



## "مقاله پژوهشی"

# شناسایی رونوشت‌های با بیان افتراقی در گندم نان تحت تنش شوری با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP

شینم کامیاب<sup>۱</sup>, خلیل عالمی سعید<sup>۲\*</sup>, محمدرضا اصلاحی<sup>۳</sup> و محمد مرادی<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و بهنراثی گیاهی، دانشکده کشاورزی آزاد اهواز، اهواز، ایران  
۲- دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران،  
(نویسنده مسؤول: kh\_alamisaeid@asnrukh.ac.ir)  
۳- استادیار، گروه گیاه‌پژوهی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، سازمان تحقیقات، تربیج و آموزش کشاورزی، اهواز، ایران  
۴- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، واحد شوستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱۴  
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۱

صفحه: ۴۱ تا ۵۱

## چکیده

شوری یکی از مهمترین شرایط نامطلوب محیطی است که منجر به از بین رفتن بخشی از عملکرد گندم می‌شود. لذا شناخت ژن‌هایی با بیان افتراقی و آگاهی از عملکرد آنها در گندم برای افزایش مقاومت به شوری ضروری است. برای تعیین ژن‌های پاسخ دهنده به شوری، ترانسکرپتوم گندم شاهد و تحت تنش از طریق تکنیک cDNA-AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. بر مبنای مشاهدات ما، ۳۱ قطعه حاصل از ترانسکرپت (TDF) با موقوفیت توالی‌یابی شدند. بیشتر TDF‌های شناخته شده به کمک جستجوی BLASTX، متعلق به ژن‌های در گروه‌های مختلف عملکردی مانند انتقال، تجزیه پروتئین، تنظیم رونویسی، انتقال سیگنال، دفاع سلول، انرژی و متابولیسم بودند. تکنیک PCR زمان‌واقعی نشان داد که بیان چهار TDF کم شد در حالیکه بیان ۱۸ TPF افزایش یافت. به طور کلی، این یافته‌ها در ک ما از مکانیزم‌های سلولی دخیل در پاسخ گندم به شوری خاک را ارتقاء بخشید. علاوه بر این، شناسایی ژن‌های جدید پاسخ‌دهنده به تنش شوری اطلاعات مفیدی برای کمک به بهبود تحمل گندم به این تنش را در مزرعه ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: تنش غیرزیستی ژن‌های پاسخ‌دهنده به شوری، غلات، فاکتورهای رونویسی

## مقدمه

به تنش شوری با استفاده از تکنیک‌های آنالیز ترانسکرپتوم، به ویژه cDNA-AFLP، صورت گرفته است. برای مثال، لئو و همکاران (۱۱) الگوی بیان ژنوم *Robinia pseudoacacia* L. را در پاسخ به تنش شوری مورد ارزیابی قرار دادند. نویسنده‌ان کارکرد TDF‌ها Transcript Derived Fragments (Transcript Derived Fragments) شناسایی شده در پژوهش خود را به انتقال، پروتئین‌های مرتبط با پاسخ دفاعی گیاه به تنش، فاکتورهای رونویسی، انتقال پیام و متابولیسم انرژی و مواد نسبت دادند. مطالعات مشابهی در *Chrysanthemum lavandulifolium* (۱۲)، *Brachypodium distachyon* (۱۳) و سایر گیاهان صورت گرفته است. یافته‌های چنین تحقیقاتی به شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخگو به تنش شوری کمک شایانی کرده است. با اینحال، مطالعات گندم به عنوان یک گیاه استراتژیک که شدیداً تحت تاثیر شوری قرار دارد، دارای اهمیت است. با توجه به آنچه گفته شد، طراحی برنامه‌های بهنراثی و تولید گیاهان متتحمل به شوری نیازمند تشخیص ژن‌های جدید و شناسایی الگوی بیانی آنها تحت شرایط تنش است. بنابراین، این مطالعه با هدف شناسایی رونوشت‌های با بیان افتراقی در گندم نان تحت تنش شوری با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP انجام شد تا تصویر بهتری از مکانیزم‌های پاسخ گندم به تنش شوری بدست آید.

گیاهان مواد مغذی خود را به صورت نمک‌های محلول جذب و نگهداری می‌کنند، با اینحال ایناشتگی مازاد نمک در خاک، منجر به تنش شوری می‌شود (۱). مطابق با مستندات CIMMYT (مرکز بین‌المللی اصلاح گندم و ذرت) ۸ (۱۲) درصد از نواحی تحت کشت‌وکار گندم نان در کشورهای همچون ایران، پاکستان، مکزیک، لیبی و هند متأثر از پیامدهای منفی و نامطلوب شوری هستند (۲). با توجه به این موضوع، تنش شوری می‌تواند خسارات قابل توجهی به تولید غلات به ویژه گندم در این کشورها و در نتیجه به اقتصاد مبتنی بر کشاورزی آنها وارد آورد (۳). تنش شوری تاثیرات متنوعی بر گیاهان دارد که از آن جمله می‌توان به جلوگیری از تمایز آوندهای آبکش و چوبی، زود چوبی‌شدن ریشه‌ها، تغییر در اندازه و تعداد روزنه‌ها، کاهش سطح برگ‌ها و کاهش رشد اشارة داشت (۴). همچنین، تنش شوری ابعاد مختلفی از رشد زایشی را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد که شامل کیفیت دانه، میزان محصول، تکوین میوه، گرده افسانی و گل‌دهی می‌باشند (۵). مکانیزم‌های متعددی برای مقابله با شوری در سطح سلولی تکامل یافته‌اند که از آن جمله می‌توان به تغییر در بیان ژن‌های مهم و مسیرهای علامت‌دهی، پاسخ به خسارات ناشی از شوری و ترمیم آن‌ها، تحمل نسبت بالای سدیم سیتوپلاسمی، بیوسنتر محافظت کننده‌های اسمزی و کدبندی درون سلولی اشاره داشت (۶-۱۰).

تاکنون مطالعات متنوعی در زمینه مطالعه پاسخ گیاهان

مرحله پیش‌تکثیر با استفاده از پرایمر *MseI* (MPPC: ) *EcoRI*: (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3' ۳'-GACTCGTACCAATTG-5') اجرا شد. چرخه‌های مرحله پیش‌تکثیر (۲۲ چرخه) به شرح ذیل بودند: واسرشت‌سازی برای ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال برای ۶۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، و گسترش برای ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. بعد از مرحله پیش‌تکثیر، مرحله تکثیر انتخابی با استفاده از هشت ترکیبی پرایمری از *EcoRI/MseI* انجام شد. چرخه‌های مرحله تکثیر انتخابی (۲۲ چرخه) به شرح ذیل بودند: واسرشت‌سازی برای ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال برای ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، و گسترش برای ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. محصولات PCR بر روی ژل توالی یابی پلی آکریل آمید ۶ درصد برای یک ساعت در ۷۰ وات تفکیک شدند. سپس، از رنگ آمیزی نفره برای آشکارسازی باندها بر روی ژل استفاده شد (۱۳).

