

## شناسایی و جداسازی دومین ایزوفرم رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمایی از جنس

### *Aeluropus*

عباس عالمزاده و عطیه خسروی

به ترتیب استادیار و دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

#### مقدمه

شوری خاک و آب آبیاری از عمده‌ترین عوامل محدود کننده رشد گیاهان در اکثر نقاط دنیا خصوصاً مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌باشد. امروزه ۲۰ درصد از زمین‌های کشت شده و حدود ۵۰ درصد از زمین‌های آبیاری شده‌ی دنیا تحت تأثیر اثرات زیان‌بار شوری قرار گرفته‌اند (Zhu, 2001). بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های جهان تحت تأثیر شوری می‌باشند که این مقدار بیش از شش درصد کل زمین‌های زراعی جهان است (Munns and Tester, 2008).

میزان تحمل شوری در گیاهان مختلف متفاوت است، این تفاوت در میان اعضا تیره‌های مختلف گیاهی، اعضا یک جنس، حتی در بین افراد گونه‌های کاملاً نزدیک به هم و همچنین رقم‌های یک واریته نیز دیده می‌شود. تحمل شوری به توانایی گیاه در کامل کردن چرخه زندگی و رشد در حضور غلظت‌های بالای نمک اطلاق می‌گردد بر اساس پاسخ گیاهان به شوری، گیاهان به دو دسته هالوفیت<sup>۱</sup> و گلیکوفیت<sup>۲</sup> تقسیم می‌شوند. هالوفیت‌ها به گیاهانی گفته می‌شود که بتوانند در غلظت‌های بالای نمک به حیات ادامه دهند. به گیاهانی که قادر نیستند در خاک‌های شور زندگی کنند گلیکوفیت می‌گویند (Parida and Das, 2005).

دستیابی به ارقام متحمل به شوری می‌تواند به عنوان یکی از راه‌حل‌های مقابله با این تنش مطرح باشد. با وجود تلاش‌های بسیاری که برای بهبود تحمل گیاهان به شوری انجام شده است موفقیت‌های به دست آمده در این زمینه چشم‌گیر نبوده است. یکی از راه‌کارهایی که در این زمینه صورت می‌گیرد، ایجاد گیاهان تراریخته متحمل به شوری است. از این‌رو شناسایی ژن‌های مؤثر در این سازگاری و بررسی الگوی بیان این ژن‌ها، مهم است. گیاهان جنس *Aeluropus* گیاهانی هالوفیت هستند که انتظار می‌رود پمپ پروتونی غشای پلاسمایی در آن‌ها در تحمل تنش شوری نقش داشته باشد (Barhoumi et al., 2007). طبق پژوهش‌های صورت گرفته مشخص شده که حدود ۱۰ ایزوفرم برای این ژن در این گیاه وجود دارد. ژن‌های رمز کننده این پروتئین می‌تواند یک نامزد مناسب برای انتقال به گیاهان زراعی به منظور افزایش تحمل این گیاهان به شوری باشد. به همین دلیل پروژه‌ای برای جداسازی دومین ایزوفرم رمز کننده این پروتئین در گیاه *Aeluropus littoralis* طراحی شد و با حمایت مالی پژوهشکده ملی مطالعات خشکسالی به مرحله اجرا درآمد.

