دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

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

شبنم کامیاب[۱]، خلیل عالمی سعید[۲و۱]، محمدرضا اصلاحی[۳و۱] و محمد مرادی[۴و۱]

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اهواز، اهواز، ایران
۲- دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی ، دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران،
(نویسنده مسوول: kh_alamisaeid@asnrukh.ac.ir)
۳- استادیار، گروه گیاهپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، اهواز، ایران
۴- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، واحد شوشتر، 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، ترانسکریپتوم گندم شاهد و تحت تنش از طریق تکنیک cDNA-AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. بر مبنای مشاهدات ما، ۳۱ قطعه حاصل از ترانسکریپت (TDF) با موفقیت توالی‌یابی شدند. بیشتر TDFهای شناخته‌شده به کمک جستجوی BLASTX، متعلق به ژن‌های درگیر 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 درحالیکه بیان ۱۸ TPF افزایش یافت. به طور کلی، این یافته‌ها درک ما از مکانیسم‌های 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

گیاهان مواد مغذی خود را به صورت نمک‌های محلول جذب و نگهداری می‌کنند، با اینحال انباشتگی مازاد نمک در خاک، منجر به تنش شوری می‌شود (۱). مطابق با مستندات CIMMYT (مرکز بین‌المللی اصلاح گندم و ذرت) ۸ الی ۱۲ درصد از نواحی تحت کشت‌وکار گندم نان در کشورهایی همچون ایران، پاکستان، مکزیک، لیبی و هند متاثر 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 اشاره 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 افشانی 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، بیوسنتز محافظت کننده‌های اسمزی و کدبندی درون سلولی اشاره داشت (۶-۱۰).

تاکنون مطالعات متنوعی در زمینه مطالعه پاسخ گیاهان 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. نویسندگان کارکرد TDFها (Transcript Derived Fragments) شناسایی‌شده 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 شدیدا تحت تاثیر شوری قرار دارد، دارای اهمیت است.

با توجه به آنچه گفته شد، طراحی برنامه‌های به‌نژادی و تولید گیاهان متحمل 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار آزمایشی

در این مطالعه، سه ژنوتیپ گندم به نام‌های افلاک (مقاوم به شوری)، سیروان (حساس به شوری) و ارگ (نسبتا مقاوم به شوری) از موسسه تحقیقات نهال و بذر تهیه شده و سپس در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل شده اتاقک رشد دانشکده 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^{-1}) تحت آبیاری قرار گرفتند. گلدن‌ها تحت شرایط ۷۰ درصد رطوبت، ۲۲ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۲ الی ۱۴ ساعت در اتاقک رشد نگهداری شدند. نمونه‌برداری در مرحله پر شدن دانه و ۷۰ روز بعد از تنش از برگ‌های سبز گیاه انجام شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

محتوای RNA حاضر در برگ به کمک معرف ترایزول و بر اساس دستورالعمل ارائه‌شده 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 ورتکس و سانتریفیوژ، فاز رویی جدا شد و به آن کلروفرم اضافه شد. به منظور بررسی کیفیت و کمیت RNA به‌ترتیب از ژل آگارز ۱ درصد و نانو دراپ استفاده شد. در ادامه، mRNA به کمک کیت Oligotex mRNA Mini Kit و بر اساس دستورالعمل ارائه‌شده توسط شرکت QIAGEN استخراج شد. کمیت mRNA با استفاده از نانودراپ 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 dT، 2 میکرولیتر dNTP، 5 میکرولیتر 5X Reaction buffer، 1 میکرولیتر آنزیم ریورس ترانسکریپتاز، 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 برای سنتز رشته دوم cDNA استفاده شد (۱۲).

آنالیز 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 *Mse*I و *Eco*RI هضم شد. محصولات حاصل از هضم به آدپتورهای ذیل دوخته شدند:

*Eco*RI adapter, 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'

*Mse*I adapter, 5'-GACGATGAG TCCTGAG-3', 3'-TACTCAGGACTCAT-5'

مرحله پیش‌تکثیر با استفاده از پرایمر *Mse*I (MPPC: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3') و *EcoRI* (EPPC: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3') 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 پیش تکثیر، مرحله تکثیر انتخابی با استفاده از هشت ترکیبی پرایمری از *Eco*RI/*Mse*I 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 نقره برای آشکارسازی باندها بر روی ژل استفاده شد (۱۳).