#### جداسازی، تکثیر مجدد و توالی‌بایی TDFs

در اینجا، TDF‌ها با توجه به بیان افتراقی و یا حضور و عدم حضور آنها با استفاده از تیغه‌های جراحی با احتیاط برای جلوگیری از هرگونه آلودگی از ژل پلی آکریل آمید جدا شدند. باندهای موردنظر جداسده از ژل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر رقیق شدند. سپس، از ۲ میکرولیتر DNA همراه با آغازگرهای انتخابی به عنوان الگوبی برای تکثیر مجدد استفاده شد. تکثیر آمپلیکون‌ها توسط کیت PureLink PCR Purification Kit (شرکت Invitrogen) انجام شد. سپس، آمپلیکون‌ها در وکتور pUC119 (شرکت Addgene) کلون و در نهایت توالی‌بایی شدند. آنالیز توالی‌بایی از طریق BLASTX در GenBank مقابله با بهره‌گیری از نرم‌افزار agriGO v2.0 برای آنالیز آنتالوژی ژن، هر TDF به یک گروه کارکردی از ژن‌ها نسبت داده شد (۱۴).

#### اعتبارسنجی بیان ژن با Real-time PCR

در راستای کاهش تنوع در هر نمونه، سه نمونه RNA از هر تکرار بیولوژیکی به طور یکسان باهم ترکیب شدند تا خزانه real-time PCR را تشکیل دهنند. برای هر خزانه نیز سه تکرار تکنیکی لحاظ شد و از میانگین آنها برای براورد فراوانی نسبی رونوشت‌ها استفاده شد. استخراج RNA و سنتز cDNA مطابق با توضیخات بخش قبلی اجرا شد. واکنش Real-time PCR به ۱۰۰ میکرولیتر رقیق شد و سپس از ۲ SYBR Green (Invitrogen) استفاده شد. آستانه CT از طریق فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد. از ژن *Tubulin* به عنوان ژن مرجع در این آزمایش استفاده شد.

#### آنالیز آماری

این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل شده اتفاقک رشد داشت انجام شد. آنالیز آماری به کمک ANOVA و آزمون چند دامنه‌ای

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی و تیمار آزمایشی

در این مطالعه، سه ژنوتیپ گندم به نام‌های افالک ( مقاوم به شوری)، سیروان (حساس به شوری) و ارگ (نسبتاً مقاوم به شوری) از موسسه تحقیقات نهال و بذر تهیه شده و سپس در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل شده اتفاقک رشد داشتند کشاورزی دانشگاه آزاد اهواز کشت شدند. هر گلدان ۵ کیلوئی با خاک لوم-شنی (۴۵ درصد رس، ۲۰ درصد سیلت و ۲۰ درصد ماسه) پر شد. تعداد ۱۰ بذر از هر نمونه در عمق ۳ سانتی‌متری کشت شد و پس از یک هفته از کشت، تعداد آنها به ۷ گیاهچه تنک شد. حدود ۵۰ روز بعد از کاشت، تعداد ۲۷ گلدان به دو دسته تقسیم شدند: یک دسته با آب معمول و دسته دیگر با آب شور (۱۴۰ و ۳۰۰ گرم کلرید سدیم به ترتیب معادل با ۱۴ و ۲۱ dS<sup>-1</sup>) تحت آبیاری قرار گرفتند. گلدن‌ها تحت شرایط ۷۰ درصد رطوبت، ۲۲ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۲ الی ۱۴ ساعت در اتفاقک رشد نگهداری شدند. نمونهبرداری در مرحله پر شدن دانه و ۷۰ روز بعد از تنش از برگ‌های سبز گیاه انجام شد.

##### cDNA و سنتز RNA استخراج

محتوای RNA حاضر در برگ به کمک معرف ترایزول و بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت Gene all استخراج شد. جهت دستیابی به این هدف، ۱ میلی‌لیتر معرف ترایزول به ۱۰۰ میلی‌گرم از برگ پودرشده به کمک نیتروژن مایع اضافه شد. بعد از ورتسک و سانتریفیوژ، فاز رویی جدا شد و به آن کلروفرم اضافه شد. به منظور بررسی کیفیت و کمیت RNA به ترتیب از ژل آگارز ۱ درصد و نانو دراپ استفاده شد. در ادامه، mRNA به کمک کیت Oligotex mRNA Mini و بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت Kit QIAGEN استخراج شد. کیت mRNA با استفاده از نانو دراپ تعیین شد. در ادامه، دو میکروگرم mRNA برای سنتز رشته اول cDNA، میزان ۷ میکرولیتر از RNA که در مرحله قبل با DNase I تیمار شده بود به همراه ۱ میکرولیتر پرایمر الیگو dNTP، ۵ میکرولیتر ۵X Reaction buffer، ۱ میکرولیتر آنزیم ریورس ترانسکرپتا، ۱ میکرولیتر آنزیم Ribolock RNase inhibitor و آب با هم مخلوط شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس از کیت SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit cDNA برای سنتز رشته دوم استفاده شد (۱۲).

##### cDNA-AFLP

واکنش cDNA-AFLP با استفاده از کیت AFLP Core Reagent Kit انجام شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ نانوگرم از cDNA دو رشته با آنزیم‌های *MseI* و *EcoRI* هضم شد. محصولات حاصل از هضم به آپتورهای ذیل دوخته شدند:

*EcoRI* adapter, 5'-  
CTCGTAGACTGCGTACC-3', 3'-  
CTGACGCATGGTTAA-5'

*MseI* adapter, 5'-GACGATGAG TCCTGAG-  
3', 3'-TACTCAGGACTCAT-5'

بعد از توالی‌یابی، TDF‌های شناخته شده به کمک جستجوی BLASTX در مقابل پایگاه داده GenBank، به گروه‌های مختلف عملکردی نسبت داده شدند. نتایج نشان داد که ۲۲ عدد TDF با ژن‌های دارای کارکرد معلوم همولوژی دارند درحالیکه ۵ عدد با ژن‌های فاقد کارکرد معلوم همولوژی داشتند. همچنین، هیچ پاسخی برای ۴ عدد TDF پیدا نشد (جدول ۱). همانگونه که از شکل ۱ پیداست، ۶ درصد ژن‌ها متعلق به گروه تنظیم‌گرهای رونویسی، ۵ عدد TDF متعلق به گروه انتقال یا ترانسپورت، ۵ عدد TDF متعلق به گروه متابولیسم و انرژی، ۲ عدد TDF متعلق به گروه تجزیه پروتئین، ۱ عدد TDF متعلق به گروه دفاع سلولی، و ۱ عدد TDF متعلق به گروه انتقال سیگنال می‌شوند.

دانکن و با استفاده از نرمافزار SPSS V 20 انجام شد (۱۶، ۱۵).

## نتایج و بحث

شناسایی رونوشت‌هایی با بیان افتراقی در تکنیک cDNA-AFLP، تکثیر انتخابی از طریق هشت ترکیب آغازگری منجر به شناسایی TDF ۲۶۹ شد که ۳۱ عدد از آنها به طور افتراقی بیان شدند. نتایج Real-time PCR نشان داد که از تعداد ۲۲ PCR موردنظر، چهار عدد با کاهش بیان و ۱۸ عدد با افزایش بیان همراه بودند (شکل ۱). بعد از جداسازی باندها از روی ژل، تکثیر مجدد و توالی‌یابی انجام شد.

