

جداسازی و توالی‌یابی ژن مربوط به آنتی‌پورتر هیدروژن / سدیم غشای واکوئلی گیاه هالوفیت (*Kochia scoparia* L.)

Isolation and Sequencing of Gene Related to Na⁺/H⁺ Anti-porter of Vacuolar Membrane Isolated from Halophytes Plant (*Kochia scoparia* L.)

فاطمه غریبی^۱، لیلا فهمیده^{۲*} و زیبا فولادوند^۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۰

چکیده

در این پژوهش از گیاه دولپه‌ای و شورزی کوشیا (*Kochia scoparia*) به‌عنوان منبع برای جداسازی ژن استفاده شد. ابتدا با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در مناطق حفاظت‌شده این ژن در گیاهان هم‌خانواده، طول ۱۶۰۵ نوکلئوتیدی و توالی ۵۳۵ اسیدآمینه‌ای از توالی کدکننده این ژن شناسایی و توالی‌یابی شد. با استفاده از آنالیز BLAST میزان شباهت این توالی با ۸۷٪-۹۰٪ همولوژی در سطح نوکلئوتیدی و ۹۹٪-۹۸٪ در سطح اسیدآمینه‌ای با ژن‌های NHX گیاهان خانواده اسفناجیان تعیین شد. آنالیزهای تعیین خصوصیات پروتئینی و ارتباط آن با پروتئین‌های دیگر با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیکی انجام شد. براساس وجود ساختارهای دوم پروتئینی مشخص شد که در پلی‌پپتید موردبررسی، ۱۱ مارپیچ آلفا در ناحیه گذرنده از غشا وجود دارد و اسیدآمینه‌هایی با خصوصیت آب‌گریزی در ناحیه گذرنده از غشا واقع شده است و در ادامه انتهای کربوکسیلی با تعداد کمتری مارپیچ آلفا و میزان آب‌دوست بودن بالا به‌عنوان ناحیه سیتوپلاسمی پروتئین موردنظر مطرح می‌شود. این نتایج نقش دفع سدیم توسط ناقل‌های غشای پلاسمایی را برای وجود واکنش مقاومت به شوری در گیاه کوشیا تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی: سدیم سیتوزولی، شوری، کوشیا، ناقل‌های غشای پلاسمایی

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۲. دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۳. مربی پژوهشی، پژوهشکده کشاورزی و زیست فناوری دانشگاه زابل، ایران

* نویسنده مسوول
Email: l.fahmideh@uoz.ac.ir

کوشیا (*Kochia scoparia* L.) گیاهی از خانواده کنوپودیاسه، یک‌ساله، شورزیست، مقاوم به خشکی و بومی آسیا است چنرچ و همکاران (Chanroj *et al.*, 2012) که می‌تواند با آب شور آبیاری شده (۳۴ دسی‌زیمنس بر متر) و منبع ارزشمندی از علوفه را با تنوع ژنتیکی بالا و پتانسیل بسیار مناسب در اکوسیستم‌های تحت تنش شوری و خشکی تولید نماید جامی آل‌احمدی و کافی؛ مولینکس (Jami Al Ahmadi and Kafi, 2008; Mullinex, 1998). کوشیا به‌عنوان یک گیاه علوفه‌ای خوش‌خوراک شناخته شده است فیشر و همکاران (Fischer *et al.*, 2000). این گیاه به‌عنوان یک سوخت زیستی نیز مناسب می‌باشد، چون تداخلی با تولید غذا و علوفه در اراضی مستعد ندارد و زیست‌توده قابل‌توجهی تولید می‌کند کرنان و همکاران (Kernan *et al.*, 2010). اخیراً جزئیاتی در ارتباط با تحمل به شوری توده‌های مختلف ایرانی کوشیا منتشر شده که بیانگر این است که این گیاه پتانسیل بسیار مناسبی برای تولید علوفه دارد نباتی (Nabati, 2010). قابل‌ذکر است که این گیاه به‌عنوان یک گیاه دارویی در مجامع بین‌المللی از جمله در کشور کره‌جنوبی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعات از میوه‌های این گیاه در فرآیندهای مربوط به سیستم ایمنی و تأثیرگذاری آن از طریق غیرفعال‌سازی فاکتور رونویسی NF_KB استفاده شده است کافی و همکاران؛ سلیمانی و همکاران (Kafi *et al.*, 2010; Soleimani *et al.*, 2008).

شوری یکی از بزرگ‌ترین محدودکننده‌های تولید محصولات کشاورزی است /مجد و همکاران (Amjad *et al.*, 2008). براساس نتایج بررسی‌های به‌عمل‌آمده ۲۰ الی ۳۰ درصد زمین‌های تحت آبیاری جهان به‌طور نامطلوبی تحت تأثیر شوری قرار دارند مات و وانگ (Mott and Wang, 2007). شوری زیاد صدمات جبران‌ناپذیر فیزیولوژیکی از جمله کاهش پتانسیل اسمزی، کاهش گسترش برگ، کاهش فتوسنتز، بسته‌شدن روزنه‌ها، اختلال در جذب یون‌های ضروری مانند پتاسیم و کلسیم و اثرها سمی بر روی غشاها و سیستم‌های آنزیمی گیاهان عالی ایجاد می‌کند سنگام و همکاران؛ مونس (Sangam *et al.*, 2005; Munns, 2000). یک‌سری مطالعات سیستماتیک برای ژن‌های مقاوم به شوری، ناشی از غربالگری ژنتیکی در مؤسسه ژئو انجام شد وو و همکاران؛ لیو و ژو و همکاران (Wu *et al.*, 1996; Liu and Zhu, 1997; Zhu *et al.*, 1998). پژوهش‌ها نشان داد، بعد از شبیه‌سازی توالی بر اساس نقشه و همچنین تجزیه و تحلیل عملکردها، در میان پنج پروتئین SOS، ژن‌های SOS1، SOS2، SOS3 در مسیر

سیگنالی کاهش میزان ورود سدیم که از راهکارهای حفظ پتاسیم نسبت به سدیم در گیاهان تحت تنش شوری است، دخالت دارند ژو؛ چینوسامی و همکاران (Zhu, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2005).