جداسازی، تکثیر مجدد و توالی‌یابی 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 اکریل آمید جدا شدند. باندهای موردنظر جداشده از ژل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر رقیق شدند. سپس، از ۲ میکرولیتر DNA همراه با آغازگرهای انتخابی به عنوان الگویی 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 توالی‌یابی شدند. آنالیز توالی‌یابی از طریق BLASTX در مقابل GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) انجام شد. 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 دهند. برای هر خزانه نیز سه تکرار تکنیکی لحاظ شد و از میانگین آنها برای برآورد فراوانی نسبی رونوشت‌ها استفاده شد. استخراج RNA و سنتز cDNA مطابق با توضیحات بخش قبلی اجرا شد. واکنش Real-time PCR به ۱۰۰ میکرولیتر رقیق شد و سپس از ۲ میکرولیتر بعنوان الگو برای اجرای واکنش با SYBR Green (شرکت 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 کاملا تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل‌شده اتاقک رشد انجام شد. آنالیز آماری به کمک ANOVA و آزمون چند دامنه‌ای

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]
[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]

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 ۲۶۹ TDF شد که ۳۱ عدد از آنها به طور افتراقی بیان شدند. نتایج Real-time PCR نشان داد که از تعداد ۲۲ TDF موردنظر، چهار عدد با کاهش بیان و ۱۸ عدد با افزایش بیان همراه بودند (شکل ۱). بعد از جداسازی باندها از روی ژل، تکثیر مجددا و توالی‌یابی انجام شد.

انتصاب TDFs دارای بیان افتراقی به گروه‌های کارکردی

بعد از توالی‌یابی، TDFهای شناخته‌شده 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.