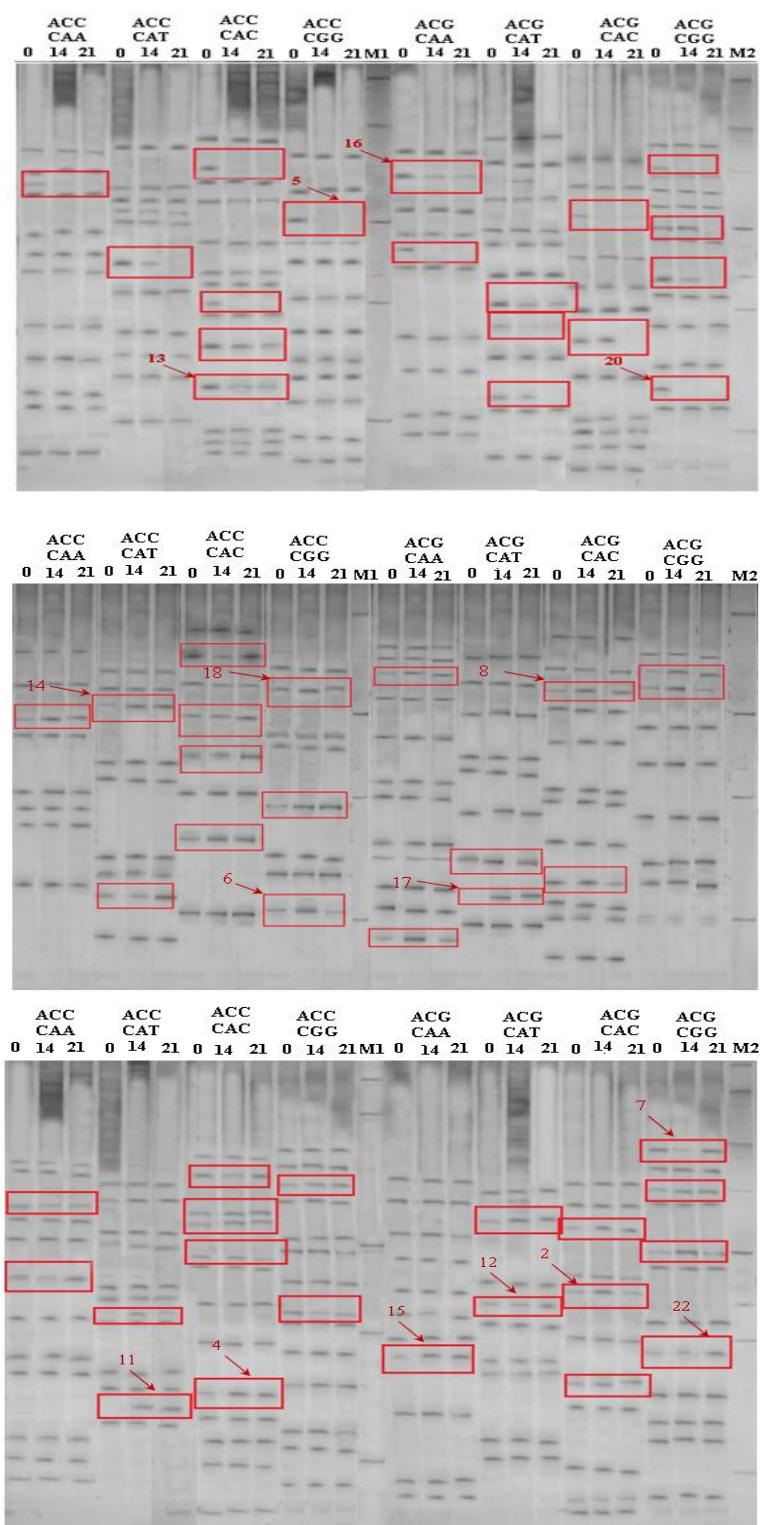
## انتصاب TDFs دارای بیان افتراقی به گروه‌های کارکردی

جدول ۱- سنجش بیان TDF‌ها با استفاده از Real-time PCR در ارقام گندم نان تحت تنش شوری  
Table 1. Expression of TDFs by Real-time PCR in bread wheat cultivars under salinity stress

نوع ژن	نوع بیان	نتایج			نتایج			نتایج			نتایج		
		نام ژن که با رونوشت داشت	موردنظر همولوژی داشت	شماره قطعه رونوشت	نوع بیان	نام ژن که با رونوشت داشت	موردنظر همولوژی داشت	شماره قطعه رونوشت	نوع بیان	نام ژن که با رونوشت داشت	موردنظر همولوژی داشت	شماره قطعه رونوشت	
بیان ژن	بیان ژن	ارقام	E value	بیان ژن	ارقام	E value	بیان ژن	ارقام	E value	بیان ژن	ارقام	E value	
۲۱ و ۱۴	افزایش	سیروان	2e-33	Sulfatepermease 1 (slp1), transcript variant X5	۱۷	-	-	-	-	-	-	-	*۱
۲۱ و ۱۴	افزایش	ارگ	5e-09	Spontaneous calcineurin B-like protein 3 (CBL3)	۱۸	۲۱ و ۱۴	افزایش	سیروان	1e-56	Dehydration responsive factor 1	۲		
۲۱ و ۱۴	افزایش	افلاک	4e-21	Spontaneous high-affinity K <sup>+</sup> transporter 4	۱۹	۲۱ و ۱۴	افزایش	ارگ	3e-22	Cysteine proteinase	۳		
۲۱ و ۱۴	کاهش	سیروان	5e-33	Partial mRNA for td2L1 protein	۲۰	-	-	-	3e-16	Strain DSM 15391	**۴		
۲۱ و ۱۴	-	-	53-17	Dehydrin	۲۱	-	-	-	-	-	-	-	*۵
۱۴	کاهش	ارگ	2e-17	NAC transcription factor NTL5 (NTL5)	۲۲	۱۴	۱۴	افزایش	۱e-35	Ribosomal RNA adenine dimethylase	۶		
-	-	-	3e-11	Chromosome 4 PCR sequence AGI_1227 genomic sequence	**۲۳	-	-	-	-	-	-	-	*۷
-	-	-	5e-09	Chromosome 2 sequence	**۲۴	۲۱ و ۱۴	افزایش	ارگ	4e-10	Zinc finger protein	۸		
۲۱ و ۱۴	افزایش	افلاک	2e-18	Clone 19 WRKY transcription factor (WRKY) mRNA	۲۵	-	-	-	-	-	-	-	*۹
۲۱ و ۱۴	افزایش	افلاک	3e-24	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-2	۲۶	-	-	-	-	-	-	-	*۱۰
۲۱ و ۱۴	کاهش	افلاک	3e-89	Phosphoenolpyruvate carboxylase 3 (PPC3)	۲۷	۲۱ و ۱۴	افزایش	ارگ	2e-08	Kinase with tetratricopeptide repeat domain-containing protein	۱۱		
۲۱ و ۱۴	افزایش	سیروان	1e-35	DNA glycosylase superfamily protein (AT1G19480)	۲۸	۱۴	۱۴	کاهش	4e-40	Plasma membrane-associated cation-binding protein 1	۱۲		
۲۱ و ۱۴	افزایش	ارگ	4e-36	Ubiquitin (WUB1)	۲۹	۲۱ و ۱۴	کاهش	ارگ	3e-25	High-affinity potassium transporter	۱۳		
۲۱ و ۱۴	افزایش	ارگ	2e-54	bZIP transcription factor	۳۰	۲۱ و ۱۴	افزایش	سیروان	3e-20	Fra2	۱۴		
۲۱ و ۱۴	افزایش	سیروان	2e-56	Dehydrin Rab18-like	۳۱	۲۱ و ۱۴	افزایش	افلاک	3e-04	HKT protein	**۱۵		
					۲۱ و ۱۴	کاهش	سیروان	5e-39	bZIP transcription factor 44-like	۱۶			