محصولات زراعی تحت تأثیر انواع تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده قرار می‌گیرند/مجد و همکاران (Amjad *et al.*, 2008). از میان تنش‌های غیرزنده، شوری یکی از بزرگ‌ترین محدودکننده‌های تولیدات گیاهی می‌باشد زینگو و همکاران (Xingyu *et al.*, 2010). شوری علاوه بر تنش اسمزی، با افزایش غلظت درون‌سلولی یون‌های مخرب سدیم و کلراید منجر به سمیت یونی می‌شود. غلظت‌های بالای نمک باعث عدم تعادل هیدروفوبیک-الکترواستاتیک بین نیروهای پایدارکننده و در نتیجه مهار فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها می‌گردد بیرمان و همکاران (Birman *et al.*, 1990). جداسازی سدیم در واکوئل یک استراتژی مهم و مقرون‌به‌صرفه برای کاهش مقدار سدیم سیتوزولی است، که به تنظیم اسمزی سلول برای جذب آب و تورژانس و گسترش سلول کمک می‌کند چن و همکاران (Chen *et al.*, 2002). آنتی‌پورتهای سدیم/هیدروژن (NHXs) در موجودات مختلف ایزوفرم‌های متفاوتی دارند و فرآیند انتقال سدیم و پتاسیم را با استفاده از نیروی ایجاد شده توسط شیب پروتون در غشای واکوئلی میانجی‌گری می‌کنند (زینگو و همکاران، 2010). دو مدل توپوشناسی مجزا برای ساختار NHX در گیاه آرابیدوپسیس (AtNHX1) ارائه شده است. براساس مدل اول، آنتی‌پورتر، شامل ۹ قطعه گذرنده از غشاء و انتهای کربوکسیلی هیدروفیلی که به سمت غشای داخل واکوئل می‌باشد. در مدل دوم این آنتی‌پورتر دارای چندین قطعه گذرنده از غشا است که خواص توپولوژی مشابه، انتقال‌دهنده کاتیون/پروتون (NEH1) در انسان را نشان می‌دهد روبرتو و همکاران (Roberto *et al.*, 2001). خصوصیت انتخابی AtNHX1 برای کاتیون توسط انتهای کربوکسیلی که با پروتئین (Calmodulin-like) CaM15 ارتباط برقرار می‌کند، تنظیم می‌شود. تعامل انتهای کربوکسیلی AtNHX1 با AtCaM15 وابسته به میزان کلسیم و pH داخل واکوئل است. در زمان اتصال با AtCaM15 فعالیت انتقال سدیم AtNHX1 کاهش پیدا می‌کند، درحالی‌که فعالیت انتقال پتاسیم تقریباً تغییر پیدا نمی‌کند یاماگوچی و همکاران (Yamaguchi *et al.*, 2005). با توجه به این‌که واکوئل‌های گیاهی معمولاً غلظت بالایی از کلسیم و pH اسیدی را در لومن خود دارند، AtNHX1 با اتصال به AtCaM15 یک آنتی‌پورتر هیدروژن/پتاسیم در شرایط عادی فیزیولوژیکی است /وکازاکی و همکاران؛ گرکو و همکاران؛ گروول و همکاران (Okazaki *et al.*, 1996; Gruwel

با به دست آوردن توالی ژن‌های آنتی‌پورتر غشای پلاسمایی موجود در این گیاه، راه را برای استفاده هرچه بیشتر از توانایی این گیاه فراهم آورد و دستاورد این تحقیق می‌تواند به پیشرفت برنامه‌های ایجاد مقاومت به شوری در گیاهان استراتژیک و زراعی کمک کند.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

به منظور تهیه مواد اولیه گیاهی مورد نیاز در این تحقیق، بذره‌های گیاه *K. scoparia* از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و به گلخانه پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل، منتقل گردید. پس از ضدعفونی سطحی، بذرها در ماسه شسته کشت شدند. ۴۵ روز پس از کشت به منظور افزایش سطح ترانسکریپتوم پاسخ‌دهنده به شوری در گیاه، تیمار شوری ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به مدت ۴۸ ساعت اعمال شد و سپس برگ‌های گیاه جهت استخراج RNA به تعداد سه نمونه از هر گیاه برداشت شدند نیکخواه و همکاران (Nikkhah et al., 2016).

طراحی آغازگرها

با توجه به این که هدف این تحقیق تعیین توالی ژن کدکننده *NHX* بود و تاکنون اطلاعاتی از این ژن در گیاه کوشیا در دسترس نبود، توالی‌های ژن مورد نظر در سایر گیاهان خانواده کنوپودیاسه موجود در پایگاه داده NCBI جمع‌آوری شد. به ترتیب و با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری (1- DNA STAR 3-GENE DOC و (EditSeq, 2-Meg- Align, Version 5.00 Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility Version 2.5.000) مناطق حفاظت‌شده این ژن در گیاهان هم‌خانواده که شامل جنس‌های کنوپودیم، آتریپلکس، سالوسا و سالیکورنیا مشخص شد و طراحی پرایمرها با انتخاب محل‌های مناسب در این مناطق و بر اساس اصول اولیه طراحی آغازگر انجام شد (جدول ۱). با توجه به طول تقریبی ۱۶۰۰ bp محل طراحی این آغازگرها به صورتی در نظر گرفته شد که ژن مورد نظر به صورت دو قطعه جدا از هم، ابتدا با استفاده از جفت پرایمرهای ۱ و ۲ جداسازی شود و برای سرهم‌بندی دو قطعه مورد نظر و فراهم نمودن توالی تمام نقاط ژن جفت پرایمر سوم به کار گرفته شد.