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

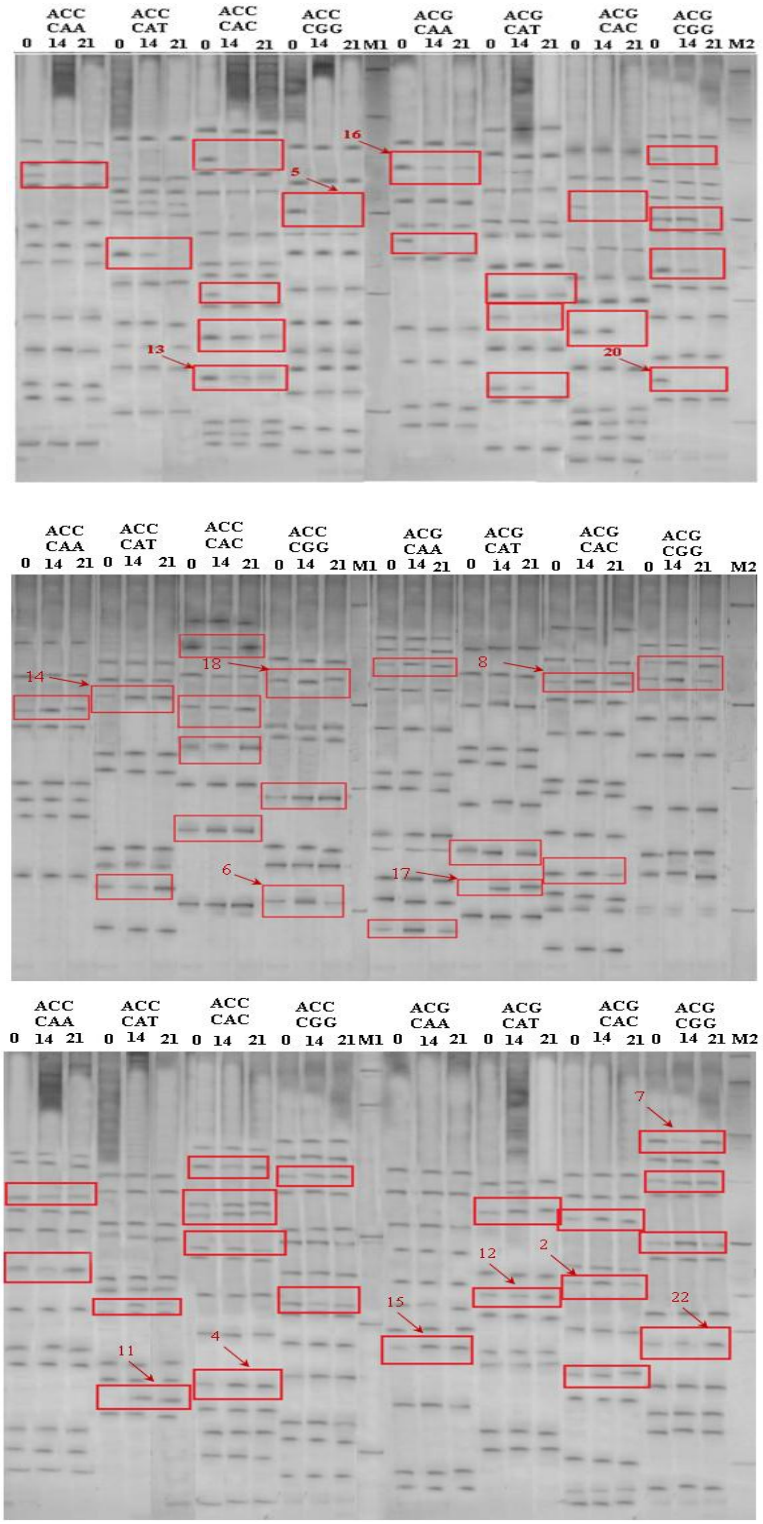
نتایج cDNA-AFLP				نتایج Real-time PCR				نتایج cDNA-AFLP				نتایج Real-time PCR			
شماره قطعه رونوشت	نام ژن که با رونوشت موردنظر همولوژی داشت	E value	ارقام	نوع بیان ژن	سطوح شوری با تغییر بیان ژن	شماره قطعه رونوشت	نام ژن که با رونوشت موردنظر همولوژی داشت	E value	ارقام	نوع بیان ژن	سطوح شوری با تغییر بیان ژن
*۱	–	-	–	–	–	۱۷	Sulfatepermease 1 (sfp1), transcript variant X5	2e-33	سیروان	افزایش	۱۴ و ۲۱
۲	Dehydration responsive factor 1	1e-56	سیروان	افزایش	۱۴ و ۲۱	۱۸	Spontaneum calcineurin B-like protein 3 (CBL3)	5e-09	ارگ	افزایش	۱۴ و ۲۱
۳	Cysteine proteinase	3e-22	ارگ	افزایش	۱۴ و ۲۱	۱۹	Spontaneous high-affinity K+ transporter 4	4e-21	افلاک	افزایش	۱۴ و ۲۱
**۴	Strain DSM 15391	3e-16	–	–	–	۲۰	Partial mRNA for td2IL1 protein	5e-33	سیروان	کاهش	۱۴ و ۲۱
*۵	–	-	–	–	–	۲۱	Dehydrin	53-17	–	–	۱۴ و ۲۱
۶	Ribosomal RNA adenine dimethylase	1e-35	افلاک	افزایش کاهش	۱۴ ۲۱	۲۲	NAC transcription factor NTL5 (NTL5)	2e-17	ارک	کاهش افزایش	۱۴ ۲۱
*۷	–	-	–	–	–	**۲۳	Chromosome 4 PCR sequence AGI.1227 genomic sequence	3e-11	–	–	–
۸	Zinc finger protein	4e-10	ارگ	افزایش	۱۴ و ۲۱	**۲۴	Chromosome 2 sequence	5e-09	–	–	–
*۹	–	-	–	–	–	۲۵	Clone 19 WRKY transcription factor (WRKY) mRNA	2e-18	افلاک	افزایش	۱۴ و ۲۱
*۱۰	–	-	–	–	–	۲۶	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-2	3e-24	افلاک	افزایش	۱۴ و ۲۱
۱۱	Kinase with tetratricopeptide repeat domain-containing protein	2e-08	ارگ	افزایش	۱۴ و ۲۱	۲۷	Phosphoenolpyruvate carboxylase 3 (PPC3)	3e-89	افلاک	کاهش	۱۴ و ۲۱
۱۲	Plasma membrane-associated cation-binding protein 1	4e-40	ارک	کاهش افزایش	۱۴ ۲۱	۲۸	DNA glycosylase superfamily protein (AT1G19480)	1e-35	سیروان	افزایش	۱۴ و ۲۱
۱۳	High-affinity potassium transporter	3e-25	ارگ افلاک	کاهش	۱۴ و ۲۱	۲۹	Ubiquitin (WUB1)	4e-36	ارگ	افزایش	۱۴ و ۲۱
۱۴	Fra2	3e-20	سیروان	افزایش	۱۴ و ۲۱	۳۰	bZIP transcription factor	2e-54	ارگ	افزایش	۱۴و۲۱
**۱۵	HKT protein	3e-04	افلاک	افزایش	۱۴ و ۲۱	۳۱	Dehydrin Rab18-like	2e-56	سیروان	افزایش	۱۴و۲۱
۱۶	bZIP transcription factor 44-like	5e-39	سیروان	کاهش	۱۴ و ۲۱						

