

تجزیه و تحلیل منابع EST در گندم، برنج، پنبه و فستوکا تحت تنش

خشکی به منظور بررسی بیان ژن و ژنومیکس عملکردی

پیوند حیدری^{۱*}، بهرام ملکی زنجانی^۲، شادی حیدری^۳

۱ و ۲- فارغ التحصیل کارشناس ارشد، استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، ایران

۳- فارغ التحصیل کارشناس ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: peyvand_heidary@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۷- تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹)

چکیده

تنش خشکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود. این تحقیق به منظور شناسایی ژن‌های دخیل در به کمک تجزیه و تحلیل اطلاعات EST کتابخانه گیاهان گندم، برنج، پنبه و فستوکا انجام شد. اطلاعات اولیه چهار کتابخانه از بانک اطلاعاتی دانشگاه هاروارد جمع‌آوری شدند. در بررسی شباهت بین کتابخانه‌ها، همه توالی‌های EST با استفاده از نرم افزار E-Gassembler هم‌گذاری شدند. سپس همه کانتیگ‌ها به وسیله جستجوگر بلاست X توسط نرم افزار CLC Protein Workbench در مقابل پروتئین‌های غیر تکراری بانک ژن با $E\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$ تجزیه شدند. در شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها، نرم افزار IDEG6 مورد استفاده قرار گرفت. ژن‌های لیپید ترنسفراز، گلوکاتایون اس ترنسفراز، دهیدرین، متالوتیونین، فسفاتازها، پروتئین‌های فراوان در اواخر جنین زائی از جمله ژن‌های مهم دخیل در پاسخ به تنش خشکی در چهار کتابخانه برنج، گندم، پنبه و فستوکا محسوب می‌شوند. چهار کتابخانه در گروه‌های کارکردی فتوسنتز، مسیر اکسایشی پنتوز فسفات، انتقال الکترون، دیواره سلولی، متابولیسم اسید آمینه، هورمون-ها، اکسایش-کاهش، گروه کارکردی متفرقه، متابولیسم کربوهیدرات، تنش، متابولیسم نوکلئوتید، متابولیسم ثانویه، پروتئین و علامت دهی اختلافات معنی‌دار داشتند که نشان دهنده این است که این چهار گیاه با بکارگیری گروه‌های کارکردی متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهد.

مقدمه

صفات چند ژنی همچون مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، به سختی قابل اصلاح هستند به خصوص زمانی که در ترکیب با هم باشند (Neerinx and Leunissen 2005). ژنومیکس علم مطالعه ژنوم است. در مطالعات ژنومیکس تعداد بسیار زیادی ژن به‌طور همزمان با استفاده از ابزارهای خودکار مطالعه می‌شوند. ژنومیکس شامل تجزیه و تحلیل داده‌ها و اطلاعات ژنتیکی، بخصوص ژنوم موجودات است (Naghavi et al. 1388).

واژه‌های کلیدی

گروه‌های کارکردی،
ژنومیکس کارکردی،
تنش خشکی،
بیان ژن،
EST.

مرحله همگذاری، توالی‌های EST درون کانتیگ‌ها (شامل دو یا تعداد بیشتری EST) و سینگلتون‌ها (شامل تنها یک EST) قرار می‌گیرند (Masoudi-Nejad et al. 2006). در نرم افزار CLC protein workbench جستجوی بلاست X در مقابل پروتئین‌های غیر تکراری^۸ انجام می‌شود. این نرم افزار برای حل مسائل علمی و تحقیقات آزمایشگاهی بر اساس اصول بیوشیمیایی بکار می‌رود. تجزیه‌ها با $E\text{-value} \leq 10^{-5}$ (که ارزش مورد انتظار یا احتمال هم‌ردیفی‌های مختلف با امتیاز هم‌ارز نامیده می‌شود) انجام می‌شود که انتظار می‌رود در جستجوی پایگاه‌های اطلاعاتی به صورت شانس رخ داده باشد. با مقدار E کمتر، احتمال معنی‌دار بودن امتیاز بالاتر می‌رود (McGinnis and Madden 2004). در بلاست X توالی DNA تقاضا ابتدا در شش چهارچوب خواندن ترجمه و سپس با یک توالی پروتئینی موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی مقایسه می‌شود (Skuse and Du 2008). برای شناسایی ژنها با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها از خروجی نرم افزار CLCbio به عنوان ورودی نرم افزار IDEG6^۹ استفاده می‌شود. استفاده از آزمون کای دو جنرال برای کشف ژنهایی با بیان متفاوت برای تشخیص مجموعه‌ای از ژنهای مشخص در دو یا چندین شرایط متفاوت برای مدیریت و سازماندهی مقدار زیادی اطلاعات ضروری است (Romualdi et al. 2003). گروه‌های کارکردی کاربردهای متفاوتی دارد که عبارتند از: تفسیر دستی ژنوم، تفسیر کارکردی خودکار ژنهای پیش‌بینی شده، تجزیه داده‌های مطالعات ژنومیکس بزرگ مقیاس و پروتئومیکس (Ruepp et al. 2004). برای تعیین گروه‌های کارکردی پایگاه‌های اطلاعاتی متنوعی وجود دارد، سایت موسسه ماکس پلانک (mapman) به صورت آنلاین، یکی از این پایگاه‌ها می‌باشد. برای آزمون تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کارکردی، خروجی نرم افزار mapman به عنوان ورودی نرم افزار IDEG6 استفاده می‌شود (Man et al. 2004). تنش‌های محیطی از قبیل تنش خشکی یکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی در بسیاری از نقاط دنیا به ویژه مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران محسوب