\* قطعات ۱، ۷، ۵، ۹، ۱۰، ۱۱ با cDNA-AFLP بدست آمدند اما فاقد توالی مشابه از طریق جستجوی همولوژی بودند.

\*\* قطعات ۴، ۲۳، ۲۴، ۱۵ با cDNA-AFLP بدست آمدند اما در Real-time PCR فاقد نتیجه بودند.



شکل ۱- محصول AFLP cDNA بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶٪ با استفاده از ۸ ترکیب آغازگری متفاوت برای ارقام گندم، (M1) سایز ماکر (M2) سایز ماکر (bp<sup>۰</sup>: bp<sup>۱۰۰</sup>) تمنونه تنش خورده؛ (۱۴) نمونه تنش خورده شوری ۱۴ دسی زیمنس بر مترا؛ (۲۱) نمونه تنش خورده شوری ۲۱ دسی زیمنس بر مترا

Figure 1. cDNA-AFLP products on 6% polyacrylamide gel by using 8 different primer compounds for wheat cultivars. M1) Marker size 50 bp; M2) Marker size 100 bp; 0) tense tension; 14) 14 dS/m salt-stressed samples; 21) 21 dS/m salt-stressed samples m

تجزیه و تحلیل ترانسکریپت گندم تحت شوری نشان داد که TDF شماره ۱۱ در رقم نسبتا مقاوم ارگ با عملکرد انتقال سیگنال، از جمله پروتئین کیناز سرین/ترؤونین در ارتباط است. بر اساس مشاهدات ما، این ژن در شوری  $14 \text{ dS m}^{-1}$  و  $21 \text{ dS m}^{-1}$  افزایش بیان داشت که این موضوع عملکرد پروتئین کیناز سرین/ترؤونین را در مکانیسم‌های دفاعی گندم معکس می‌کند (۲۰). پروتئین کینازها به عنوان یک جز کلیدی در انتقال سیگنال ناشی از تشکلهای محیطی عمل می‌کنند و نقشی اساسی در سیگنالینگ و فعال سازی دفاع گیاه دارند (۸). در توافق با مشاهدات ما، برخی از اعضای پروتئین کیناز نشان داده شده است که در پاسخ به ROS‌ها، سرما، خشکی و شوری شرکت می‌کنند (۸).

#### تنظیم رونویسی

TDF‌های شماره ۲، ۱۶، ۲۲، ۲۵ و ۳۰ دارای همولوژی با اعضای خانواده فاکتورهای رونویسی bZIP، DREB، WRKY و NAC بودند که اثبات شده است در پاسخ به تشکلهای غیرزیستی نقش دارند. بیان افتراقی فاکتورهای رونویسی bZIP، DREB، NAC و WRKY تحت تنش شوری در *Chrysanthemum lavandulifolium* (۱۲) و *Populus simonii* (۱۴) نشان داده شده است. این موضوع حاکی از پتانسیل فاکتورهای رونویسی bZIP، DREB، WRKY و NAC در پاسخ گندم به تنش شوری می‌باشد. به عنوان مثال، WRKY TF‌ها به جعبه W موجود در پرومتر ژن‌های میزان زراعی، چندین پروتئین WRKY در دفع از گیاه در برابر حمله عوامل بیماری‌زا و همچنین تنش‌های سرما، گرما و خشکی شرکت می‌کنند (۲۱).

#### تجزیه پروتئین

آنالیز توالی نشان داد که TDF شماره ۲۹، یوبی‌کویتین‌ها را رمزگذاری می‌کند. بر اساس نتایج ما، این ژن در رقم نسبتا مقاوم ارگ تحت دو تیمار NaCl بیش‌بیان شد، همانطور که توسط لتو و همکاران (۱۱) نشان داده شده است. این موضوع حاکی از عملکرد خانواده پروتئینی یوبی‌کویتین در کنترل رشد و انتساب به شوری است. این خانواده پروتئینی در کنترل رشد و انتساب گیاه با شرایط استرس‌زای محیط نقش اساسی بر عهده دارد. تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که بیان بالای یوبی‌کویتین‌های گندم منجر به بهبود تحمل تنش‌های غیرزیستی *Brachypodium distachyon* در (۲۲). TDF شماره ۳ با ژن پروتئین سیستئینی همولوژی داشت که بیان آن در رقم نسبتا مقاوم ارگ تحت تنش شوری در گندم کاهش می‌یابد. در مطالعات قبلی مشخص شده است که پروتئین‌های سیستئینی از جمله پروتئازهای اصلی هستند که در حوادث پروتولیتیک سلولی دخیل می‌باشند و منجر به پیش زودرس می‌شوند (۲۳). در پژوهشی، ژانگ و همکاران (۲۴) دو مهارکننده پروتئین سیستئینی را در آراییدوپسیس به نامهای AtCYSb و AtCYSa شناسایی کردند که تحمل سرما، خشکی و شوری را افزایش می‌دادند.

#### اعتبارسنجی بیان ژن‌ها به کمک Real-time PCR

آنالیز بیان ژن با تکنیک Real-time PCR نشان داد که TDF‌ها با کاهش بیان (شماره‌های ۱۳، ۲۰، ۱۶ و ۲۷) و برخی TDF‌ها با افزایش بیان (شماره‌های ۲، ۳، ۶، ۸، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۲، ۲۶، ۲۵، ۲۸ تا ۳۱) همراه بودند (شکل ۲). نتاج نشان داد که TDF ۲۲ از ۱۸ در حدود ۸۰ درصد TDF‌ها را تایید کرد.