(et al., 2001; Greco et al., 2012). در شرایط تنش شوری، AtCaM15 از انتهای C- ترمینال AtNHX1 جدا و با افزایش فعالیت آنتی‌پورتر Na^+/H^+ باعث قلیایی شدن فضای واکوئل و افزایش ذخیره‌سازی سدیم در واکوئل می‌شود یاماگوچی و همکاران (Yamaguchi et al., 2005). لوسین ۲۹ و لوسین ۳۰ در AtNHX1 شبیه به لوسین ۱۱۰ و لوسین ۱۱۱ در دومین منطقه گذرنده از غشاء NHE1 می‌باشند، که یک منطقه فرضی برای تشکیل یک مسیر نقل‌وانتقال برای کاتیون است مایا و همکاران (Maya et al., 2011). جهش جایگزینی اسیدآمینه‌ای از سرین با پرولین در اسیدآمینه ۱۵۸ در منطقه اسیدآمینه ۱۹۳-۱۴۷ است، که یک منطقه بسیار حفاظت‌شده در میان آنتی‌پورترهای پستانداران (NHE1)، مخمر (Nhx1) و گیاهی (AtNHX1) است و شامل یک دمین متصل‌شونده به کاتیون است. جهش‌های جایگزینی اسیدآمینه تیروزین با پرولین در موقعیت ۲۴۱ و فنیل آلانین با لوسین در موقعیت ۲۴۲ نشان می‌دهد که این اسیدآمینه‌ها هیچ‌گونه نقشی در حمل‌ونقل کاتیون یا پروتون ندارند و از طرفی این جهش‌ها و حذف موجود در انتهای کربوکسیلی، تغییری در مکان‌یابی سلولی این آنتی‌پورتر ایجاد نمی‌کند ولی باعث تغییر در انتخابی بودن Na^+/K^+ می‌شود کای و همکاران (Kai et al., 2010).

گیاهان خانواده اسفنجیان (Chenopodiaceae)، برخلاف سایر گیاهان، برای رشد و ادامه حیات خود به سدیم نیاز دارند. این گیاهان با انباشتن یون‌های سدیم و برخی از یون‌های نمکی دیگر از جمله یون کلراید در بافت‌های خود، فشار اسمزی درونی خود را بالا می‌برند و بدین ترتیب می‌توانند علی‌رغم بالا بودن فشار اسمزی محیطشان (به دلیل شوری و کم‌آبی)، آب را جذب کرده و در سلول‌های خود ذخیره کنند. اجرای راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی در ایجاد مقاومت در گیاهان مهم، نیازمند انجام تحقیقات گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تنش می‌باشد. بنابراین گیاهان شورزیست می‌توانند به عنوان مدل‌های طبیعی برای ایجاد مقاومت به شوری در سایر گیاهان استراتژیک باشند. از آنجایی که بسیاری از گیاهان از لحاظ کشاورزی شیرین‌پسند هستند، مطالعه ژن‌های ویژه از گیاهان خویشاوند نزدیک می‌تواند به عنوان روش مؤثری جهت بهبود مقاومت به شوری این گونه محصولات با استفاده از فناوری‌های ژنتیک نوین باشد. لذا گیاه کوشیا می‌تواند به عنوان یکی از منابع جدید برای ژن‌های مقاومت به شوری مطرح شود تا بتوان

جدول ۱: اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده برای جداسازی ژن *NHX* از *K. scoparia*Table 1: Name and sequences of primer designed for *NHX* gene isolation from *K. scoparia*

ردیف Row	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (۳-۵) Sequences of primer (5-3)
1	P.NHX.S.FWD1	ATGTGGTCACAGTTAAGC
2	P.NHX.S.REV1	ATAAGCCATAAGCATCAT
3	P.NHX.S.FWD2	GTGAGGTTGCTTTAATG
4	P.NHX.S.REV2	CCAAATACAGGCCGCAT
5	P.NHX.S.FWD3	ACAGATTCTGTTTGCAC
6	P.NHX.S.REV3	CATAAGACCAGCCACCA

مرتبط با توالی اسیدآمینه‌ای کدشونده توسط ژن *NHX* در گیاه کوشیا با استفاده از الگوریتم (http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/) DIHED2 انجام شد. ساختار هیدروپاتی، جهت سنجش میزان هیدروفیل و هیدروفوب بودن قسمت‌های مختلف ساختار پروتئین پیش‌بینی شده برای ژن *K.S.NHX* با استفاده از پروتئین پیش‌بینی شده برای ژن *K.S.NHX* با استفاده از Pepwindow (http://www.ebi.ac.uk) به‌دست آمد. پیش‌بینی شبکه ژنی نیز با استفاده از پایگاه String db براساس اطلاعات ژنومی گیاه آرایی‌دوپیسیس تالیانا انجام شد.

نتایج

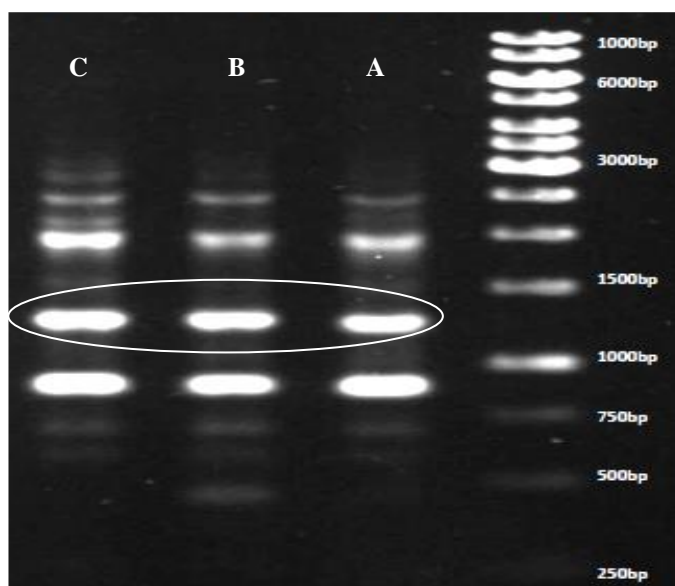
واکنش تکثیر قطعات ۱۶۰۰-۸۰۰bp و ۱-۸۰۰bp و ۴۰۰bp-۱۲۰۰ با استفاده از آغازگرها و نمونه cDNA برگ به‌عنوان الگو منجر به تکثیر قطعه‌های با اندازه‌های مورد انتظار شد (شکل ۱). قطعات DNA به‌دست‌آمده پس از استخراج از روی ژل، تعیین توالی شد و این توالی با شماره LC218451.1 در پایگاه NCBI ثبت شد و قابل‌دسترسی می‌باشند. تجزیه و تحلیل هم‌ردیفی با استفاده از امکانات برنامه BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) موجود در پایگاه داده‌ای NCBI در سطح نوکلئوتیدی انجام شد (جدول ۲) این نتایج نشان می‌دهد، ژن مورد بررسی، همولوژی بالایی در سطح DNA و اسیدآمینه با ژن‌های همتای خود در گونه‌های گیاهی دیگر دارد. بر این اساس در سطح نوکلئوتیدی دارای حداکثر ۹۰ درصد شباهت (جدول ۲) و در سطح پروتئینی دارای حداکثر ۹۹ درصد تشابه با گونه‌های موجود در جدول ۲ است. به‌منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی و تکاملی، درخت فیلوژنی براساس توالی‌ها رسم شد (شکل ۲).