از کاربردهای اصلی ژنومیکس می‌توان به تشخیص ژنهایی که نقش کلیدی را در فرایندهای بیولوژیک ایفا می‌کنند و همچنین روشن کردن نقش بیولوژیک تعداد زیادی از ژنهایی که عملکرد آنها یا به‌طور ضعیفی شناخته شده و یا هنوز کاملاً ناشناخته‌اند، اشاره نمود (Lein et al. 2008). ژنومیکس، اصلاح گیاهان را به شکل چشم‌گیری تغییر داده است و ما را قادر به دستیابی به فهم ژنتیکی وسیع، همراه با جزئیات عملکرد کلی گیاه می‌سازد (Neerinx and Leunissen 2005). مطالعات ژنومی و مولکولی به همراه تجزیه و تحلیل منابع EST نشان داده که ژنهای زیادی با عملکردهای متفاوت بوسیله تنش خشکی القاء می‌شوند (Shinozaki and Yamaguchi 2008). تعداد زیادی منابع EST برای گندم و جو ایجاد شده که تجزیه و تحلیل آنها موجب شناسایی ژنهای دخیل در فرآیندهای پاسخ به تنش خشکی شده است (varshney et al. 2008). تجزیه فرآیندهای پیچیده‌ای که مکانیسم‌های مقاومت را رقم می‌زنند، در بازدهی گیاهان زراعی نقش دارند (Neerinx and Leunissen 2005). دستاوردهای مبتنی بر ژنومیکس دسترسی به آلل‌های مطلوبی که در مکان‌های ژنی صفات کمی^۱ حضور دارند و سبب پاسخ به تنش خشکی می‌شوند را فراهم می‌کند (Tuberosa and Salvi 2006). این تجزیه‌ها می‌توانند با نرم افزارهای مخصوص روی مقادیر بسیار زیادی از داده‌های EST تولید و ذخیره شده در بانک‌های اطلاعاتی و پروژه‌های شاخص ژن^۲ مانند وب سایت دانشگاه هاروارد^۳ صورت گیرند (Neerinx and Leunissen 2005). از نرم افزارهایی که در تجزیه ESTها بکار می‌رود می‌توان به EGAssembler^۴، CLC protein workbench، mapman^۵، IDEG6^۶ اشاره نمود. EGAssembler به منظور پالایش توالی‌های EST یک مرحله پیش پردازش انجام می‌دهد که این مرحله شامل پاکسازی توالی‌ها، پوشاندن تکرارها، پوشاندن ناقل‌ها، پوشاندن توالی‌های اندامکی و سپس همگذاری^۷ توالی‌ها می‌باشد. در طی

^۸ Non redundant (Nr)

^۹ <http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/>

^۱ Quantitative trait loci (QTLs)

^۲ The gene index project

^۳ <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>

^۴ <http://egassembler.hgc.jp/>

^۵ <http://mapman.mpimp-golm.mpg.de>

^۶ <http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/>

^۷ Assembly

شباهتی با پروتئین‌های شناخته شده موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی نداشتند که به عنوان ژن جدید معرفی شدند (Reddy et al. 2008). با وجود این که تشخیص و ارزیابی ژنم پلاسماهای مقاوم به خشکی فرایند بسیار سخت و زمان‌گیر است روش EST یکی از موثرترین روش‌ها برای کشف ژن‌های کارکردی جدید از تمام ژنوم است (Chen et al. 2005). یکی از مؤثرترین راه‌های کاهش خسارت خشکی و اصلاح گیاهان در کشور می‌باشد. امروزه با بکارگیری روش‌های تجزیه و تحلیل EST انجام برنامه‌های تحقیقاتی گسترده با هدف اصلاح گیاهان مقاوم به تنش خشکی در گیاهان مهم زراعی مانند گندم و برنج با سرعت و دقت بیشتری امکان‌پذیر می‌باشد (Bausher et al. 2003). با تکمیل پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم در تعدادی از گیاهان، EST‌های فراوانی برای مطالعه سایر گیاهان فراهم شده است. چنانچه یک EST با یک ژن مشخص همانندی قابل قبولی داشته باشد عملکرد بالقوه مشابهی برای آن EST در نظر گرفته می‌شود. تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر EST‌ها با مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، موجب افزایش آگاهی مسیرهای بیوشیمیایی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت می‌شود. با گسترش اطلاعات EST‌ها در بانک‌های اطلاعاتی، امکان شناسایی و جداسازی ژن‌های کاندیدای مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی میسر می‌شود (Hide et al. 1999). در این پژوهش به منظور شناسایی و مقایسه دقیق ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی در چهار گیاه گندم، برنج، پنبه و فستوکا تجزیه EST‌های موجود در کتابخانه تحت تنش این چهار گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

اطلاعات اولیه چهار کتابخانه پنبه تحت تنش با EST ۱۰۷۲، فستوکا تحت تنش با EST ۴۹۷۲، کتابخانه برنج تحت تنش با EST ۵۵۰۴ و گندم تحت تنش با EST ۱۰۲۶ تجزیه و تحلیل شد. اطلاعات از بانک اطلاعاتی دانشگاه هاروارد^۵ جمع‌آوری شدند و توالی‌های EST در فرمت FASTA بود.