#### انتقال یا ترانسپورت

های شماره ۱۳، ۱۵ و ۱۹ دارای همولوژی با TDF ترانسپورتر K<sup>+</sup>-uptake (HAK) بودند که جذب پتانسیم را تسهیل می‌کند. این ترانسپورتریک عملکرد اساسی در انتقال پتانسیم دارد و قادر است تا هموستازی را در گیاه حفظ کند (۳). مشخص شده است که نقش طبیعی HAK، مهار رفاقتی یون‌های سدیم از طریق به اشتراک گذاری مسیر انتقال بین دو کاتیون K<sup>+</sup> و Na<sup>+</sup> است (۱۷). از آنجاییکه عملکرد HAK در جذب K<sup>+</sup> و Na<sup>+</sup> در شرایط تنش شوری همچنان واضح نیست، تعیین اینکه آیا TDF‌های ۱۵ و ۱۹ در تحمل شوری گندم نقش دارند و یا خیر، دشوار به نظر می‌رسد. با این وجود، افزایش سطح این TDF‌ها تحت شوری در ارقم مقاوم PCR زمان واقعی در انتقال پتانسیم و افلاک و نسبتا مقاوم ارگ پیشنهاد می‌کند که این ژن‌ها احتمالاً در انتقال پتانسیم و تحمل شوری نقش دارند. در مطالعه‌ما، القاء ترانسپورتر HAK تحت شوری در گندم نشان داد که ممکن است HAK عملکرد مهمی در حفظ نسبت بهمینه K<sup>+</sup> و Na<sup>+</sup> در سیتوسول سلولی و حفظ هموستاز یونی در گندم داشته باشد.

TDF شماره ۱۸ با پروتئین شبکی کالسینورین ۳ (CBL3) مطابقت داشت. پیشنهاد شده است که حسگر CBL3 به عنوان یک رابط مولکولی بین سیگنالینگ V-ATPase و Ca<sup>2+</sup> (تعديل کننده اصلی هموستازی یونی داخل سلولی) عمل می‌کند (۱۸). در پژوهش ما، فعال سازی CBL3 در رقم نسبتا مقاوم ارگ تحت تنش شوری نشان داد که احتمالاً CBL3 در حفظ هموستازی یون نقش کلیدی ایفا می‌کند.

TDF شماره ۱۲ با ژن پروتئین اتصال به کاتیون مرتبط با غشنا پلاسمایی (PCAP) همولوژی داشت. این ژن پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که نقش مهمی در تغییر انتشار املاح کوچک و آب بدون بار، انتقال پراکسید هیدروژن و پاسخ ویروس ایفا می‌کند. به عنوان مثال، پروتئینی شبه PCAP1 یافت شده است که به طور منفی حرکات بین سلولی ویروس موزاییک بامبو را در نیکوتینا بنتامیانا تنظیم می‌کند (۱۹). نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که در رقم نسبتا مقاوم ارگ تحت تنش شوری  $14 \text{ dS m}^{-1}$  dچار کم تنظیمی می‌شود در حالیکه در تنش شوری  $21 \text{ dS m}^{-1}$  dچار کم بیش تنظیمی می‌شود.

#### انتقال سیگنال

اعمال تنش NaCl در رقم مقاوم افلاک دچار کاهش بیان شد.

TDF شماره ۱۴ با ژن FRA2 همولوگ بود و در رقم حساس سیروان تحت تنش شوری با افزایش بیان همراه بود. کومانویکس و همکاران (۲۹) گزارش کردند که ژن‌های FRA1 و FRA2 در تنظیم آهن در مخمر شرکت می‌کنند. بنابراین، به نظر می‌رسد که ژن FRA2 در حساسیت به شوری نقش دارد.

TDF شماره ۱۷ با ژن sulfate permease همولوگ بود که در جذب سولفات‌سلولی نقش دارد. خانواده سولفات پرماتاز عضوی از خانواده بزرگ حامل‌های ثانویه APC هستند (۳۰). در این تحقیق، برای اولین بار، افزایش بیان سولفات‌پرماتاز در رقم حساس سیروان تحت هر دو تیمار ۱۴ و ۲۱ دسی زیمنس در متربعد NaCl نشان داده شد.

#### دیگر کارکردها

دسته جالب دیگری از ژن‌های شناخته شده در مطالعه حاضر شامل آن دسته از ژن‌هایی بودند که هیچ شbahat شده در مطالعه توجهی با توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعات عمومی نبودند. تعداد متعددی از پژوهش‌های علمی رونوشت‌های با بیان افتراقی تحت تنش شوری را از طریق cDNA-AFLP و PCR زمان‌واقعی در سایر گیاهان شناسایی کرده‌اند (۱۱، ۱۴). خصوصیات ژن‌هایی که هنوز در پایگاه‌های اطلاعات مشخص نشده اند باید مورد توجه قرار گیرند زیرا آنها می‌توانند داده‌های جدید و با ارزشی را در مورد پاسخ گندم به شوری ارائه دهند.

#### نتیجه‌گیری

مطالعه پاسخ گندم به شوری از طریق تکنیک cDNA-AFLP منجر به شناسایی ژن‌های درگیر در گروه‌های مختلف عملکردی مانند انتقال، تجزیه پروتئین، تنظیم رونویسی، انتقال سیگنال، دفاع سلول، انرژی و متابولیسم شد. این یافته‌ها، داده‌های جدیدی را به تصویر مبهم ژن‌های پاسخگو به شوری اضافه کرده و بدین ترتیب درک ما از مکانیسم‌های سلولی دخیل در پاسخ گندم به تنش شوری را تسهیل می‌کنند. بعلاوه، توضیح عملکرد و خصوصیات این ژن‌ها اطلاعات مفیدی را فراهم می‌کند که می‌تواند به بهبود تحمل T. aestivum به شوری کمک کند.