استخراج RNA، ساخت cDNA و تکثیر ژن *K. S. NHX*

به‌منظور استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت دنازیست آسیا و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. جهت تعیین کیفیت و کمیت RNA از روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت First Strand Gene All و پرایمرهای برگشتی مربوط به هر قطعه انجام شد. cDNA سنتز شده، به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت سنتز DNA دو رشته‌ای و تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای موردنظر برای هر رشته استفاده شد. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز شامل: واسرشت اولیه ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه به‌صورت واسرشت‌سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای اتصال (مناسب برای جفت پرایمر موردنظر) و طول‌سازی ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و طول‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. قطعات به‌دست‌آمده با طول موردنظر با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل آگارز (شرکت دنازیست) جداسازی و خالص‌سازی شدند و برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره‌جنوبی ارسال شد.

آنالیزهای *In silico*

بعد از تعیین توالی قطعات موردنظر، سرهم‌بندی آن‌ها با استفاده از نقاط همپوشان و توسط نرم‌افزار SEQman موجود در بسته نرم‌افزاری DNA STAR انجام شد. این توالی‌ها با شماره‌های مربوطه (در بخش نتایج و بحث به آن‌ها اشاره شده است) در پایگاه NCBI ثبت گردید. براساس توالی به‌دست‌آمده رسم درخت فیلوژنتیکی به‌روش Clustal W، توسط نرم‌افزار Meg Align موجود در بسته نرم‌افزاری DNA STAR انجام شد. پیش‌بینی ساختار ثانویه با روش PSIPred و ساختار سوم پروتئینی، با روش SWISS Model و با استفاده از سرور Expasy Tools انجام گرفت. بررسی نمودار رامچاندوران



شکل ۱: تکثیر DNA قطعات با طول موردانتظار ۸۰۰bp، مربوط به ناحیه کدکننده آنتی پورتر غشای واکوتلی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و نمونه برگ در گیاه *Kochia scoparia*، نشانگر مولکولی مورد استفاده، DNA Ladder 1kb شرکت Fermentase می باشد. A: ترکیب پرایمری /P.NHX.S.FWD1.P.NHX.S.REV1، B: ترکیب پرایمری /P.NHX.S.FWD2.P.NHX.S.REV2، C: ترکیب پرایمری /P.NHX.S.FWD3.P.NHX.S.REV3

Fig. 1: DNA amplification with expected length 800bp, for coding sequences of vacuolar membrane antiporter with specific primer and leaf tissue from *K. scoparia*. DNA ladder 1kb Fermentase Company. A: Primer combination P.NHX.S.REV1/P.NHX.S.FWD1, B: primer combination P.NHX.S.REV2/ P.NHX.S.FWD2, C: primer combination P.NHX.S.FWD3/P.NHX.S.REV3.

با بررسی ساختار ثانویه در توالی آمینو اسیدی مشخص شد که در پلی پپتید مورد بررسی، ۱۱ مارپیچ آلفا در ناحیه گذرنده از غشا وجود دارد و اسید آمینه هایی با خصوصیت آبگریزی در ناحیه گذرنده از غشا واقع شده است (جدول ۳). نتایج آنالیز هیدروپاتی (شکل ۵) نشان داد که در توالی اسید آمینه ای ژن *NHX* جداسازی شده از گیاه کوشیا، نواحی گذرنده از غشا به صورت نواحی Helix و با هیدروفوبیسیته بالاتر دیده شدند و دم C- ترمینال که دارای هیدروفوبیسیته پایین تری است و دارای چندین مارپیچ کوچک شدند، میزان هیدروفوبیسیته آنها پایین تر از Helix های موجود در غشای تونوپلاستی است و انتهای C- ترمینال توالی پروتئین *NHX* که در قسمت سیتوپلاسم قرار گرفت و از ناحیه حدود ۴۴۰ تا انتهای پروتئین ادامه دارد، خاصیت هیدروفیلی دارد و در این ناحیه بیشترین میزان هیدروفیلی دیده شد. طبق نمودار (شکل ۵) مشاهده شده بیشترین میزان هیدروفوبیسیته آنها پایین تر از Helix های موجود در غشای تونوپلاستی است و انتهای C- ترمینال توالی پروتئین *NHX* که در قسمت سیتوپلاسم قرار می گیرد و از ناحیه خود ۴۴۰ تا انتهای پروتئین ادامه دارد، خاصیت هیدروفیلی دارد و در این ناحیه بیشترین میزان هیدروفیلی دیده می شود طبق نمودار مشاهده شده بیشترین