بیان ژن

می‌شود. برنج^۱ و گندم^۲ مهم‌ترین غلاتی هستند که بطور وسیع در سیستم‌های متنوع اکولوژیکی کاشته می‌شود و تنش خشکی یکی از بزرگ‌ترین علت ناپایداری عملکرد این دو گیاه در مناطق مختلف کشت این دو محصول می‌باشد (Mostajeran and Rahimi-Eichi 2009). ژنومیکس عملکردی شناسایی مبانی ژنتیکی و مولکولی فرایندهای بیولوژیک در گیاهان را فراهم آورده است (Gorantla et al. 2005). موفقیت در شناسایی ژن‌های دخیل در تنش خشکی موجب کمک به اصلاح ژنتیکی برای افزایش توانمندی گیاه در تولید محصول می‌باشد. تاکید اصلی روی شناسایی ژن‌های جدید پاسخ به تنش خشکی در گونه‌های مختلف و نقش آن‌ها در سازگاری است که به اصلاح تحمل به خشکی محصولات حساس کمک خواهد کرد و عملکرد قابل قبول را در چالش با خشکی حفظ می‌کند (Reddy et al. 2008). پنبه^۳ یکی از گیاهان زراعی مقاوم به خشکی است و بازده اقتصادی آن بخاطر هزینه بالای مرتبط با رشد پنبه بسیار مهم می‌باشد. بنابراین هر چند که پنبه گیاهی مقاوم به خشکی است برای تولید بالای محصول به آب کافی نیاز دارد، بنابراین تشخیص ژن‌های دخیل در مکانیسم مقابله با تنش خشکی از اهمیت زیادی برخوردار است (Pospisilova et al. 2000). گیاهان گونه فستوکا^۴ فستوکا^۴ یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای فصل سرما و گراس‌های چمنی مناطق معتدل هستند. علوفه‌های فصل سرما یا گونه‌های گراس‌های چمنی اغلب از خشکی زیان می‌بینند (Sheffer et al. 2001). در آزمایشی حدود ۲۵۰۰ EST از کتابخانه تحت تنش نخود فرنگی توالی‌یابی شد و تجزیه مقایسه‌ای از ژن‌های با بیان متفاوت انجام شد، نتایج بدست آمده در فهم اساس مولکولی ژن‌های متحمل به خشکی در نخود فرنگی مفید بود (Gao et al. 2008). در آزمایش دیگری برای توصیف ژن‌های شرکت‌کننده در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در نوعی لوبیا EST ۱۰۵۰ جداسازی و توالی‌یابی شد و نتایج نشان داد که ۵۳۱ توالی منحصربه‌فرد بودند و ۳۰ درصد از آن‌ها هیچ

¹ *Oryza sativa*

² *Triticum aestivum*

³ *Gossypium hirsutum*

⁴ *Festuca spp*

⁵ [Http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi](http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi)

نتایج و بحث

به منظور بررسی دقیق پروفایل بیان ژن و گروههای کارکردی، ابتدا مقایسه بصورت دو به دو بین کتابخانه گندم و برنج، پنبه و فستوکا انجام شد. سپس پروفایل بیان ژن هر چهار گیاه به صورت توأم بررسی شد. در دستیابی به گروههای کارکردی و نقش سلولی ESTها از دو کتابخانه تحت تنش خشکی گندم و برنج بعد از هم‌گذاری ۵۵۰۴ EST، در کل ۷۴۰ کانتینگ و ۲۲۸۸ سینگلتن در کتابخانه تحت تنش برنج با استفاده از نرم افزار EGassembler تشکیل شد و در کتابخانه تحت تنش گندم تعداد ۷۵ کانتینگ و ۸۱۵ سینگلتن بعد از هم‌گذاری ۱۰۲۶ EST تشکیل شد. نتایج تجزیه در جدول یک آمده است.

جدول ۱- تعداد ESTهای موجود در هر کتابخانه و تعداد کانتینگ و سینگلتنهای هر کتابخانه بر اساس خروجی نرم افزار EGassembler

کتابخانه گندم تحت تنش خشکی	کتابخانه برنج تحت تنش خشکی	کتابخانه
۱۰۲۶	۵۵۰۴	تعداد کل EST ها
۷۵	۷۴۰	تعداد کانتینگ ها
۲۱۱	۳۲۱۶	تعداد در کانتینگ
۸۱۵	۲۲۸۸	تعداد سینگلتن
۲۵	۱۹۷	کانتینگهایی که hit مشخصی ندارند
۳۱۵	۱۱۹۶	سینگلتنهایی که hit مشخصی ندارند

با استفاده از نرم افزار CLCBio، بلاست موضعی (بلاست در برابر بانک اطلاعاتی آرآبیدوپسیس) کانتینگها و سینگلتنها انجام شد و تبدیل رمزهای ژنتیکی کانتینگها و سینگلتنهای دو کتابخانه به رمزهای ژنتیکی گیاه آرآبیدوپسیس صورت گرفت. از آنجا که گروههای کارکردی گیاه آرآبیدوپسیس به طور کامل شناخته شده است تبدیل این رمزها به رمزهای ژنتیکی گیاه آرآبیدوپسیس به منظور تعیین گروههای کارکردی کتابخانههای گندم و برنج تحت تنش خشکی انجام شد. گروههای کارکردی هر دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman به ۳۴ دسته طبقه بندی شد. مقایسه گروههای کارکردی دو کتابخانه در شکل یک نمایش داده شده است. در تعیین اختلاف معنی دار بین گروههای کارکردی دو کتابخانه گندم و برنج تحت تنش خشکی از نرم افزار IDEG6 استفاده گردید. بیان ۷ گروه کارکردی (جدول ۲) بین این دو کتابخانه اختلاف معنی داری داشتند که بیانگر این حقیقت است که گیاه گندم و

در مطالعه شباهت بین دو کتابخانه، همه توالیهای EST با استفاده از نرم افزار EGassembler هم‌گذاری شدند. سپس همه کانتینگها به وسیله جستجوگر بلاست X توسط نرم افزار CLC protein workbench در مقابل پروتئینهای غیر تکراری بانک ژن تجزیه و تحلیل شدند. برای شناسایی ژنهای با بیان متفاوت در بین کتابخانهها، نرم افزار IDEG6^۱ مورد استفاده قرار گرفت. الگوریتم این نرم‌افزار با آزمون کای دو جنرال برای شناسایی ژنها با بیان متفاوت به ما کمک می‌کند (Romualdi et al. 2003).

