABA میزان CO_2 ورودی در برگ نیز کم می‌شود، در حالیکه بسته شدن روزنه‌ها تاثیر ناچیزی در میزان O_2 درونی دارد لذا افزایش نسبی غلظت O_2 به CO2 باعث تحریک فعالیت اکسیژنازی روبیسکو 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 روبیسکو را حفظ کند (۵). شاهین و همکاران گزارش کردند که در پاسخ گیاه آلوروپوس لیتورالیس به تنش شوری الگوهای بیانی متفاوت مشاهده می‌شود که می توان آنرا به شش گروه مجزای 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 گیاهان تحت تیمار آبسیزیک اسید فعالیت آنزیم PEPc افزایش می‌یابد که احتمالاً این افزایش در اثر افزایش کمیت پروتئین ایجاد شده است. بنابراین می توان 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 bicolar* و *Hurdeum vulgar* افزایش می دهد (۱،۳۶) لی و چولت (۲۰) نشان دادند که نمک در گیاه *Mesembryanthemum crystallinum* منجر به افزایش فعالیت هر دو آنزیم PEPc و PEPck 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. ازطرف 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 فتوسنتزی (از جمله *pepc*) به وسیله دو فاکتور DOF1 و DOF2 کنترل می شود. 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 پروموتور 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 ایزوفرم ویژه CAM آنزیم PEPc را تحت تنش شوری گزارش کرده 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 فتوسنتزی شرکت دارد که محصول نهایی این چرخه گلوگزی است که طی گلیکولیز و چرخه کربس به انرژی تبدیل می‌شود. فروکتوز ۱و۶ بی فسفات و استیل کوآنزیم–A که در مراحل اولیه‌ی و انتهایی 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 فروکتوز ۱و۶ بی فسفات و استیل کوآنزیم A به عنوان فعال کننده های الوستریک آنزیم با سرعت بیشتری انجام می شود. در نهایت این فعال‌کننده‌ها الوستریک با افزایش فعالیت آنزیم باعث آفزایش جذب CO_2 و افزایش

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]

سرعت فرآیند فتوسنتزی 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 کنش‌های سیس–ترانس و نقش عناصر تنظیمی مورد مطالعه قرار گیرد. مکانیزم‌های تنظیم‌کننده بیان ژن درسطح 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 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.

منابع

1. 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
2. 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.
3. Barozai, 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.
4. 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.
5. Chu, C., Z. Dai, M.S.B. Ku and G.E. Edwards. 1990. Induction of crassulacean acid metabolism in facultative halophyte Mesembryanthemum crystallinum by absisic acid. Plant Physiol, 98-3: 1253-1266.
6. DaSilva, J.M. and M.C. Arrabaca. 2004. Photosynthetic enzymes of C_4 grass Seteria sphacelata under water stress: a comparison between rapid and slowly imposed water deficit. *Photosynthetica*, 42: 43–47.
7. Doubnerova, V. and H. Ryslava. 2011. What can enzymes of C_4 photosynthesis do for C_3 plants under stress? Plant Science, 180: 575-583.
8. Echevarrı´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.
9. Echevarrı´a, C., S. Garcı´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.
10. Epstein, E. 1972. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. Wiley and Sons, New York.
11. Golovnina, K.A., S.A. Glushkov, A.G. Blinov, L.R. Adkison and N.P. Goncharov. 2007. Molecula phylogeny of the genus *Triticum.* Plant Systematics and *Evolution*, 264: 195-216.
12. 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.
13. 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
14. 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.
15. Izui, K., H. Matsumura, T. Furumoto and Y. Kai. 2004. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a newera of structural biology. Annu. Rev. Plant *Biology*, 55: 69-84
16. Izui, K., M. Taguchi and H. Katsuki. 1980. Regulation of Escherichia Morikaw 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.
17. 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.
18. 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.
19. Leegood Richard, C. 2013. Strategies for engineering C4 photosynthesis. Journal of Plant Physiology, 170: 378-388.
20. 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.
21. Manns, R., R.A. James and A. Lauchi. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance in wheat and other cereals. Journal of Exprimental Botany, 57: 1025-1043.
22. Mohseni, A., Gh.A. Nematzadeh, 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).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]

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. Chaper 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 *(*pulses) to water-limited environments. Advances in agronomy, 71: 193-231
43. Vidal, J., J.N. Pierre and C. Echevarrı´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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]

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

Elham Younesi-Melerdi[1], Ghorban Ali Nematzadeh[2] and Ehsan Shokri[3]

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 Nanbiotechnology, 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.69]