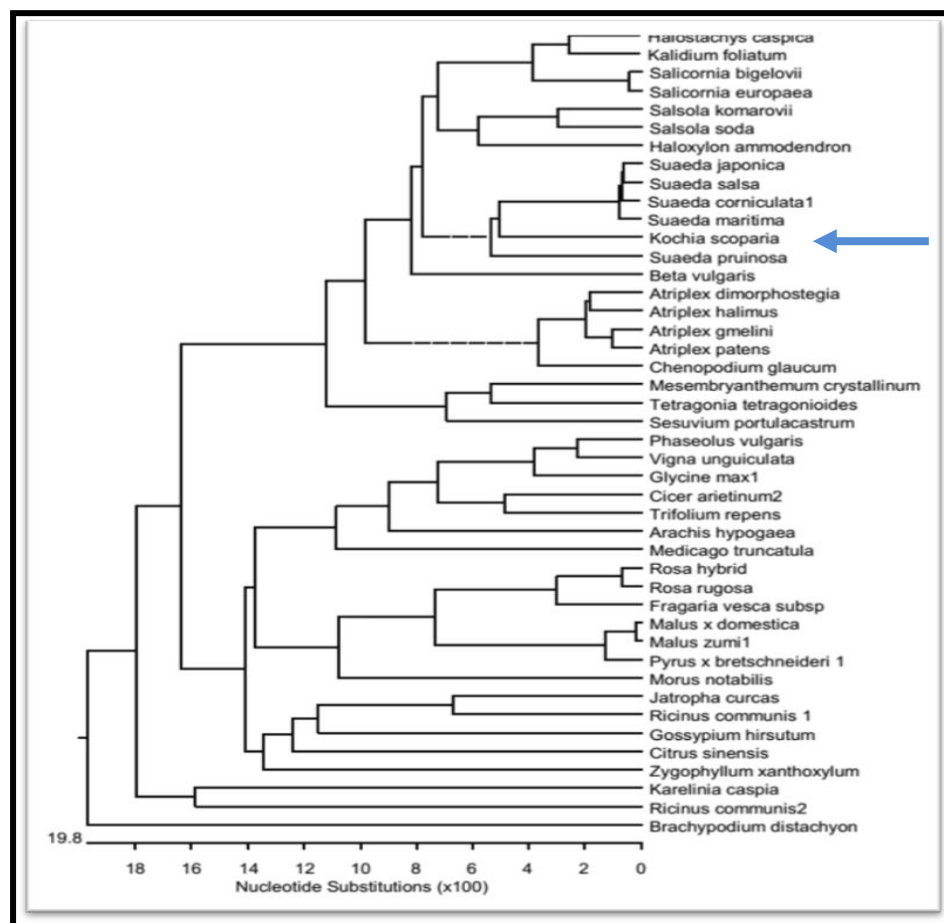
جایگاه ابتدایی در شکل ۳ به رنگ سبز جایگاهی است برای تشکیل مسیر انتقال کاتیون، که وجود دو اسید آمینه لوسین در آن تأیید می شود. در جایگاه دوم به رنگ زرد نیز یک دمین متصل شونده به کاتیون در اسید آمینه های ۱۹۳-۱۴۷ که در گیاهان و موجودات دیگر از جمله انسان و مخمر مشخص شده است تأیید می شود، که اسید آمینه مهم در این دمین حفاظت شده، سرین ۱۶۰ می باشد، جایگاه سوم مشخص شده به رنگ آبی، نیز جایگاهی است که در انتخاب سدیم/ پتاسیم توسط پروتئین *NHX* مؤثر است اما در همین منطقه یک جایگاه شبیه به این توالی وجود دارد که به جای والین، اسید آمینه تیروزین وجود دارد، که این جایگاه به عنوان یک جایگاه مهم و جدید در پروتئین کوشیا می تواند مطرح باشد (شکل ۳).

با توجه به توالی اسید آمینه ای، نتایج نشان دادند که بیش تر زوایای پیوندی *NHX* در ربع پایین سمت چپ و ربع بالا سمت چپ دیده شده است و تعدادی نیز در ربع سمت چپ بالا که نشان دهنده وجود ساختار دوم بتا B-sheet است که به ترتیب مربوط به ساختارهای مارپیچ آلفا و صفحات بتا می باشد که با توجه به ساختارهای دوم مورد انتظار برای آن دور از انتظار نبود (شکل ۴).

جداسازی و توالی‌یابی ژن مربوط به آنتی‌پورتر هیدروژن...

NHX است. این خصوصیات می‌توانند بر نحوه قرارگیری این پروتئین در غشای واکوئل تأثیر بگذارند.

میزان خاصیت هیدروفیلی توالی اسیدآمینه تقریباً در ناحیه ۴۴۰ قرار گرفته است و این نقطه شروع انتهای C- ترمینال ژن



موقعیت فیلوژنتیکی ژن *K.S.NHX* در گیاه کوشیا
Phylogenetic position of *K.S.NHX* gene in *K. scoparia*

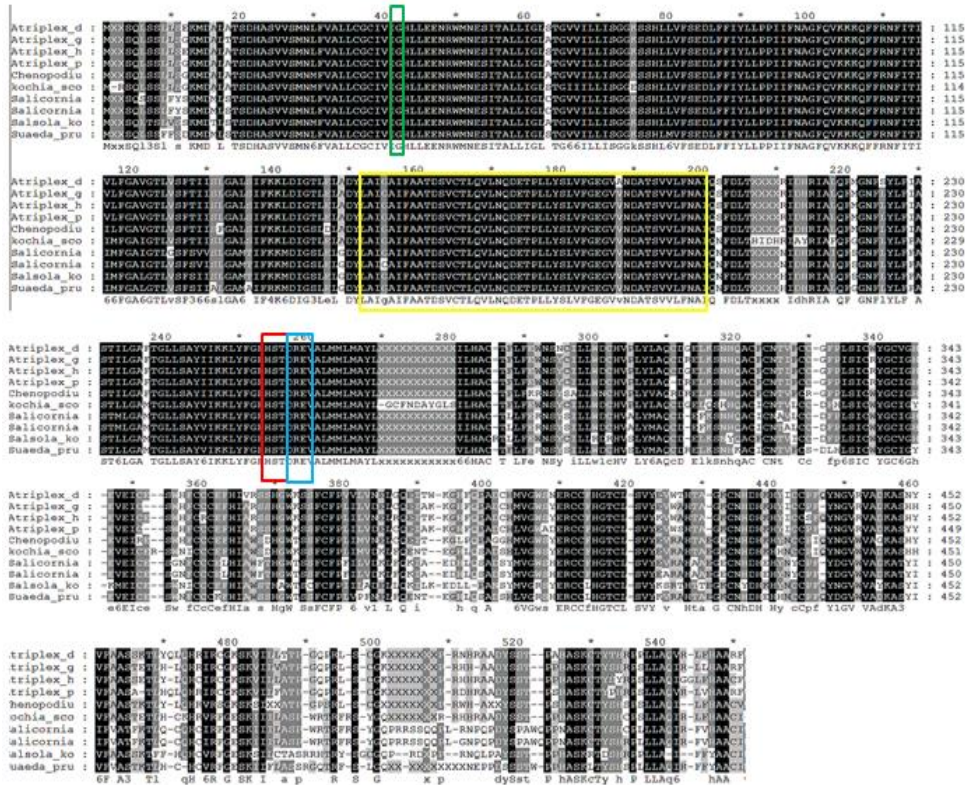
شکل ۲: درخت فیلوژنتیکی توالی پروتئینی ژن آنتی‌پورتر غشای واکوئلی جداسازی شده از *K. scoparia* با گونه‌های گیاهی مختلف با استفاده از نرم‌افزار MegAlign به روش Clustal W