تجزیه کارکردی

در تعیین هم‌ردیفی و ادغام توالیهای رونوشت ژن (EST)، نرم افزار EGassembler مورد استفاده قرار گرفت. این روش برای هم‌گذاری توالیهای EST با ضریب درصد همپوشانی $N \geq 95$ ^۲ و حذف دیگر گزینه‌ها از قبیل فرایندهای پوشاندن اندامکها و روشن سازی توالی، پوشاندن تکرارها و پوشاندن ناقلها استفاده شد. نرم افزار EGassembler یکسری EST را در فرمت FASTA می‌پذیرد. توالیهای مربوط به فایل‌های کانتینگ و سینگلتن از هر کتابخانه به وسیله نرم افزار CLC protein workbench و برنامه BLASTX ($Evalue \leq 1 \times 10^{-5}$) در برابر پایگاه اطلاعاتی آرآبیدوپسیس که از منبع اطلاعاتی آرآبیدوپسیس^۳ TAIR^۳ دانلود شد مورد تجزیه قرار گرفت. برای طبقه بندی گروههای کارکردی، ابزار طبقه بندی کارکردی و مقایسه‌ای mapman^۴ موسسه ماکس پلانک^۵ به صورت آنلاین استفاده شد. خروجیهای mapman برای توصیف کاتالوگهای متفاوت در بین کتابخانهها که می‌تواند گروههای کارکردی را در آزمایشات نمونه‌ای چندگانه کشف کند مورد استفاده قرار گرفت. در اینجا از تست کای دو جنرال برای تشخیص گروههای کارکردی متفاوت استفاده شد. سپس برای یافتن گروههای کارکردی متفاوت بین دو کتابخانه از نرم افزار IDEG6 استفاده گردید.

^۱ <http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/>

^۲ Overlap percent identity cutoff $N \geq 95$

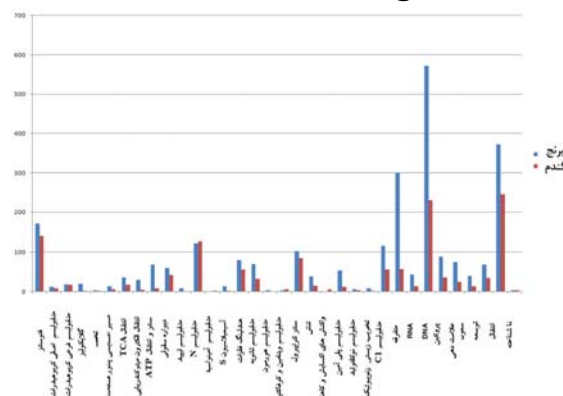
^۳ [Ftp://ftp.arabidopsis.org](ftp://ftp.arabidopsis.org)

^۴ <http://mapman.mpimp-golm.mpg.de>

^۵ MapMan Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology

ژن‌ها در دو کتابخانه تحت تنش خشکی است. رونوشت‌های مربوط به گروه‌های کارکردی بیوستز پلی‌آمین‌ها در دو کتابخانه گندم و برنج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. رابطه بین بیوستز پلی‌آمین‌ها و تحمل خشکی اولین بار در گیاه جو نشان داده شد (Richards and Coleman 1952). در آزمایشی نشان داده شده که با دست‌کاری ژنتیکی در بیوستز پلی‌آمین‌ها در گیاهان می‌توان ژرم پلاسما مقاوم به خشکی ایجاد کرد (Capell et al. 2004). بیان ژن‌های رمز کننده پلی‌آمین‌ها در گیاه گندم تحت تنش خشکی بیشتر بود که نشان دهنده این است که گندم در بکارگیری سنتز پلی‌آمین‌ها در مکانیسم تحمل به خشکی نسبت به برنج کارآمدتر می‌باشد. ژن‌های دخیل در متابولیسم اسیدهای آمینه نیز در دو کتابخانه بیان متفاوتی داشتند. از این نتایج ما به شناسایی بخشی از گروه‌های کارکردی دخیل در مکانیسم تحمل به خشکی که نقش مهمی در فهم فرآیند تحمل به خشکی در دو گیاه گندم و برنج ایفا می‌کنند دست یافتیم. دسته‌بندی، هم‌گذاری و جستجوی بلاست توالی‌های EST به منظور بررسی بیان ژن‌های دو گیاه برنج و گندم تحت تنش خشکی نشان داد که در کتابخانه برنج تحت تنش خشکی، ۱۹۲۹ EST (۳۵/۰۴ درصد) و در کتابخانه گندم تحت تنش ۳۷۶ EST (۳۶/۶۴ درصد) سهم خیلی ضعیفی (10^{-5} نمره بلاست) در همولوژی با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها داشتند و یا هیچ توالی مشابهی با آن‌ها وجود نداشت و کاندیدای خوبی هستند که به عنوان ژن‌های جدید مد نظر قرار گیرند، در حالی که ۳۵۷۵ EST در کتابخانه برنج تحت تنش و ۶۵۰ EST در کتابخانه گندم، همولوژی بالا یا متوسطی را نشان دادند (10^{-5} نمره بلاست). بر پایه این نتایج توالی‌هایی که در نشان دادن همولوژی معنی‌دار برای هر پروتئین در پایگاه داده‌های عمومی شکست خوردند کاندیدای مناسبی برای ژن‌های جدید هستند. به عنوان مثال کانتیگ ۴۴ در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی می‌تواند به عنوان کاندیدای ژنی که هنوز شناخته نشده است جداسازی و توالی‌یابی شود و به عنوان یک ژن جدید در پاسخ به تنش خشکی معرفی گردد و در برنامه‌های انتقال ژن و اصلاح گونه‌های دیگر بکار گرفته شود. در این تحقیق به کمک نرم‌افزار IDEG6 نشان داده شد که از بین ۳۰۶ ژن که بیان متفاوتی در دو کتابخانه برنج و گندم نشان دادند ۱۳ ژن از نظر

برنج تحت تنش خشکی با بکارگیری گروه‌های کارکردی متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند.