<sup>1</sup>. Halophyte

<sup>2</sup>. Glycophyte

## ویژگی های گیاه هالوفیت انتخابی

گیاهان بیابانی ایران با شرایط زیستی دشوار این مناطق، طی سالیان دراز سازگاری یافته‌اند؛ در نتیجه دارای پتانسیل ژنتیکی گسترده‌ای برای تحمل تنش‌های غیر زیستی از جمله شوری و خشکی هستند. از جمله گیاهان این منطقه می‌توان از جنس *Aeluropus* نام برد که از خویشاوندان نزدیک گندم است. گیاهان این جنس به رده نهان‌دانگان و زیررده تک‌لپه‌ای‌ها تعلق دارند. این جنس از اعضای خانواده گندمیان است و به زیرخانواده کلروئیده<sup>۳</sup> تعلق دارد. گیاهانی چندساله، دارای ساختار ریزومی یا استولونی هستند. به خاکهای شور مناطق بیابانی سازگاری دارند و در نزدیکی دریاچه‌های نمک، سواحل و دهانه‌ی رودخانه‌ها و نهرهای شور و مرداب‌ها می‌رویند. این جنس گونه‌های متعددی را در بر می‌گیرد که به دو گونه‌ی علفی *A. littoralis* و *A. lagopoides* می‌توان اشاره کرد. بعضی از گیاهان این جنس نمک را به وسیله غدد نمکی به بیرون تراوش می‌کنند و بدین ترتیب شوری‌های زیاد را به خوبی تحمل می‌کنند (Waisel, 1972). فتوسنتز در این گیاهان از نوع C<sub>4</sub> است که به آن‌ها انعطاف‌پذیری بیشتری در برابر تنش‌های خشکی و شوری می‌دهد. گیاهان این جنس به علت مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و ملکولی ویژه‌ای که در پاسخ به تنش‌ها از خود نشان می‌دهند در این پژوهش استفاده خواهند شد. گونه‌ی *A. littoralis*، گیاهی پایا، دارای ریشه‌ی فیبری و ریزوم رونده‌ی افقی، ساقه‌ی ایستاده، خوابیده یا رونده، استولون‌دار به طول ۳۰ سانتی‌متر است. مرحله‌ی رشد رویشی از اوایل اسفند ماه تا اوایل خرداد ماه و مرحله‌ی بذرده‌ی از اواسط تیر ماه تا اوایل مرداد ماه ادامه دارد. پراکنش این گونه از تهران، شاهرود، آذربایجان، همدان، اصفهان، خوزستان، فارس، هرمزگان، کرمان، سیستان و بلوچستان، گرگان و گنبد گزارش شده است (اورسجی، ۱۳۷۵). گیاه *A. littoralis* یک گیاه هالوفیت، با مقاومت بالا نسبت به تنش شوری است که می‌تواند در غلظت یک مولار کلرید سدیم به خوبی جوانه بزند (Waisel, 1972).

## مواد و روش‌ها

بذور تهیه شده گیاه *A. littoralis* ابتدا ضدعفونی شده و سپس تحت شرایط هیدروپونیک کشت شدند. پس از اعمال شوری برگهای گیاهان برداشت شد و در همراه با ازت مایع سائیده شدند تا به صورت پودر درآمدند. سپس با استفاده از روش CTAB دی‌ان‌ای سلول‌ها استخراج شد. از سوی دیگر با استفاده از کیت، آران‌ای برگها نیز استخراج شده و از روی آنها cDNAs تهیه شد.

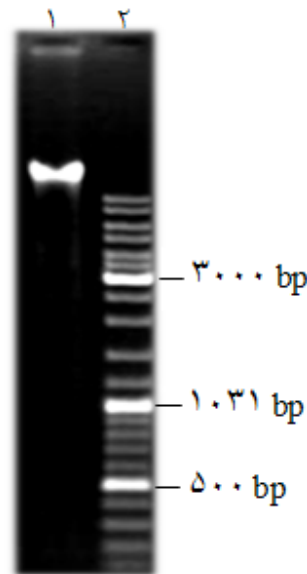
با همردیف کردن توالی ژن‌های رمز کننده این پروتئین در گیاهان مختلف، نواحی حفاظت شده مشخص و برای آنها آغازگر طراحی شد. سپس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده قطعی از یکی از ایزوفرم‌های رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمائی از ژنوم گیاه *A. littorali* تکثیر و برای توالی یابی به خارج از کشور فرستاده شد.