Fig. 2: Phylogenetic tree based on amino acid sequences of vacuolar membrane antiporter isolated from *K. scoparia* used of MegAlign (Cluster W)

جدول ۲: نتایج تجزیه و تحلیل هم‌ردیفی ژن *NHX* جداسازی شده از *K. scoparia* با استفاده از برنامه BLAST

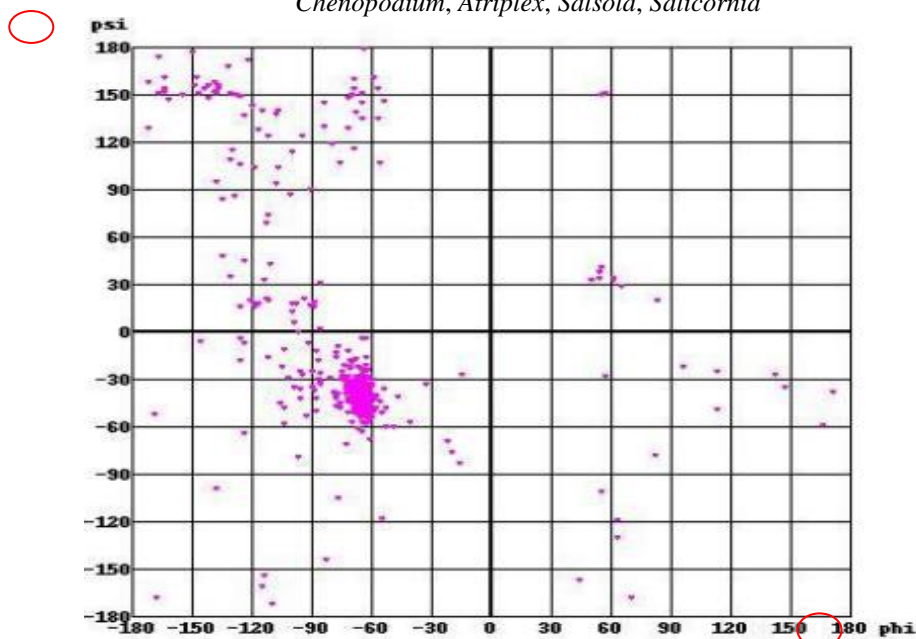
Table 2: Results alignment using by BLAST program for *NHX* gene isolated from *K. scoparia*

شماره Number	گونه گیاهی Plant species	شباهت Similarity
1	<i>Suaeda maritima</i>	90%
2	<i>Suaeda japonica</i>	89%
3	<i>Atriplex gmelini</i>	89%
4	<i>Suaeda comigulata</i>	89%
5	<i>Atriplex halimus</i>	89%
6	<i>Chenopodium glaucum</i>	89%
7	<i>Suaeda salsa</i>	89%
8	<i>Suaeda pruinosa</i>	88%
9	<i>Atriplex dimorphostegia</i>	88%
10	<i>Atriplex patens</i>	88%
11	<i>Halostachys caspica</i>	88%
12	<i>Salicornia europaea</i>	87%
13	<i>Salicornia brachiata</i>	87%



شکل ۳: جایگاه‌های مهم موجود در توالی پروتئینی ژن آنتی‌پورتر غشای واکوئلی جداسازی شده از *K. scoparia*. جایگاه سبز رنگ (منطقه فرضی برای تشکیل یک مسیر نقل و انتقال برای کاتیون)، جایگاه زرد رنگ (منطقه حفاظت‌شده شامل دمین متصل‌شونده به کاتیون)، جایگاه قرمز رنگ (جایگاه محتمل دخیل در انتخاب Na^+/K^+)، جایگاه آبی رنگ (جایگاه اصلی در انتخاب Na^+/K^+ در مقایسه با گیاهان هالوفیت جنس‌های *Salicornia*, *Salsola*, *Atriplex*, *Chenopodium*)

Fig. 3: Important positions in the sequences of genes isolated from vacuolar membrane Anti-Porter *K. scoparia*. The green (given region to form a path of transport of cations), the yellow (protected area of the domain binding cations), the red (Auto likely involved in the choice of Na^+/K^+), the blue (Auto in the Na^+/K^+) compared with halophytes genus *Chenopodium*, *Atriplex*, *Salsola*, *Salicornia*