شکل ۱- مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman

جدول ۲- نتایج نرم افزار IDEG6 و تعیین گروه‌های کارکردی متفاوت بین دو کتابخانه را نشان می‌دهد

گروه های کارکردی متفاوت	کتابخانه برنج	کتابخانه گندم	کای اسکور
در دو کتابخانه برنج و گندم			
PS	173	142	0.000004*
Cell wall	69	8	0.000016*
Amino acid metabolism	122	127	0*
Polyamine metabolism	0	6	0.000526*
RNA	299	57	0*
not assigned	372	245	0.000249*
stress	103	85	0.000395*

مقایسه توزیع گروه‌های کارکردی میان EST‌ها نشان داد که در گروه کارکردی PS یا فتوستز بین دو کتابخانه گندم و برنج تحت تنش خشکی، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. این امر تفاوت در کارایی سیستم فتوستزی دو گیاه در مقابله با تنش خشکی را نشان می‌دهد. رونوشت‌های مربوط به گروه‌های کارکردی دیواره سلولی و استرس در دو کتابخانه تفاوت معنی‌داری را نشان داد. تعداد زیادی از پروتئین‌های سنتز دیواره سلولی هستند که جز پروتئین‌های دخیل در شرایط استرس هم محسوب می‌شدند این امر به این حقیقت بر می‌گردد که دیواره سلولی گیاهان به عنوان سپر دفاعی است که نقش مهمی را در مکانیسم تحمل به تنش خشکی ایفا می‌کند. با توجه به جدول بالا، ژنهای دسته‌بندی شده در فرایند رونویسی^۱ در دو کتابخانه تفاوت معنی‌داری داشتند که نشان‌دهنده تفاوت در شدت بیان این

¹ Transcription

هستند، این دسته از آنزیم‌ها سلول‌ها را در برابر اکسیژن‌های فعال حفاظت می‌کنند. در گیاه فرفیون^۹ رونویسی و فعالیت این آنزیم به طور گسترده‌ای در بافت‌هایی که تحت تنش‌های محیطی هستند افزایش می‌یابد (Anderson and Davis 2003). گلوکاتایون اس‌ترانسفراز نقش مهمی را در حذف کردن اکسیژن‌های واکنش پذیر (ROS)^{۱۰} سلول بازی می‌کند. ظرفیت سیستم حذف کردن گلوکاتایون اس‌ترانسفرازها، بستگی به شدت بیان این ژن در گیاهان مختلف دارد (Tausz, 2003). بالابردن سطوح بیان ژن گلوکاتایون اس‌ترانسفراز به نظر می‌رسد که توسط گیاهان مقاوم به تنش خشکی کنترل می‌شود (Chugh and Khurana 2002). سطوح رونوشت‌های گلوکاتایون اس‌ترانسفراز در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی افزایش داشت. از نتایج این مطالعه و نتایج مشابه سایر محققین می‌توان استنباط نمود که در گندم تحت تنش خشکی، گلوکاتایون اس‌ترانسفراز در محدود کردن آسیب‌های اکسیداتیو و دیگر پاسخ‌ها به تنش‌ها مشارکت می‌کند. این پروتئین‌ها با متابولیسم گیاهی و دفاع در برابر تنش با انواع اکسیژن واکنش‌پذیر مرتبط هستند. در حقیقت ایزوفرم‌های گلوکاتایون اس‌ترانسفراز گروه بزرگ و متنوعی از آنزیم‌های اکسیداتیو، با چندین فعالیت متنوع و الگوهای توالی متفاوت هستند. گیاهان مکانیسم‌های دفاعی موثر متنوعی در برابر صدمات اکسیداتیو استرس‌ها دارند، یکی از آن‌ها گلوکاتایون s-ترانسفراز (GSTs) است که انجام دهنده طیفی از نقش‌های عملکردی با استفاده از تری پپتید گلوکاتایون (GSH) به‌عنوان کوآنزیم است (Lederer and Boger 2005). از ژن دیگری که در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی بیان افزایشی داشت می‌توان به متالوتیونین اشاره نمود. نقش اصلی این ژن این است که به‌عنوان دفع کننده مسمومیت ناشی از فلزات سنگین عمل می‌کند و در تنظیم متابولیسم فلزات ضروری نقش دارد. اما اخیراً مشخص شده است که متالوتیونین‌ها به‌عنوان حذف کننده‌های رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و نقش مهمی در تحمل به خشکی ایفا می‌کند (Sato and Bremner 1993). دسته دوم یعنی ژن‌هایی که بیان ژن‌های دیگر

آماري تفاوت معنی‌داری داشتند، این ۱۳ ژن در جدول ۳ مشخص شده است.

جدول ۳- ژن‌های با بیان متفاوت برحسب تعداد EST های هر کانینگ در دو کتابخانه گندم و برنج تحت تنش خشکی را نشان می‌دهد.

ژن‌ها	تعداد EST در کتابخانه گندم	تعداد EST در کتابخانه برنج
lipid transfer protein precursor	۶	۰
lipid transfer protein 7a2b	۴	۰
dehydrin	۴	۰
ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform	۷	۰
Oxygen-evolving enhancer protein 2	۵	۰
ribulose-bisphosphate carboxylase activase	۶	۰
metallothionein	۴	۰
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	۶	۰
stress responsive protein kinases	۶	۰
Contig 44	۱۰	۰
putative acid phosphatase	۷	۰
ADP-ribosylation factor 1	۴	۱
glutathione s-transferase	۶	۲

تلاش شد که ژن‌هایی که در تحمل به تنش خشکی نقش دارند را در دو گیاه برنج و گندم شناسایی کنیم و بیان آن‌ها را در دو کتابخانه مورد مقایسه قرار دهیم. محصولات ژن‌های القا شده تحت تنش به طور وسیعی در دو گروه طبقه بندی می‌شوند. محصولات ژن‌های گروه اول به طور مستقیم سلول را در برابر تنش حمایت می‌کند مانند چاپرون‌ها^۱، پروتئین‌های LEA^۲، پروتئین‌های حفاظت کننده در برابر تنش‌های اسمزی^۳، آنزیم‌های دخیل در دفع مواد سمی از گیاه^۴، حذف کننده‌های رادیکال‌های آزاد^۵ و پروتئازهای مختلف (Iuchi et al. 2007)، گروه دوم شامل فاکتورهای رونویسی، پیغام‌برهای ثانویه و فسفاتازها و کینازها مانند کینازهای فعال‌کننده تقسیم سلول^۶ و پروتئین‌های وابسته به کلسیم^۷ و کینازهای وابسته به رشد و تمایز سلول^۸ که بیان ژن‌های دیگر در پاسخ به تنش خشکی را تنظیم می‌کنند (Kovtun et al. 2000). فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و آنتی‌اکسیدان در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی افزایش معنی‌داری را نشان داد. از دسته اول می‌توان به گلوکاتایون اس‌ترانسفرازها اشاره نمود. گلوکاتایون اس‌ترانسفرازها جز گروه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