با استفاده از توالی مذکور آغازگرهای اختصاصی برای ژن مورد نظر طراحی شد و با استفاده از آغازگرهای

کیت RACE دو انتهای ژن و نواحی بالا دست و پائین دست ژن تکثیر و توالی‌یابی شد.

### نتایج و بحث

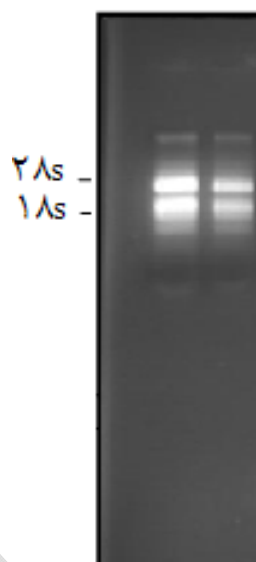
جهت بررسی کمی و کیفی دی‌ان‌ای ژنومی استخراج شده از برگ گیاه *A. littoralis*، یک میکرولیتر از دی‌ان‌ای استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. نتایج نشان دادند که دی‌ان‌ای مذکور از کیفیت خوبی برخوردار بوده و خرد نشده است (شکل ۱).



شکل ۱. استخراج دی‌ان‌ای ژنومی از برگ‌های گیاه *A. littoralis* (۱) دی‌ان‌ای استخراج شده از برگ با استفاده از روش CTAB (۲) نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.

به منظور تهیه‌ی cDNA برای جداسازی ناحیه رمز شونده ژن  $H^+-ATPase$ ، از برگ‌های گیاه *A. littoralis*، آرنا استخراج شد و کیفیت آرنا‌ی استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. کیفیت باندهای مربوط به آرنا‌ی ۲۸s و ۱۸s کاملاً واضح و مناسب بود که نشان می‌داد کیفیت آرنا‌ی استخراجی مناسب است (شکل ۲).

پس از توالی‌یابی مشخص شد که توالی قطعه تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اولیه مربوط به یک ژن رمز کننده پمپ پروتونی است (شکل ۳). با استفاده از این توالی و آغازگرهای مناسب تکنیک RACE توالی کل ژن شناسایی و جداسازی شد (شکل ۴). ناحیه رمز شونده این ژن ۲۲۵۶ جفت باز است و دارای یک ناحیه 5'-UTR با طول ۲۸۴ جفت باز در بالا دست آن و یک ناحیه 3'-UTR با طول ۴۰۱ جفت باز در پائین دست آن است (شکل ۴).