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

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]



شکل ۱- محصول cDNA-AFLP بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ با استفاده از ۸ ترکیب آغازگری متفاوت برای ارقام گندم. M1) سایز ماکر۵۰bp؛ M2) سایز ماکر۱۰۰bp؛ ۰) تمونه تنش‌نخورده؛ ۱۴) نمونه تنش‌خورده شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر؛ ۲۱) نمونه تنش‌خورده شوری ۲۱ دسی‌زیمنس بر متر

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]
[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]

اعتبارسنجی بیان ژن‌ها به کمک Real-time PCR

آنالیز بیان ژن با تکنیک Real-time PCR نشان داد که برخی TDFها با کاهش بیان (شماره‌های۱۳، ۱۶، ۲۰ و ۲۷) و برخی TDFها با افزایش بیان (شماره‌های ۲، ۳، ۶، ۸، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۲، ۲۵، ۲۶، ۲۸ تا ۳۱) همراه بودند (شکل ۲). نتاج نشان داد که ۱۸ TDF از ۲۲ TDF دارای الگوی بیان مشابه مابین دو تکنیک cDNA-AFLP و Real-time PCR بودند. به عبارتی،Real-time PCR حدود ۸۰ درصد TDFها را تایید کرد.

انتقال یا ترانسپورت

TDFهای شماره ۱۳، ۱۵ و ۱۹ دارای همولوژی با ترانسپورتر K^+-uptake (HAK) بودند که جذب پتاسیم را تسهیل می‌کند. این ترانسپورتریک عملکرد اساسی در انتقال پتاسیم دارد و قادر است تا هموستازی را در گیاه حفظ کند (۱۳). مشخص شده است که نقش طبیعی HAK، مهار رقابتی یون‌های سدیم از طریق به اشتراک گذاری مسیر انتقال بین دو کاتیون K^+ و Na^+ است (۱۷). از آنجایکه عملکرد HAK در جذب K^+ و Na^+ 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 cDNA-AFLP و PCR زمان واقعی در ارقام مقاوم افلاک و نسبتا مقاوم ارگ پیشنهاد می‌کند که این ژن‌ها احتمالا در انتقال پتاسیم و تحمل شوری نقش دارند. در مطالعه ما، القاء ترانسپورتر HAK تحت شوری در گندم نشان داد که ممکن است HAK عملکرد مهمی در حفظ نسبت بهینه K^+ و Na^+ در سیتوسول سلولی و حفظ هموستاز یونی در گندم داشته باشد.