¹ Chaperons

² Late embryogenesis abundant proteins

³ Osmoprotectant

⁴ Detoxifying enzymes

⁵ Free radical scavengers

⁶ Mitogen-activated kinases (MAPKS)

⁷ Calcium dependent protein kinases (CDPKs)

⁸ SoS kinases

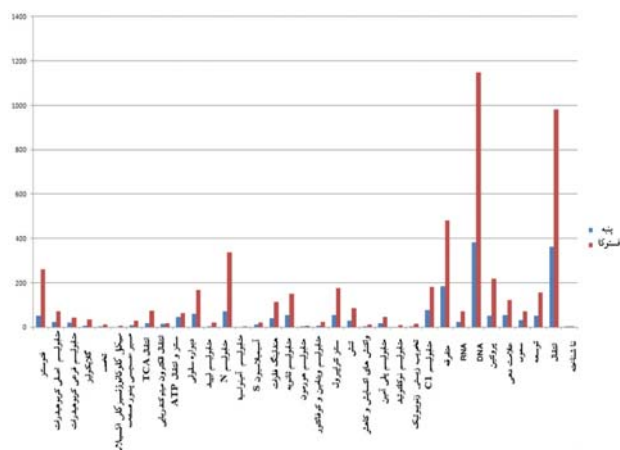
⁹ *Euphorbia esula*

¹⁰ Reactive oxygen species

جدول ۴- تعداد ESTهای موجود در هر کتابخانه و تعداد کانتینگ و

سینگلتن‌های هر کتابخانه بر اساس خروجی نرم افزار EGAssembler

کتابخانه فستوکا	کتابخانه پنبه	کتابخانه
تحت تنش	تحت تنش	
۴۹۷۲	۱۰۷۲	تعداد کل ESTها
۵۳۹	۱۰۵	تعداد کانتینگ‌ها
۱۷۱۳	۳۷۷	تعداد EST در کانتینگ
۳۲۵۹	۶۹۵	تعداد سینگلتن
۱۱۰	۱۲	کانتینگ‌هایی که hit مشخصی ندارند
۱۲۵۹	۳۶۳	سینگلتن‌هایی که hit مشخصی ندارند



شکل ۲- مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman

جدول ۵- نتایج نرم افزار IDEG6 و تعیین گروه‌های کارکردی متفاوت بین دو کتابخانه را نشان می‌دهد.

گروه‌های کارکردی متفاوت در دو کتابخانه پنبه و فستوکا	کتابخانه پنبه	کتابخانه فستوکا	کلی اسکور
PS	53	261	0.000021*
Mitochondrial electron transport / ATP synthesis	16	19	0.001183*
Cell wall	46	63	0.000014*
Amino acid metabolism	73	338	0.000014*
redox regulation	30	86	0.000047*
Misc	78	182	0.000432*
Signalling	53	218	0.001168*

توالی‌های مربوط به کتابخانه پنبه تحت تنش خشکی در ۳۱ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند و توالی‌های مربوط به کتابخانه فستوکا تحت تنش خشکی در ۳۴ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند. کتابخانه‌های پنبه و فستوکا در سه گروه کارکردی فتوسنتز، دیواره سلولی، متابولیسم اسید آمینه با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. این نشان دهنده اهمیت این سه گروه کارکردی در مکانیسم مقابله با تنش خشکی ما بین گیاهان مختلف می‌باشد. از دیگر گروه‌های کارکردی که بین دو گیاه پنبه و فستوکا تحت

در پاسخ به تنش خشکی را تنظیم می‌کنند کینازهای پاسخ به تنش هستند که در کتابخانه گندم تحت تنش خشکی بیان افزایشی داشتند، این دسته از ژن‌ها نقش کلیدی را در هماهنگی بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی گوناگون دارند (Dunand-Sauthier et al. 2005). در آزمایشی نشان داده شد که بخشی از پاسخ سلولی به تنش‌ها به وسیله نقشی که کینازهای پاسخ به استرس به عنوان پیام‌رسان^۱ ایفا می‌کنند، اتفاق می‌افتد (Tibbles and Woodgett 1999). لیپید ترانسفرازها در انتقال چربی از میان زمینه خارج سلولی به منظور تشکیل موم کوتیکولی نقش دارند. اهمیت تشکیل موم کوتیکولی به تحمل تنش خشکی در گیاه مربوط می‌شود (Kimberly et al. 2006). این پروتئین‌ها به‌طور غیر مستقیمی در دفاع گیاه و ممانعت از کاهش آب در برابر تنش‌های محیطی نقش دارند (Chugh and Khurana 2002). یکی از پاسخ‌های بیولوژیکی گیاه به تنش خشکی، تجمع پروتئین‌های دهیدرین می‌باشد. این پروتئین‌ها غشاهای ماکرومولکول‌ها را از تغییر ماهیت حفاظت می‌کنند (Lopez et al. 2003). این ژن یکی از گزینه‌های مناسب به منظور استفاده در برنامه‌های اصلاح گیاهان از جمله برنج برای افزایش مقاومت به تنش خشکی می‌باشد. برای دستیابی به گروه‌های کارکردی و نقش سلولی ESTها از دو کتابخانه تحت تنش خشکی پنبه و فستوکا بعد از هم‌گذاری ۱۰۷۲ EST، در کل ۱۰۵ کانتینگ و ۶۹۵ سینگلتن در کتابخانه تحت تنش پنبه با استفاده از نرم افزار EGAssembler تشکیل شد و در کتابخانه تحت تنش فستوکا تعداد ۵۳۹ کانتینگ و ۳۲۵۹ سینگلتن بعد از هم‌گذاری ۴۹۷۲ EST تشکیل شد. نتایج این تجزیه در جدول ۴ آمده است. گروه‌های کارکردی هر دو کتابخانه توسط نرم افزار mapman طبقه‌بندی شد. مقایسه گروه‌های کارکردی دو کتابخانه در شکل دو نمایش داده شده است. بیان ۷ گروه کارکردی (جدول ۵) بین این دو کتابخانه اختلاف معنی‌داری داشت که بیانگر این حقیقت است که گیاه پنبه و فستوکا تحت تنش خشکی با بکارگیری گروه‌های کارکردی متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند.