شکل ۲. آران ای استخراج شده از برگ گیاه *A. littoralis*

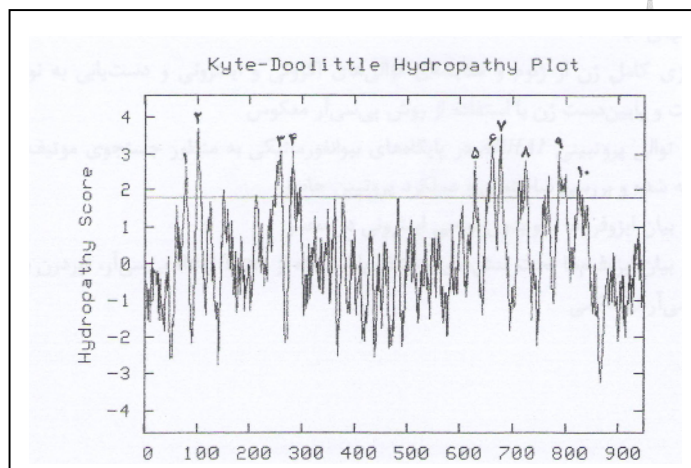
10	20	30	40	50	60
TTATGTAGCGACAGACAGGGACATTGACCCCTCAACAAACTCACCGTGGACACGGACCTCG	60				
TGGAGATCTTCGCTCGGGCATTGACAAAGACGACGTTATCCTGTTCGCCGCCAGGGCCT	120				
CCAGAGTGGAGAACAGGACGCCATTGACACCGCCATGGTCGGCATGCTCGCTGATCCCA	180				
AGGAGGCCGAGGCAAGGCATCGAGGAGGTGCACCTTCTCCCTTCAATCCCGTCGACAAGC	240				
GCACCGCCCTTACCTACATCGACCTCTCCGACGGCAGCTGGCACCGAGTCAGCAAGGCG	300				
CTCCTGAGCAGGTTATTGTCTATCTTTTAGATAAGTGAACAAAGTTCAGCCGGTTATT	360				
GTCTATCTATCACCATCATCTTGTCTATTGGCTTTGTTTTACTGTTTCCACACGTGGTTA	420				
GTAAATTCAGTGTGATGTCATGTCATGTAGATCTTGGATCTATGCAAACTGTACAGCAT	480				
ACATCAAGAAACAAGGTTTCAAGCTGTGATGAACAAGTACGCCGCAACACCGGCCTTAGA	540				
TCTCTCGCCGTCGCAAGAACAGGCATGAACATGAACATCCCTTAATTTTTTTATTACTT	600				
AAATAAAAAATAAATTTGGTCAGGAAGTCCCAAGAAAGCAAGGACAGCCCTGGAGG	660				
GCCATGGCAGTTCGTGCGCCTGATGCCTCTCCATGATCCTCCAAGGAGTGATAGCGCCCA	720				
AACCATCACACGTGCGCTTAACCTTGGTGTCAATGTGAAGATGATACTGGTATATTCTT	780				
CTCTTGGCCATCCAAAGTCTTACTGCTTTAAATCGACTTGAATAATTTTAGTTTGACATGA	840				
GCCTGTCCCTACAGGTGATCAGCTTCCCATGCAAGGAAACAGGAAGAGGCTCGGCA	900				
TGGGTACAAACATGTACCCCTCATCAGCGCTTCTTGGGCAGCACAGAGATGAATCCACCG	960				
CTTCAATCCCTGTGATGAATTGATTGAAAAGGCCGACGGCTTTGCCGGTGTCTTCCCTG	1020				
GTGAACACCACATAAGCAATTTTCATAGTTTGTTCAAAAAGAAATGGATAGTATATTCTCA	1080				
CGTTCTGCTTTTTTTTTTTTGTATGAGACAAAGTATGAGATAGTGAAGAAGCTGCA	1140				
GGAGATGAAGCACATCTGTGAATGACAGGCGACGGAGTCAACGACGC	1188				

شکل ۳. توالی نوکلئوتیدی قطعه تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اولیه.