#### دفاع سلولی

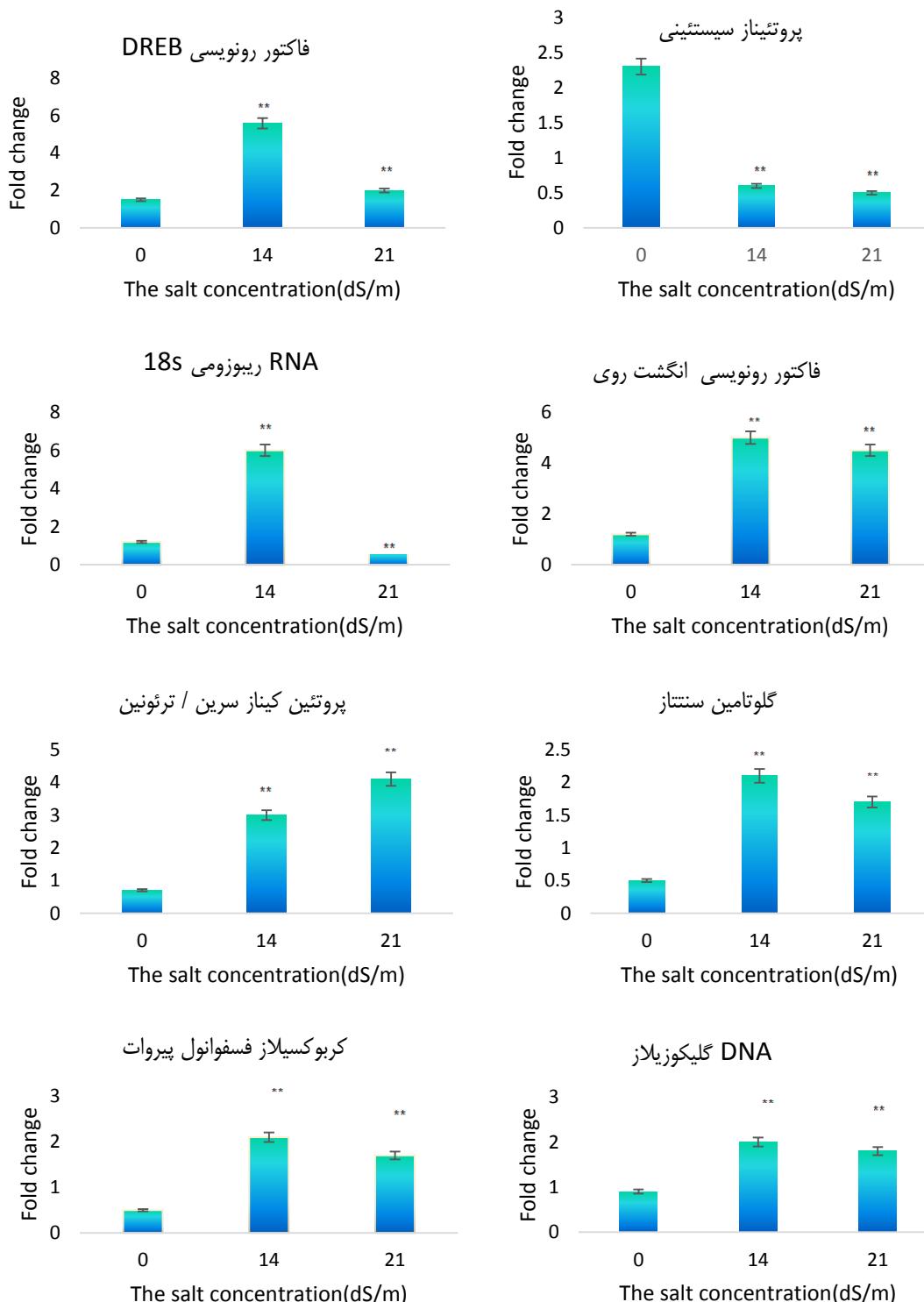
TDF شماره ۲۰ با ژن رمزگردان پروتئین انتقال لیپید (LTP) همولوژی داشت که در پاسخ دفاعی نقش دارد. پروتئین‌های انتقال لیپید، عضوی از خانواده پروتئین‌های مرتبه با پاتوژن هستند که توسط یک حفره آبگریز شبکه‌تونل مشخص می‌شوند که آنها را برای اتصال و انتقال لیپیدهای مختلف مناسب می‌کند. همانطور که توسط صیفی و همکاران (۲۵) در Glycine max مشاهده شد، عملکردگاهی مختلفی را برای LTP در تنش‌های زیستی و غیرزیستی پیشنهاد می‌کند. کاهش بیان LTP تحت تنش شوری در رقم حساس سیروان در این مطالعه نشان از نقش آن در تحمل شوری دارد. همراستا با نتایج ما، صیفی و همکاران (۲۵) دریافتند که LTP در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی نقش دارد.

#### انرژی و متابولیسم

در این پژوهش، TDF شماره ۲۶ به عنوان گلوتامین سنتاز قلمداد شد و در رقم مقاوم افلاک تحت غلطات بالای نمک بیان بیش از حد داشت. همانطور که در منابع گذشته مشاهده شد، تنش اسمزی و شوری می‌تواند از طریق افزایش mRNA و پلی پپتید، بیان گلوتامین سنتاز را القا کند و در نتیجه فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد (۲۶). افزایش بیان گلوتامین سنتاز در Helianthus annuus از عملکرد این ایزوآنزیم در تحرک نیتروژن در سلول‌های گیاهی پشتیبانی می‌کند (۲۶).

TDF شماره ۲۸، شbahat با ژن DNA گلیکوزیلاز را نشان داد و بیان آن در رقم حساس سیروان تحت شوری در گندم القا شد. برخلاف نتایج ما، آنزیم گلیکوزیلاز در ترمیم استخراج بازی نقش دارد و گزارش شده است که بیان بیش از حد یک DNA گلیکوزیلاز / AP لیاز، به نام AtOGG1، تحمل تنش غیرزیستی را در A. thaliana بهبود می‌دهد (۲۷).

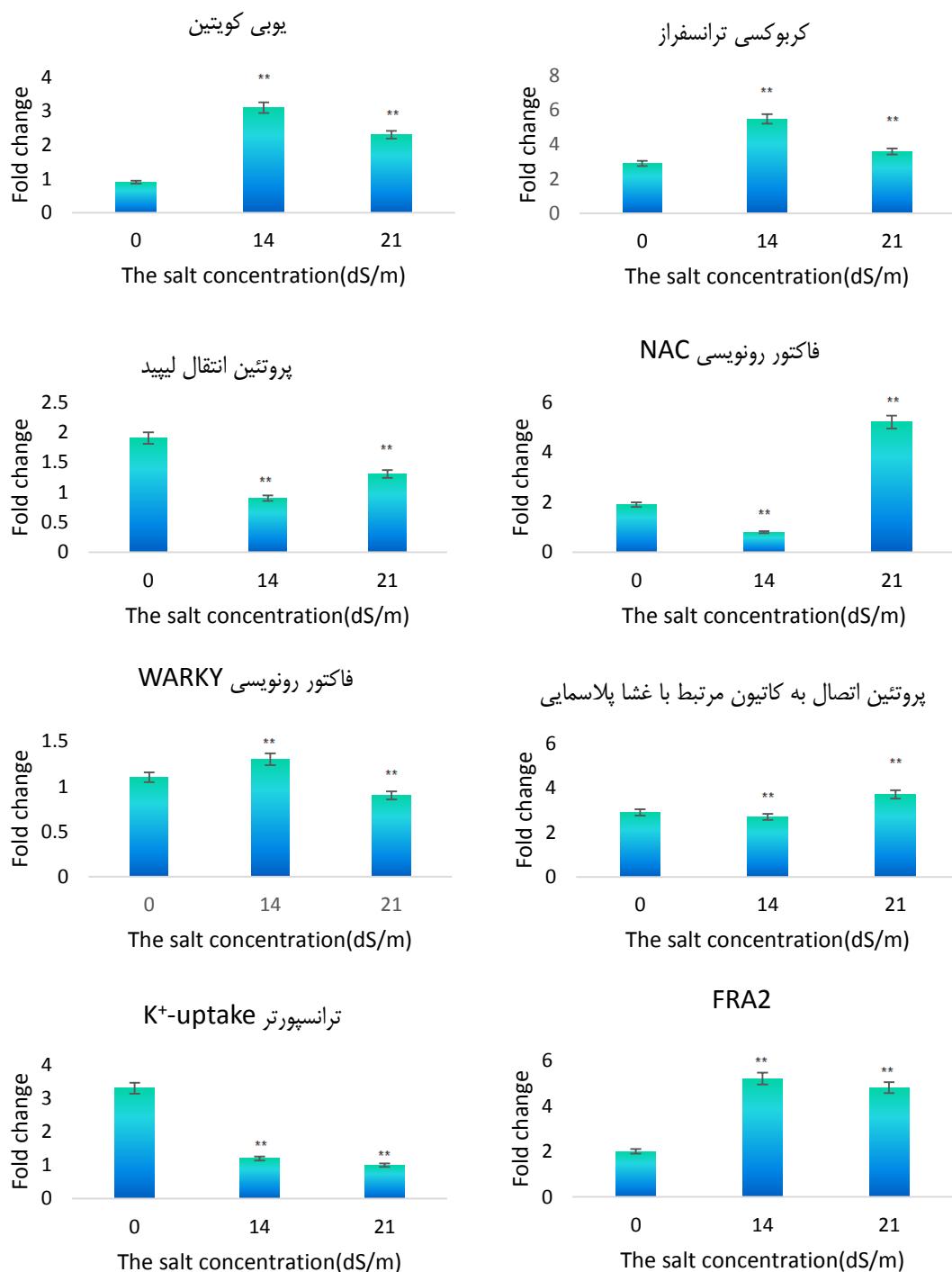
بر اساس نتایج آنالیز توالی، TDF شماره ۲۷ آنزیم کربوکسیلاز فسفوanol پیروات (PEPC) را رمز می‌کند. PEPC، آنزیمی شدیداً تنظیم شده است که در نقطه اصلی شاخه متابولیسم کربن گیاه قرار دارد (۲۸). همانطور که قبل از گزارش شد، شوری می‌تواند فعالیت PEPC، حالت فسفوریلاسیون آن و محتوای L-مالات در ریشه Arabidopsis را افزایش دهد (۲۸). با این حال، این ژن با