¹ Signalling

تنش اختلاف داشتند، گروه کارکردی سیگنالینگ و گروه کارکردی انتقال الکترون میتوکندریایی و متفرقه و تنظیم واکنش‌های اکسایش-کاهش هستند. در گروه کارکردی انتقال الکترون میتوکندریایی اختلاف معنی‌داری بین کتابخانه‌های پنبه و فستوکای تحت تنش خشکی وجود دارد. گروه کارکردی زنجیره انتقال الکترون مجموعه‌ای است از پروتئین‌های پیچیده که انرژی ذخیره شده‌ی ناقلین الکترونی حاصل از واکنش‌های اکسیداسیون و احیای سلول را برای تشکیل ATP و سایر مولکول‌های پرانرژی مصرف می‌کنند و عملکرد مهمی در تولید انرژی برای سلول‌های تحت تنش بازی می‌کنند که نشان دهنده نیاز سلول‌های گیاه تحت تنش خشکی به انرژی بیشتر به منظور مقابله با تنش خشکی می‌باشد (Wagner and Krab 2006). ژن‌های دخیل در فرایند انتقال پیام کلسیم^۱ نیز در دو کتابخانه تفاوت معنی‌داری داشتند. یون Ca^{+} به طور گسترده‌ای در گیاهان و حیوانات بکار گرفته می‌شود. نه تنها در تولید ولتاژ غشایی بلکه به عنوان یک مکانیسم پیام دهی عمل می‌کند، کلسیم یک ملکول کوچک^۲ است که اثر تنظیمی روی خیلی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها دارد. از ژن‌هایی که در فرایند پیام‌دهی کلسیم در کتابخانه فستوکا نقش دارند می‌توان به کلمودولین^۳ و کلسینورین^۴ اشاره نمود. کلمودولین جز پروتئین‌های باند شونده با کلسیم است و می‌تواند با پروتئین‌های دیگر باند شود و عملکرد آن‌ها را تنظیم کند و به این وسیله روی خیلی از عملکردهای سلول نقش داشته باشد. کلسینورین‌ها جز پروتئین فسفاتازها هستند و به طور گسترده‌ای در پاسخ به استرس‌های محیطی بیان می‌شوند (Kudla et al. 1999). تنش‌های محیطی معمولاً وقتی در گیاهان اعمال می‌شوند منجر به افزایش موقتی و زودگذر در کلسیم آزاد سیتوپلاسمی می‌شود. این پیام‌های کلسیم سلولی (Ca^{2+}) در نهایت منجر به افزایش پاسخ‌های ژنی در گونه‌های گیاهی نسبت به تنش‌ها می‌شود که این ژن‌ها پروتئین‌هایی را رمز می‌کنند که وظیفه حفاظتی را به عهده دارند (Zhu, 2002). خانواده‌های بزرگی از آنزیم‌ها که

نمی‌توانند به هر مسیری نسبت داده شوند (گروه کارکردی متفرقه یا misc) نامیده می‌شوند. در کتابخانه پنبه و فستوکا چندین زیر گروه این گروه کارکردی با همدیگر متفاوت بودند (Lederer and Boger 2005). تنظیم واکنش‌های اکسایش-کاهش در کتابخانه پنبه و فستوکای تحت تنش خشکی متفاوت بود. اکسیژن برای گیاهان مثل سایر موجودات هوازی، همانند یک تیغ دو لبه است. اگرچه برای رشد و نمو عادی ضروری است ولی تماس مداوم با آن منتج به صدمه دیدن سلول‌ها و در نهایت مرگ آنها می‌گردد. در کتابخانه فستوکای تحت تنش خشکی بیان بالایی از توالی‌های شرکت کننده در این زیر گروه کارکردی مشاهده شد (Mittler et al. 2004). در EST‌های کتابخانه پنبه تحت تنش خشکی، ۱۲۲ EST (۳۳/۲۴ درصد) و در کتابخانه فستوکا ۱۹۱۴ EST (۳۴/۷۷ درصد) سهم خیلی ضعیفی (نمره بلاست $\leq 10^{-5}$) در همولوژی با توالی‌های موجود در پایگاه داده غیر تکراری Nr داشتند و یا هیچ توالی مشابهی با آن‌ها وجود نداشت، بنابراین به عنوان ژن‌های جدید مدنظر قرار گرفتند و ۲۴۵ EST باقیمانده در پنبه و ۳۵۹۰ EST باقیمانده در فستوکا همولوژی بالا یا متوسطی را نشان دادند (نمره بلاست $\geq 10^{-5}$). بر پایه نتایج ما، توالی‌هایی که در نشان دادن همولوژی معنی‌دار برای هر پروتئین در پایگاه داده‌های عمومی شکست خوردند کاندیدای مناسبی برای ژن‌های جدید هستند و در برنامه‌های انتقال ژن و اصلاح گونه‌های دیگر بکار گرفته می‌شوند. در این تحقیق مابه کمک نرم‌افزار IDEG6 و آزمون کای دو جنرال نشان دادیم که از بین ۲۵۶ ژن که بیان متفاوتی در دو کتابخانه پنبه و فستوکا نشان دادند ۱۴ ژن از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشتند، این ۱۴ ژن در جدول ۶ مشخص شده است. لیپید ترانسفراز، گلوکاتیون اس ترانسفراز، دهیدرین، متالوتیونین از جمله ژن‌هایی هستند که در کتابخانه‌های فستوکا و پنبه تحت تنش خشکی مانند کتابخانه‌های برنج و گندم اختلاف داشتند. از نتایج این مطالعه و نتایج مشابه سایر محققین می‌توان استباط نمود که احتمالاً این ژن‌ها با توجه به نقش بسیار مهمی که پیشتر در مورد آن‌ها توضیح داده شد در مقابله با تنش خشکی در گونه‌های مختلف گیاهی اهمیت حیاتی دارند.