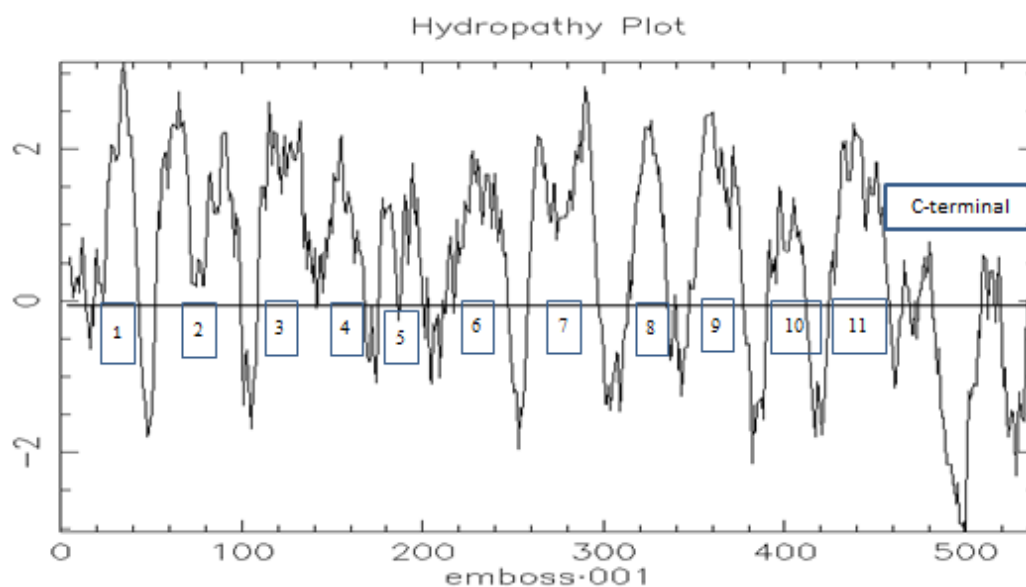
شکل ۴: نمودار رامچاندردان پیش‌بینی شده برای ژن آنتی‌پورتر غشای واکوئلی جداسازی شده از گیاه کوشیا. محور عمودی: زاویه psi (۱۸۰- تا ۱۸۰+) و محور عمودی: زاویه phi (۱۸۰- تا ۱۸۰+)

Fig. 4: Ramachandran plot of predicted vacuolar membrane antiporter genes in *K. scoparia*. The horizontal axis charts, angle phi (-180 to +180) and the vertical axis angle (-180 to +180) psi

جدول ۳: پیش‌بینی ساختارهای ثانویه موجود در نواحی مشخص اسیدآمینه‌ی مربوط به ژن *NHX* جداسازی شده از گیاه کوشیا

Table 3: Predicted secondary structures in certain areas of amino acid for *NHX* gene isolated from *K. scoparia*

منطقه مربوط به اسیدآمینه‌ها Region of amino acid	ساختار دوم پیش‌بینی شده Secondary structure predicted	منطقه مربوط به اسیدآمینه‌ها Region of amino acid	ساختار دوم پیش‌بینی شده Secondary structure predicted	منطقه مربوط به اسیدآمینه‌ها Region of amino acid	ساختار دوم پیش‌بینی شده Secondary structure predicted	منطقه مربوط به اسیدآمینه‌ها Region of amino acid	ساختار دوم پیش‌بینی شده Secondary structure predicted
1-21	پیچ Twist	147-154	مارپیچ Helix	283-284	پیچ Twist	413-427	پیچ Twist
22-45	مارپیچ Helix	155-161	پیچ Twist	285-295	مارپیچ Helix	428-440	صفحات بتا Beta sheet
46-50	پیچ Twist	162-169	مارپیچ Helix	296-305	پیچ Twist	441-442	مارپیچ Helix
51-69	مارپیچ Helix	170-177	پیچ Twist	306-335	مارپیچ Helix	443-448	پیچ Twist
70-84	پیچ Twist	178-182	صفحات بتا Beta sheet	336-351	پیچ Twist	449-456	مارپیچ Helix
85-90	مارپیچ Helix	183-189	پیچ Twist	352-353	صفحات بتا Beta sheet	457-521	پیچ Twist
91-93	پیچ Twist	190-202	مارپیچ Helix	354-378	مارپیچ Helix	522-523	صفحات بتا Beta sheet
94-97	صفحات بتا Beta sheet	203-209	پیچ Twist	379-392	پیچ Twist	524-527	مارپیچ Helix
98-110	پیچ Twist	210-249	مارپیچ Helix	393-398	صفحات بتا Beta sheet	528-539	پیچ Twist
111-139	مارپیچ Helix	250-257	پیچ Twist	399-402	پیچ Twist		
140-146	پیچ Twist	258-282	مارپیچ Helix	403-412	مارپیچ Helix		



شکل ۵: نمودار هیدروپاتی پروتئین پیشگوی شده مربوط به ژن *NHX* جداسازی شده از گیاه کوشیا. محور افقی: موقعیت

اسیدآمینه‌ها، محور عمودی: میزان هیدروفوبیسیته

Fig. 5: Hydropathy plot of predicted vacuolar membrane antiporter protein for *K.S.SOS* gene isolated from *K. scoparia*. The horizontal axis: amino acid position, the vertical axis: the hydrophobicity