GCTCTANCGACTCACTATAGGGAAAGCTTGCATGCAGGCCTCTGCAGTCGACGGGCCCGGGATCCGATTGGACAC  
TGACATGGACTGAAGGAGTAGAAATACGCCCCCACCATTTCTCCACTTCTCCTTCTCCTCCCCCGGGCGAAAG  
AGGAGAGAACCCAGAGCGTGCTCGCGTGCGGCATATGCTAGTGTTCCGGCTCCGGGTTCGGCTCTAGGTTCTGCT  
CCGTCCGGGGACCAACAGCGCACGCCGCTTGCTGTGCGGGTCCGCGCGCTTGTCCGCCATGGGTGGCTCGAGG  
AGATCAAGAATGAATCCGTGATCTGGAGAACATCCCCATGGAGGAGGTGTTTCGAGCAGCTGAAATGCACACGCG  
AGGGGCTGTCTCCGAAGAGGGGACGCAGCGTCTCCAAGTCTTCGGCCCCAACAGCTCGAGGAGAAAAAGGAGA  
GCAAAGTCTGAAGTTTTTGGGCTTCATGTGGAACCACTCTCGTGGGTTCATGGAGATGGCTGCCATCATGGCTA  
TTGCATTGCCAACGGAGGTGGCAAGCCCCCGGACTGGCAGGACTTCGTGCGTATCATCGTGCTCCTGGTCATTA  
ACTCCACCATTTCTTCATAGAGGAGAACAAATGCTGGCAACGCCGCTGCCGCTCTCATGGCTAACCTTGCCCCCA  
AGACCAAGGTGCTGAGGGATGGCCGATGGGGTGAGCAAGAGGCTGCAATATTGGTCCCTGGTGACATCATTAGTA  
TTAAGCTTGGTGACATCGTCCCTGCTGATGCTCGTCTCCTCGAGGGTGATCCCCCTCAAAGTTGATCAGTCTGCAC  
TGACTGGAGAGTCCCTCCCGGTGACCAAGGGCCCTGGTGACGAGGTATTCTCTGGCTCGACATGCAAGCAGGGTG  
AGATTGAGGCTGTGGTCATTGCCACCGGAGTGACACATTTTTTCGGCAAGGCTGCTCATCTTGTGGACAGCACCA  
ACCAGTTCGGCTCTTCCAACAGGTCCTCACTGCGATCGGGAACCTTCTGTATCTGCTTATTGCGGTTCGGCATCG  
TTATCGAGATCATCGTCATGTTCCCAATCCAGCACCGAAGGTACCGCAGTGGAATTGAGAACCTGTTGGTCTCT  
TGATCGGTGGTATCCCAATTGCCATGCCTACCGTGCTGTGTCAGTCACCATGGCCATTGGCTCTCACAAGCTGTAC  
AGCAGGGCGCCATCACTAAGAGGATGACTGCCATTGAGGAGATGGCTGGCATGGACGTGCTTTGCAGTGATAAGA  
CCGGCACACTCACCTTAACAAGCTCAGTGTGACAAGAACCTTGTGAGGTATTCGCAAAAGGTGTGACAAGG  
ACCATGTGCTGTTGTTGGCTGCAAGGGCCTCAAGGACTGAGAACCAGGATGCCATTGATGCTGCCATGGTGGGTA  
TGCTTGCTGACCTAAGGAGGCCAGAGCTGGCATCAGGGAGGTGCACCTTCTTGCCCTTCAACCCAGTTGACAAGA  
GGACTGCTCTGACGTACATTGATTCCGATGGCAACTGGCACCGTGCCAGCAAGGGTGCTCCTGAGCAGATTATTA  
CCCTTTGCAACTGCAGAGAGGATATGAAGAGGAAGGTGCACCTTATTATTGACAAGTACGCTGAGCGTGGGCTTC  
GTTCACTTGCTGTTGCTAGACAGGAAGTACCTGAGAAGACCAAGGAGTCTCCTGGCGGACCGTGGAATTCGTTG  
GTTTGTGCCCCGTGTTGATCCCCGAGGCATGACAGTGTGAGACTATCCGCAAGGCTCTGCATCTTGGTGTTA  
ACGTCGAGATGATCACTGGTGATCAGCTTGCCATTGGTAAAGAGACAGGAAGGAGGCTTGGCATGGGCACCAACA  
TGTATCCTTCTCTGCACTGCTGGGCCAAAACAAGGATGCTACACTTGAAGCACTTCTGTAGACGAGCTCATTG  
AGAAGGCTGATGGTTTTGCTGGAGTCTTCCCTGAGCATAAGTATGAGATCGTGAAGAAGTTACAAGAGAAGAAGC  
ACATTGTTGGTATGACTGGAGATGGTGTCAACGATGCCCCAGCTCTTAAGAAGGCCGACATTGGTATTGCTGTTG  
CCGATGCTACTGATGCTGCAAGGGGTGCTTCCGACATTGTCTCACTGAGCCAGGTCTTAGTGTCATTATCAGTG  