TDF شماره ۱۸ با پروتئین شبه‌بی کالسینورین ۳ (CBL3) مطابقت داشت. پیشنهاد شده است که حسگر کلسیم CBL3 به عنوان یک رابط مولکولی بین سیگنالینگ Ca^{2+} و V-ATPase (تعدیل کننده اصلی هوموستازی یونی داخل سلولی) عمل می‌کند (۱۸). در پژوهش ما، فعال‌سازی 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 غشا پلاسمایی (*PCAP*) همولوژی داشت. این ژن پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که نقش مهمی در تعدیل 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 نیکوتیانا بنتامیانا تنظیم می‌کند (۱۹). نتایج این مطالعه برای اولین‌بار نشان داد که *PCAP* در رقم نسبتا مقاوم ارگ تحت تنش شوری ۱۴ $dS\ m^{-1}$ دچار کم تنظیمی می‌شود درحالیکه در تنش شوری ۲۱ $dS\ m^{-1}$ دچار بیش تنظیمی می‌شود.

انتقال سیگنال

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/ترئونین در ارتباط است. بر اساس مشاهدات ما، این ژن در شوری ۱۴ $dS\ m^{-1}$ و ۲۱ $dS\ m^{-1}$ افزایش بیان داشت که این موضوع عملکرد پروتئین کیناز سرین/ترئونین را در مکانیسم‌های دفاعی گندم منعکس می‌کند (۲۰). پروتئین کینازها به عنوان یک جز کلیدی در انتقال سیگنال ناشی از تنش‌های 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 DREB، bZIP، NAC و WRKY بودند که اثبات شده است در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش دارند. بیان افتراقی فاکتورهای رونویسی DREB، bZIP، 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 DREB، bZIP، NAC و WRKY در پاسخ گندم به تنش شوری می‌باشد. به عنوان مثال، WRKY TF ها به جعبه W موجود در پروموتر ژن‌های میزبان متصل می‌شوند و اینگونه رونویسی را کنترل می‌کنند (۲۱). در گیاهان زراعی، چندین پروتئین WRKY در دفاع 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 لئو و همکاران (۱۱) نشان داده شده است. این موضوع حاکی از عملکرد خانواده پروتئینی یوبی‌کویتین در پاسخ گندم به شوری است. این خانواده پروتئینی در کنترل رشد و انطباق گیاه با شرایط استرس‌زای محیط نقش اساسی بر عهده دارند. تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که بیان بالای یوبی‌کویتین‌های گندم منجر به بهبود تحمل تنش‌های غیرزیستی در*Brachypodium distachyon* می‌شود که این موضوع ممکن است به دلیل بیان ژن‌های مرتبط با تنش، بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدان و تجمع مواد محلول سازگار باشد (۲۲).

TDF شماره ۳ با ژن پروتئیناز 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 پروتئینازهای سیستئینی از جمله پروتئازهای اصلی هستند که در حوادث پروتئولیتیک سلولی دخیل می‌باشند و منجر به پیری زودرس می‌شوند (۲۳). در پژوهشی، ژانگ و همکاران (۲۴) دو مهارکننده پروتئیناز سیستئینی را در آرابیدوپسیس به نام‌های AtCYSb و AtCYSa شناسایی کردند که تحمل سرما، خشکی و شوری را افزایش می‌دادند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]
[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]

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 مرتبط با پاتوژنز هستند که توسط یک حفره آبگریز شبه‌تونل 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، عملکردهای 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 سنتتاز قلمداد شد و در رقم مقاوم افلاک تحت غلظت 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 سنتتاز 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، شباهت با ژن DNA گلیکوزیلاز را نشان داد و بیان آن در رقم حساس سیروان تحت شوری در گندم القا شد. برخلاف نتایج ما، آنزیم DNA 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 فسفوانول پیروات (PEPC) را رمز می‌کند. PEPC، آنزیمی شدیدا تنظیم شده است که در نقطه اصلی شاخه متابولیسم کربن گیاه قرار دارد (۲۸). همانطور که قبلا 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 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 سولفات سلولی نقش دارد. خانواده سولفات پرمئاز عضوی از خانواده بزرگ حامل‌های ثانویه APC هستند (۳۰). در این تحقیق، برای اولین بار، افزایش بیان سولفات پرمئاز در رقم حساس سیروان تحت هر دو تیمار ۱۴ و ۲۱ دسی زیمنس در مترمربع NaCl نشان داده شد.