شكل ۲- اعتبارسنجی الگو بیان ژن های گندم تحت تنش شوری (بدست آمده با استفاده از qRT-PCR) با استفاده از (cDNA/AFLP).

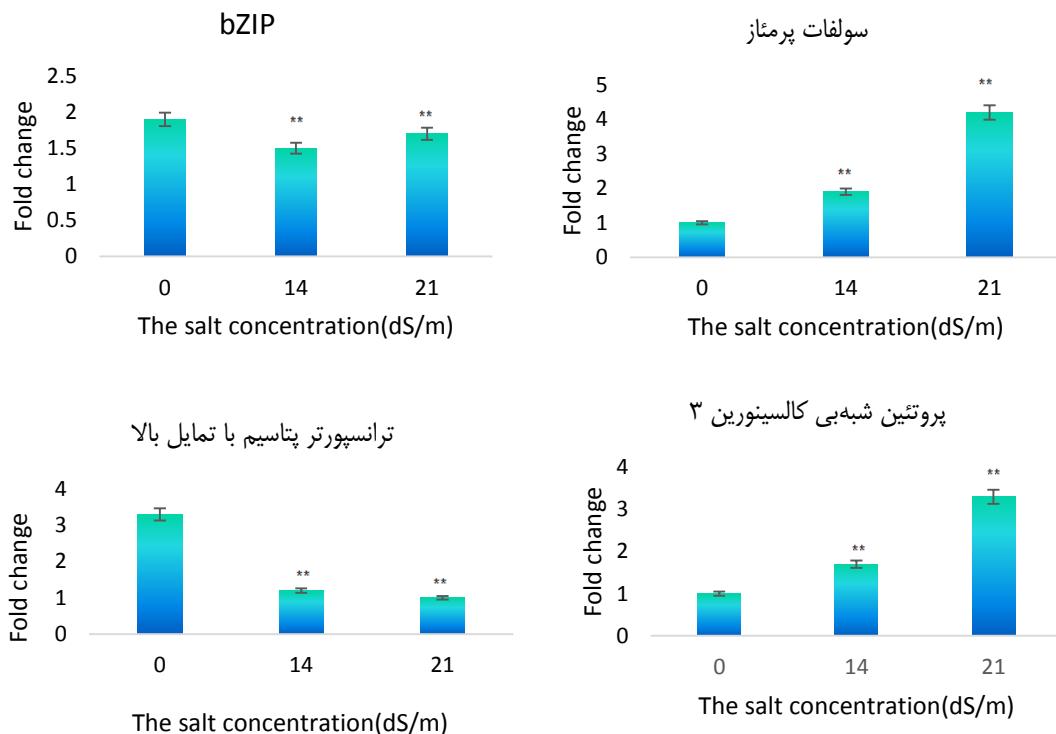
نرمال سازی داده ها با توجه به ژن مرجع توبولین انجام شد. علامت دو ستاره حاکی از معنی داری در سطح ۰/۰۱ است.

Figure 2. qRT-PCR-based validation of the expression pattern of genes of salt-stressed wheat obtained from cDNA/AFLP. Normalization of data was performed to the *Tubulin* reference gene. \*\* significant difference at  $P<0.01$ .



ادامه شکل ۲- اعتبارسنجی الگو بیان ژن‌های گندم تحت تنش شوری (بدست آمده با cDNA/AFLP) با استفاده از qRT-PCR. در اینجا، نرمال‌سازی داده‌ها با توجه به ژن مرجع توبولین انجام شد. علامت دو ستاره حاکی از معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ است.

Continued Figure 2. qRT-PCR-based validation of the expression pattern of genes of salt-stressed wheat obtained from cDNA/AFLP. Normalization of data was performed to the *Tubulin* reference gene. \*\* significant difference at  $P<0.01$ .



ادامه شکل ۲- اعتبارسنجی الگو بیان ژن‌های گندم تحت تنش شوری (بدهست آمده با cDNA/AFLP) با استفاده از qRT-PCR. در اینجا، نرمال‌سازی داده‌ها با توجه به ژن مرجع توپولین انجام شد. علامت دو ستاره حاکی از معنی داری در سطح ۰/۰۱ است.

Continued Figure 2. qRT-PCR-based validation of the expression pattern of genes of salt-stressed wheat obtained from cDNA/AFLP. Normalization of data was performed to the *Tubulin* reference gene. \*\* significant difference at  $P<0.01$ .

### تشکر و قدردانی

از جناب دکتر محمد سبزهزاری، بیوتکنولوژی کشاورزی  
دانشگاه تهران، که ما را در تهییه این مقاله یاری نمودند،  
کمال تشکر و قدردانی را داریم.

### منابع

1. Akладیوس، س.ا. و H.I. Mohamed. 2018. Ameliorative effects of calcium nitrate and humic acid on the growth, yield component and biochemical attribute of pepper (*Capsicum annuum*) plants grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 236: 244-250.
2. FAO. 2015. World wheat, corn and rice. Oklahoma State University, FAO Statistics, Oklahoma.
3. Cushman, J.C. and H.J. Bohnert. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 117-124.
4. Ghonaim, M.M., H.I. Mohamed and A.A.A. Omran. 2020. Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) salt stress tolerance using physiological parameters and retrotransposon-based markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, <https://doi.org/10.1007/s10722-020-00981-w>.
5. Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55: 307-319.
6. Goudarzi, M. and H. Pakniyat. 2008. Evaluation of wheat cultivars under salinity stress based on some agronomic and physiological traits. *Journal of Agriculture and Social Research*, 4(3): 35-38.
7. Munns, R. and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-681.
8. Šamajová, O., O. Plihal, M. Al-Yousif, H. Hirt and J. Šamaj. 2013. Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances*, 31: 118-128.
9. Munns, R., R.A. James and A. Läuchli. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 5: 1025-1043.