اهداف ایجاد مقاومت در گیاهان مهم نیازمند انجام پژوهش‌ها گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تنش می‌باشد. یکی از این نمونه‌های بارز گیاهان شورزیست هستند که می‌توانند به‌عنوان مدل‌های طبیعی مقاومت به شوری مورد مطالعه قرار بگیرند، از آنجایی که یکی از عوامل مقاومت به شوری در گیاهان شورزیست مکانیسم‌هایی است که در آن، سدیم اضافی به خارج از سلول رانده می‌شود و عامل مؤثر در این روند آنتی‌پورترهای غشای پلاسمایی است، لذا با شناسایی این ژن در این گیاه و توالی‌یابی آن می‌توان در جهت بهره‌برداری هرچه بیشتر از آن در مسیرهای مقاومت به شوری استفاده کرد. نتایج این آزمایش نشان داد که جایگاه ابتدایی مشخص شده بر روی شکل منطقه فرضی برای تشکیل مسیر انتقال کاتیون وجود دارد که وجود دو اسیدآمینو لوسین در آن با توجه به همتای آن در گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا برای این روند تأیید می‌شود *مایا* و همکاران (Maya et al., 2011). در جایگاه دوم مشخص شده یک دمین متصل‌شونده به کاتیون در اسیدآمینوهای ۱۹۳-۱۴۷ که در گیاهان و موجودات دیگر از جمله انسان و مخمر مشخص شده است تأیید می‌شود، که اسیدآمینو مهم در این دمین حفاظت‌شده، سرین ۱۶۰ می‌باشد، که براساس شواهد جهش در منطقه می‌تواند باعث کاهش اتصال به کاتیون شود *کای* و همکاران (Kai et al., 2010). جایگاه سوم مشخص شده در شکل ۳، به رنگ آبی، جایگاهی است که در انتخاب سدیم/پتاسیم توسط پروتئین NHX مؤثر است *یاماگوچی* و همکاران (Yamaguchi et al., 2005). مدل‌سازی شبکه ژنی برای ژن NHX شناسایی شده با استفاده از گیاه آرابیدوپسیس انجام شد، در این شبکه ژنی چندین گروه ژنی مهم به چشم می‌خورد، اولین گروه از این ژن‌ها که در مجاورت ژن KEA، NHX، KEAها (K⁺ efflux antiporter) هستند که در بیرون راندن K⁺ نقش ایفا می‌کنند، این همکاری به این دلیل وجود دارد که در سلول‌ها همواره تنظیم میزان سدیم درون سلول همراه با تنظیم میزان پتاسیم درون سلولی است *سلیمانی* و همکاران (Soleimani et al., 2008). گروه دوم ژنی موجود در این شبکه ژنی گروه (Cation/H⁺ antiporter) CHX هستند، که در روندهای مربوط به انتقال کاتیون/پروتون نقش دارند، چون تنظیم تعادل سدیم سلولی به همراه تنظیم تعادل سایر کاتیون‌ها به‌عنوان یک تعادل پایدار عمل خواهد کرد *روبرتو* و همکاران (Roberto et al., 2001). در پژوهشی از گیاه کوشیا به‌عنوان منبع برای جداسازی ژن استفاده شد. بر همین اساس

با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده در مناطق حفاظت‌شده در گیاهان دیگر، طول تقریبی ۳۶۰۰ نوکلئوتیدی و به تبعیت از آن توالی ۱۲۰۰ اسیدآمینوهای از توالی کدکننده این ژن شناسایی و توالی‌یابی شد. میزان شباهت این توالی در سطح نوکلئوتیدی با حداکثر ۸۴ درصد همولوژی و در سطح اسیدآمینوهای ۹۲ درصد تأیید شد. با استفاده از مطالعات *In silico* منطقه حاوی مارپیچ‌های آلفای آب‌گریز به‌عنوان قطعۀ گذرنده از غشای پلاسمایی است و در مقابل آن دنباله با تعداد کم‌تر مارپیچ‌های آلفای و خاصیت آب‌دوستی به‌عنوان قطعۀ داخل سلولی پروتئین مطرح می‌شوند. در کل نتایج این پژوهش نقش دفع سدیم توسط ناقل‌های غشای پلاسمایی را برای وجود واکنش مقاومت به شوری در گیاه کوشیا تأیید نمود که با نتایج ما مطابقت دارد *نیکخواه* و همکاران (Nikkhah et al., 2016). ژن مهم دیگر در شبکه ژنی ارائه شده (*SOS3*)، *SOS3* (Salt Overly Sensitive) می‌باشد که اولین ژن در آبشار SOS برای تنظیم انتقال سدیم در غشای سلولی است و به‌عنوان یک پروتئین حسگر برای تغییر میزان کاتیون‌ها در سلول مطرح می‌باشد و از این لحاظ که یون سدیم ابتدا باید از غشای پلاسمایی عبور کند و سپس داخل سلول به داخل واکوئل حجره‌بندی شود، این پروتئین به‌عنوان پروتئین ابتدایی در این مسیر به‌عنوان یک پروتئین کلیدی مطرح می‌باشد *گرکو* و همکاران (Greco et al., 2012). از طرف دیگر یک‌سری از ژن‌هایی که در گروه (Sodium Transporter) HKT قرار می‌گیرند، در این شبکه وجود دارند که به‌عنوان پروتئین‌های منتقل‌کننده سدیم مطرح می‌باشند. چون با وجود نقش مهم آنتی‌پورترهای غشای واکوئلی، سرعت نقل‌وانتقال و میزان تمایل آن‌ها به یون سدیم پایین است، از این‌رو سلول پروتئین‌های دیگری از جمله گروه HKT را نیز برای این کار به خدمت می‌گیرد *برینی* و *مسمودی* (Brini and Masmoudi, 2012) و در نهایت ژن دیگر موجود در این شبکه (*Pyrophosphate-energized vacular membrane proton pump1*) *AVP1* می‌باشد، که به‌صورت هم‌زمان با NHX بیان می‌شود و به‌عنوان یک پمپ پروتونی که با استفاده از انرژی پیروفسفات فعالیت می‌کند، مطرح می‌شود *ساتو* و همکاران (Sato et al., 2005). وجود بیان هم‌زمان این پمپ با NHX به این دلیل است که فرآیند انتقال در غشای واکوئلی وابسته به شیب الکتروشیمیایی پروتون می‌باشد و در صورت نبود این شیب الکتروشیمیایی فعالیت آنتی‌پورتر متوقف خواهد شد، لذا وجود و بیان آن لازم و ضروری خواهد بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش لازم به‌ذکر است، که کاربرد بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان زراعی نیاز به

جداسازی و توالی‌یابی ژن مربوط به آنتی‌پورتر هیدروژن...

شوری به گیاهان زراعی به کار روند.

منابع پایه ژنتیکی برای تحمل به شوری و پایداری عملکرد دارد. بنابراین اجرای راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی در تأمین این هدف نیازمند انجام پژوهش‌ها گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم‌کننده آن در طی دوره تنش می‌باشد. با توجه به این که تحمل گیاهان شورزی نسبت به تنش شوری از گلکوفیت‌ها و گیاهان خویشاوند زراعی بیش‌تر است، این گیاهان می‌توانند به‌عنوان منابع طبیعی به‌نژادی مولکولی جهت انتقال ژن‌های تحمل به

سیاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل با شماره گرنت UOZ-GR-9618-37 انجام شده است. بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۲-۱۳ متن انگلیسی مراجعه شود.