CTGTCTCACCAGCAGATGCATCTTCCAGAGGATGAAGAACTATACCATTACGCTGTTCCATCACCATCCGTA  
TTGTGCTTGGATTTTTGCTTATTGCTTTGATCTGGAATTCGATTTCGCACCTTCATGGTCTTATCATTGCCA  
TTCTCAATGATGGTATCATGACAATCTCTAAGGACAGAGTTAAGCCGTCCCCCTTGCCCTGACAGCTGGAAGC  
TGAAGGAAATCTTTGCTACCGGTATCGTTCTCGGGACATACCTTGCTATTATGACTGTGCTTTCTTCTGGGCCA  
TTCAACAAGACCGACTTCTTACGGAGAAATTCCGTGTGAGATCTATCAGGGACAGCGAGGATGAGATGATGGCTG  
CTCTGTACCTCCAAGTCAGTATTGTGAGTCAGGCTCTTATCTTCGTACCCGTTCCCGTAGCTGGTCTTTGTTG  
AACGCCCGGTGTGCTCCTGGTCACCGCGTTCTGCTCGCTCAACTGTGCGCCACACTCATGTGTATATGCCG  
ACTGGGGCTTCGCCAGGATCAAGGGCATCGGCTGGGGCTGGGCTGGTGTGCTGTGCTGTACAGCGTGGTTTTCT  
ACCTCCCGCTCGACGTGTTCAAGTTCCTAATCCGTTTCGCGCTGAGCGGCAGAGCTGGGACAATCTCTTGGAGA  
ACAAGACCGCGTTACCAACCAAAAAGGATTACGGTAGAGAGGAGAGGGAGGCGCAATGGGCTGCCGCGCAGAGGA  
CGCTCCACGGCTGCAGCCACCGGAGGTGGCTCCAACACTCTGTTCAACGAGAAGAGCAGCTACCGCGAGCTCT  
CGGAGATCGCTGAGCAGGCCAAGAGACGAGCTGAGATCGCGAGGCTGAGGGAGCTCAACACCTCAAGGGCCACG  
TCGAGTCAGTGGTGAAGCTCAAGGGGCTGGACATCGACACCATTCCAGCAAACTACACGGTG/TGAGACCGCCGGG  
ATGTCGACGAAACATCTCCTGCCGATTGGGACCGGATCTGAATCTGATTCAAGAAATTTTTCGGTGAAATCA  
ATCAAAACGTGTGGCTGATCTGACTGAACAGCCCCCTAGTTGTAAAGTCCATACCACCAGATACTGCTATATGATG  
GTATGGTTGGGTGCCCCATCCTTCTAGGGAATTTTTCACTTTACCGTTTTACTAGCGGAGTGCGCGTCTTGTAATC  
GTTTTGCGTTTTGTTTCTAACTACCCGATGATCTTGTGGAAGCAAGATGGAGAAATAATGCAAAAATTTTTCTGCC  
AAATGAACATGCACATTTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACACTGTTCATGCCGTTACGTAGCGAATCTAGA  
TGCATCGCAGGCAGCG

شکل ۴. توالی کل ژن رمز کننده پمپ پروتونی غشای پلاسمائی.

بر اساس شاخص کیت و دولیت و با استفاده از پایگاه اینترنتی <http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm> تعداد دامنه‌های درون غشائی پروتئین رمز شونده توسط این ژن ۱۰ عدد مشخص شد (شکل ۵).



شکل ۵. توالی دامنه‌های درون غشائی پمپ پروتونی رمز شده توسط ژن جداسازی شده.

با توجه به اینکه قبلاً مشخص شده است که فعالیت پمپ پروتونی غشای پلاسمائی در گیاهان هالوفیت یکی از دلایل اصلی تحمل این گیاهان به شوری است و پیشنهاد شده است که تفاوت ساختاری این پمپ بین هالوفیتها و گیاهان معمولی باعث تحمل هالوفیتها به تنش می‌شود انتظار می‌رود که بتوان طی پروژه‌های آینده با انتقال این ژن به یک گیاه زراعی مهم تحمل به شوری را در آن گیاه افزایش داد.

**کلمات کلیدی:** پمپ پروتونی غشای پلاسمائی، آلرپوس لیتورالیس، جداسازی ژن