10. Roy, S.J., S. Negrao and M. Tester. 2014. Salt resistant crop plants. Current Opinion in Biotechnology, 26: 115-124.
11. Liu, L., F.L. Huang, Q.X. Luo, H.Y. Pang and F.J. Meng. 2012. cDNA- AFLP analysis of the response of tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) to salt stress. African Journal of Biotechnology, 11(13): 3116-3124.
12. He, H., N. Yajing, C. Huawen, T. Xingjiao, X. Xinli, Y. Weilun and D. Silan. 2012. cDNA-AFLP analysis of salt-inducible genes expression in *Chrysanthemum lavandulifolium* under salt treatment. Journal of Plant Physiology, 169: 410-420.
13. Kim, D.Y., M.J. Hong, J.H. Jang, Y.W. Seo. 2012. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in *Brachypodium distachyon*. Genes & Genomics, 34: 475-484.
14. Wang, L., B. Zhou, L. Wu, B. Guo and T. Jiang. 2011. Differentially expressed genes in *Populus simonii* × *Populus nigra* in response to NaCl stress using cDNA-AFLP. Plant Science, 180: 796-801.
15. Sabzehzari, M., S. Hoveidamanesh, M. Modarresi and V. Mohammadi. 2020. Morphological, anatomical, physiological, and cytological studies in diploid and tetraploid plants of Ispaghul (*Plantago ovata* Forsk.). Genetic Resources and Crop Evolution, 67: 129-137.
16. Sabzehzari, M., S. Hoveidamanesh, M. Modarresi and V. Mohammadi. 2019. Morphological, anatomical, physiological- and cytological studies in diploid and tetraploid plants of *Plantago Psyllium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 139: 131-137.
17. - Mian, A.A., P. Senadheera and F.J.M. Maathuis. 2009. Improving crop salt tolerance: anion and cation transporters as genetic engineering targets. Plant Stress, 5: 64-72.
18. 18-Tang, R., H. Liu and Y. Yang. 2012. Tonoplast calcium sensors CBL2 and CBL3 control plant growth and ion homeostasis through regulating V-ATPase activity in Arabidopsis. Cell Research, 22: 1650-1665.
19. Huang, Y.P., Y.W. Huang, I.H. Chen, L.L. Shenwen, Y.H. Hsu and C.H. Tsai. 2017. Plasma membrane-associated cation-binding protein 1-like protein negatively regulates intercellular movement of BaMV. Journal of Experimental Botany, 68(17): 4765-4774.
20. Melloul M., D. Iraqi, M.E. Alaoui, G. Erba, S. Alaoui, M. Ibriz and E. Elfahime. 2014. Identification of Differentially Expressed Genes by cDNA-AFLP Technique in Response to Drought Stress in *Triticum durum*. Food Technology and Biotechnology, 52(4): 479--488.
21. Berri, S., P. Abbruscato, F.R. Odile, A.C.M. Brasileiro, I. Fumasoni, K. Satoh, S. Kikuchi, L. Mizzi1, P. Morandini, M.E. Pè1 and P. Piffanelli. 2009. Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and Arabidopsis. BMC Plant Biology, 9: 120.
22. Kang, H., M. Zhang, S. Zhou, Q. Guo, F. Chen, J. Wu and W. Wang. 2016. Overexpression of wheat ubiquitin gene, Ta-Ub2, improves abiotic stress tolerance of *Brachypodium distachyon*. Plant Science, 248: 102-115.
23. Botha, A.M., K.J. Kunert and C.A. Cullis. 2017. Cysteine proteases and wheat (*Triticum aestivum* L) under drought: A still greatly unexplored association. Plant, cell & environment, 4: 1679-1690.
24. Zhang, X., S. Liu, T. Takano. 2008. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. Plant Molecular Biology, 68: 131-143
25. Safi, H., W. Saibi, M.M. Alaoui, A. Hmyene, K. Masmoudi, M. Hanin and F. Brini. 2015. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic. Plant Physiology and Biochemistry, 89: 64-75.
26. Santos, C., A. Pereira, S. Pereira and J. Teixeira. 2004. Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. Scientia Horticulturae, 103: 101-111.
27. Chen, H., P. Chu, Y. Zhou, Y. Li, J. Liu, Y. Ding, E.W.T. Tsang, L. Jiang, K. Wu and S. Huang. 2012. Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis Journal of Experimental Botany, 63: 4107-4121
28. Feria, A.B., N. Bosch, A. Sánchez, A.I. Nieto-Ingelmo, C. de la Osa, et al. 2016. Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and PEPC-kinase (PEPC-k) isoenzymes in *Arabidopsis thaliana*: role in control and abiotic stress conditions. Planta, 244(4): 901-13.
29. Kumánovics, A., O.S. Chen, L. Li, D. Bagley, et al. 2008. Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. Journal of Biological Chemistry, 283(16): 10276-10286.
30. Chen, H. and A. Melis. 2004. Localization and function of SulP, a nuclear-encoded chloroplast sulfate permease in *Chlamydomonas reinhardtii*. Planta, 220: 198-210.

## **Identification of Differential Regulated Genes in Response to Salinity in Bread Wheat by using cDNA-AFLP Method**

**Shabnam Kamyab<sup>1</sup>, Khalil Alami-Saeid<sup>2,1</sup>, Mohammad Reza Eslahi<sup>3,1</sup> and Mohammad Moradi<sup>4,1</sup>**

1- PhD Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran  
2- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural

Resources University, Molasani, Iran., (Corresponding author: kh-alamisaeid@asnrukh.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Khuzestan Agricultural and Natural Resource Research and education Center, Areeo, Ahvaz, Iran

4- Assistant Professor, Department of Production and Plant Genetics, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran

Received: November 4, 2020

Accepted: September 2, 2021

### **Abstract**

Salinity stress is one of the unfavorable environmental conditions leading to loss of yield in wheat. Therefore, the discovery of differentially activated transcripts and understanding of their role in the salinity-treated wheat are indispensable for improving salt resistance. To explore the salinity-responsive genes, we assayed transcripts from salt-stressed and control wheat by using cDNA-AFLP approach. Based our observations, 31 transcript-derived fragments (TDFs) were successfully sequenced. BLASTX search revealed that most of the TDFs were belonged to the genes responsible for metabolism and energy, cell defense, transcription control, transport, signal transduction, and protein degradation functional groups. Real-time polymerase chain reaction displayed that 18 TDFs up-regulated and four down-regulated under salinity. Overall, these findings can enhance our understanding on the molecular mechanisms of salt response in wheat. Besides, the identification of novel salinity-responsive genes can represent important information, which in turn, assists the improvement of wheat tolerance to this stress in the field.

**Keywords:** Abiotic stress, Cereals, Salinity-responsive genes, Transcription factors