دیگر کارکردها

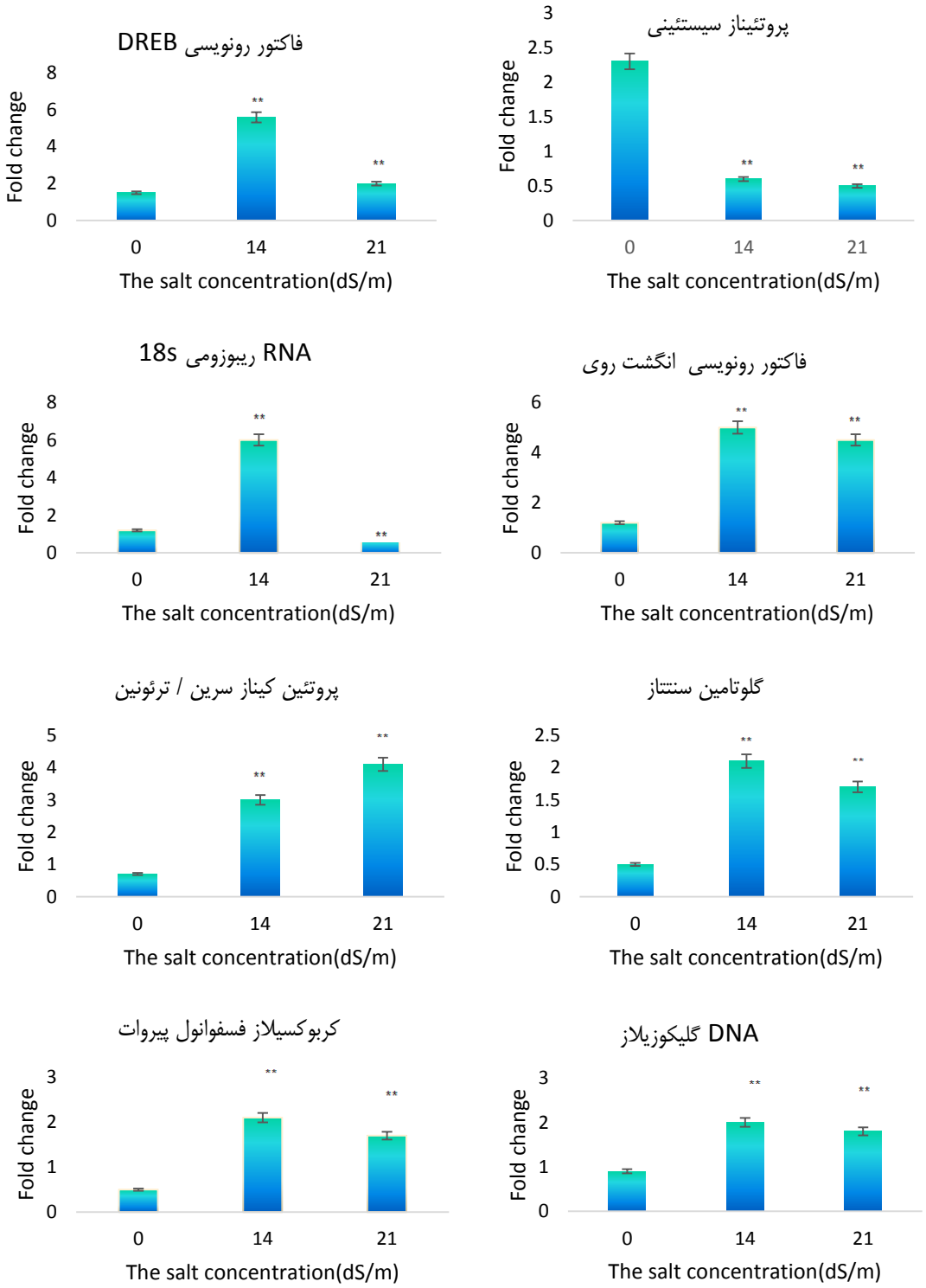
دسته جالب دیگری از ژن‌های شناخته شده در مطالعه حاضر شامل آن دسته از ژن‌هایی بودند که هیچ شباهت قابل توجهی با توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعات عمومی نبودند. تعداد متعددی از پژوهش‌های علمی رونوشت‌های با بیان افتراقی تحت تنش شوری را از طریق cDNA-AFLP و PCR زمان‌واقعی در سایر گیاهان شناسایی کرده‌اند (۱۴،۱۱). 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]

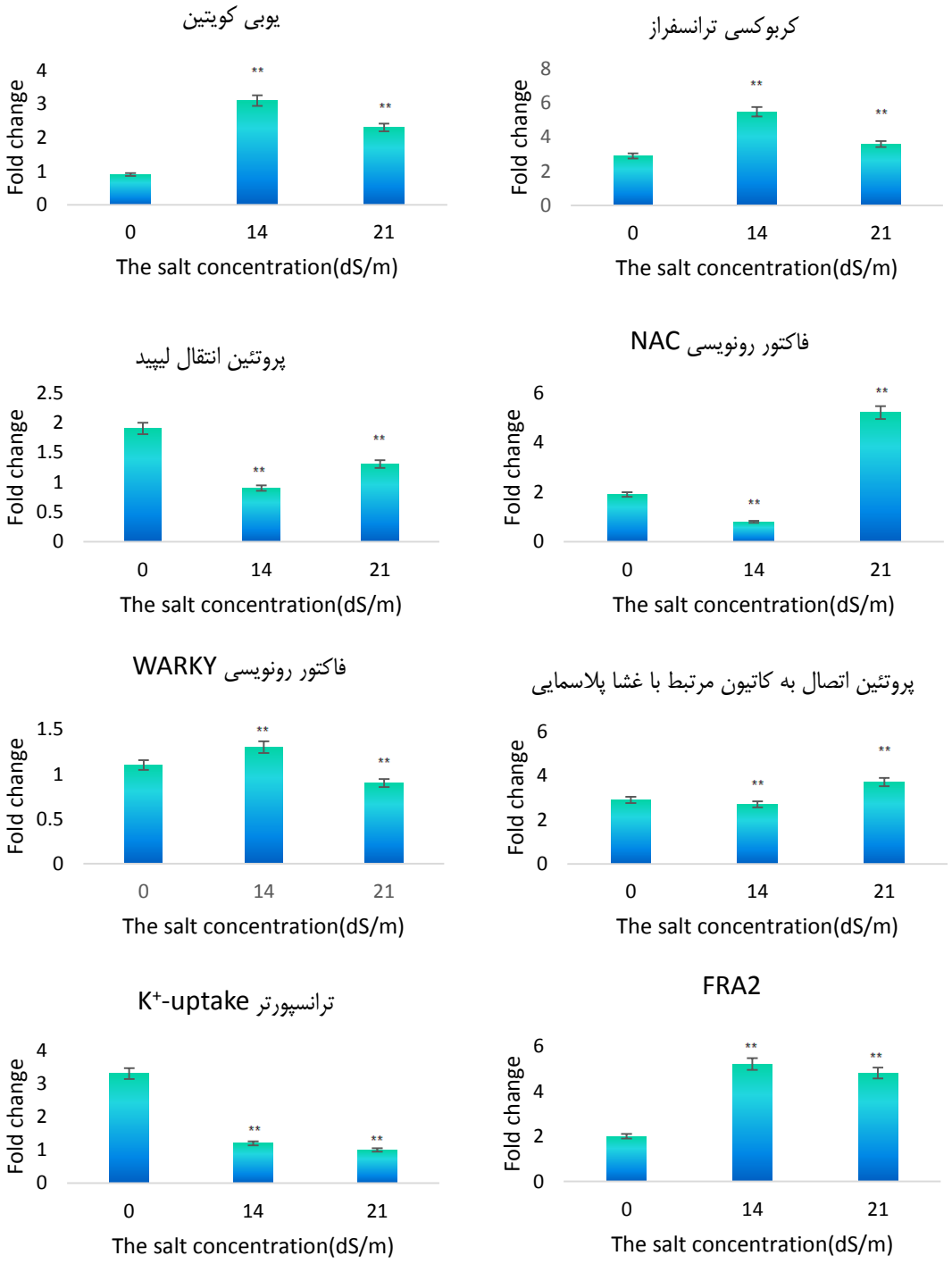


شکل ۲- اعتبارسنجی الگو بیان ژن‌های گندم تحت تنش شوری (بدست آمده با cDNA/AFLP) با استفاده از qRT-PCR. در اینجا، نرمال‌سازی داده‌ها با توجه به ژن مرجع توبولین انجام شد. علامت دو ستاره حاکی از معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ است.

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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]

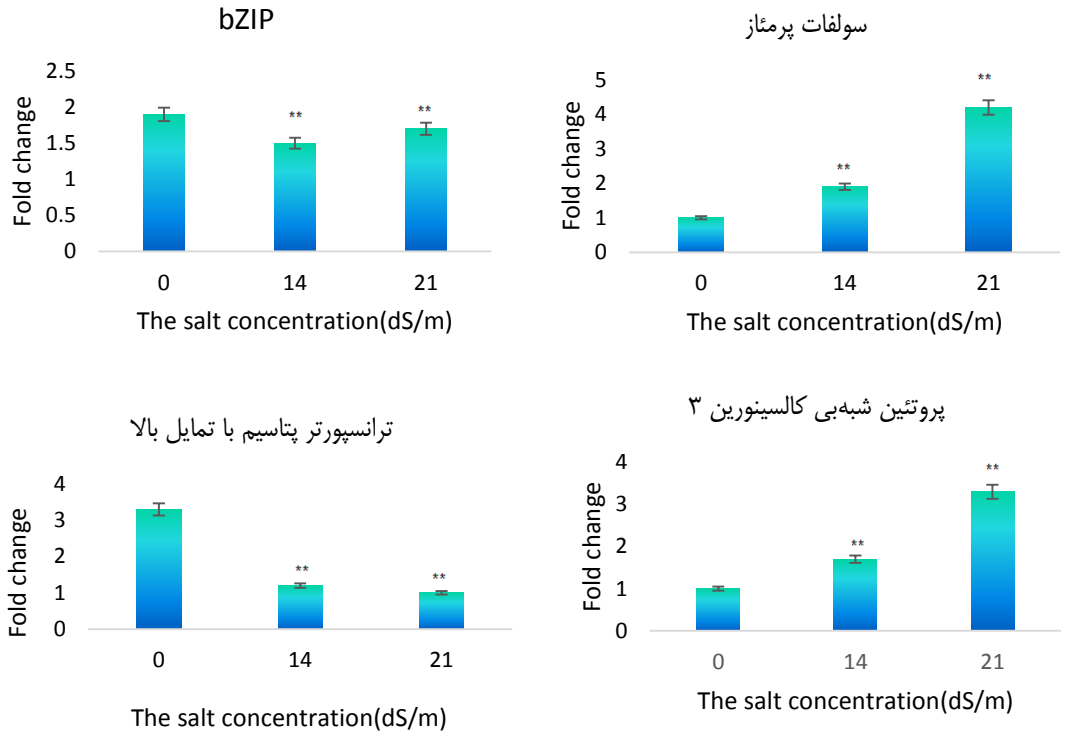


ادامه شکل ۲- اعتبارسنجی الگو بیان ژن‌های گندم تحت تنش شوری (بدست آمده با cDNA/AFLP) با استفاده از qRT-PCR. در اینجا، نرمال‌سازی داده‌ها با توجه به ژن مرجع توبولین انجام شد. علامت دو ستاره حاکی از معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ است.

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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]



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.

تشکر و قدردانی

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

منابع

1. Akladious, S.A. and 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. Šamajova, 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]

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. Shenkwen, 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. Zhanga, 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. 201 7. 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]

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

Shabnam Kamyab[1], Khalil Alami-Saeid[2,1], Mohammad Reza Eslahi[3,1] and Mohammad Moradi[4,1]

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.52547/jcb.13.39.41]