¹ Calcium signaling

² Allosteric

³ Calmodulin

⁴ Calcineurin

جدول ۶- ژن‌های با بیان متفاوت برحسب تعداد EST‌های هر کانتینگ در دو کتابخانه پنبه و فستوکا تحت تنش خشکی را نشان می‌دهد.

ژن‌ها	تعداد EST در کتابخانه پنبه	تعداد EST در کتابخانه فستوکا
lipid transfer protein	۰	۱۹
glutathione s-transferase	۳	۲۳
dehydrin	۲۹	۶
metallothionein	۱۲	۰
Ubiquitin	۲۲	۵
Glutathione peroxidase	۵	۲۱
Amine oxidase	۰	۱۸
Peroxidases	۶	۳۷
Heat shock protein	۱۸	۴
Phosphatases	۶	۲۷
Alcohol dehydrogenase	۰	۱۶
pyruvate decarboxylase	۳	۲۴
LEA	۹	۰
chaperonins	۶	۲۷

یوبی کوئیتین‌ها^۱ که در کتابخانه پنبه افزایش بیان داشتند، پروتئین‌های کوچکی هستند که در انواع سلولهای وکاریوتی وجود دارد. حضور وسیع این پروتئین در جایگاه‌های مختلف و ثابت ماندن ساختار مولکولی آن در گونه‌های مختلف، حاکی از نقش مهم یوبی کوئیتین در حیات سلولی می‌باشد. اتصال کولان یوبی کوئیتین به پروتئین‌ها یکی از مهم‌ترین راه‌های هدایت بسیاری از بیومولکول‌های پروتئینی به سمت تجزیه پروتئوزومی^۲ بشمار می‌رود (Kimura and Tanaka 2010). ما پیشنهاد می‌کنیم که ژن‌های دخیل در فرایند اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی نقش بسیار مهمی در مقابله با تنش خشکی بازی می‌کند. افزایش بیان ژن‌های دخیل در استرس‌های اکسیداتیو در کتابخانه فستوکا تحت تنش خشکی دیده شد. از این ژن‌ها می‌توان به پراکسیدازها^۳، آمین اکسیدازها^۴، گلوکاتایون پراکسیدازها^۵ اشاره نمود. این ژن‌ها احتمالاً به دنبال وقوع تنش خشکی در این کتابخانه تولید می‌شوند (Kerr et al. 1972)، از طرفی بیان ژن‌های پاسخ به استرس نیز در این کتابخانه افزایش داشت که این می‌تواند به این علت باشد که پراکسیدهای تولید شده باید از سلول‌ها دفع شوند تا از صدمات ناشی از تنش جلوگیری کنند. از ژن‌هایی که در پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو در دو کتابخانه بیان شده و اختلاف بیان داشتند می‌توان به ژن‌های شوک حرارتی^۶ اشاره نمود. پروتئین‌های شوک حرارتی به مجموع پروتئین‌هایی

¹ Ubiquitin

² Proteasomes

³ Peroxidases

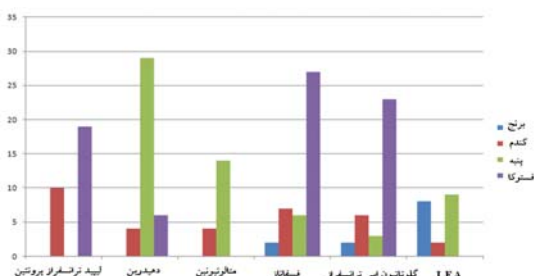
⁴ Amine oxidase

⁵ Glutathione peroxidase

⁶ Heat shock protein

⁷ Late embryogenesis abundant

⁸ Chaperonins



شکل ۳- بررسی توزیع ژن‌های دخیل در تنش خشکی در چهار کتابخانه تحت تنش خشکی

پیشنهادهای

با توجه به اهداف پژوهش در تعیین ژن‌های دارای بیان افتراقی و شناسایی ژن‌های کلیدی در فرایند مقاومت به تنش خشکی بوده، موارد زیر در ادامه این تحقیق پیشنهاد می‌شود:

- ۱- جدا سازی و بررسی مولکولی ژن‌های دارای بیان افتراقی
- ۲- شناسایی ارتباطات بین عوامل تاثیر گذار در فرایند مقاومت به تنش خشکی
- ۳- با توجه به تعیین ژن‌های کلیدی دخیل در فرایند مقاومت به تنش خشکی در گیاهان مختلف در این پژوهش می‌توان به دست ورزی این ژن‌ها به منظور افزایش مقاومت گیاهان مهم زراعی به تنش خشکی اقدام نمود.

سپاسگزاری

از دانشگاه زنجان بخاطر پشتیبانی مالی از پژوهش انجام شده و همچنین از اساتید محترم جناب آقایان دکتر بهرام ملکی و مرحوم دکتر علی حق نظری به‌خاطر پشتیبانی علمی در اجرای این پروژه تحقیقاتی کمال تشکر را داریم و نیز از همکاری‌های صمیمانه و پشتیبانی معاونت علمی و پژوهشی دانشگاه زنجان قدردانی می‌نمایم.

منابع

- Anderson J, Davis D (2003) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in (*Euphorbia esula*). Plant Biology. 32:430-441.
- Barret-Lennard EG, Robson AD, Greenway H (2008) Effect of phosphorous deficiency and water defiction phosphatase activities from wheat leaves. J Exp Bot 33:682-695.
- Bausher M, Shatters R, Chaparro J, Niedz R (2003) An expressed sequence tag (EST) set from Citrus sinensis L. Osbeck whole seedling and implications of further

وسيله استرس‌های خشکی و اسموتیک القا می‌شوند و ساختارهای مولکولی و سلولی را از اثرات صدمات کاهش آب حفاظت می‌کنند (Shiota et al. 1998). آنزیم‌های فسفاتاز به‌طور وسیعی در گیاهان یافت می‌شوند. به عبارت دیگر فسفاتازها دفسفریلاسیون فسفات آلی و تبدیل آن به فسفات معدنی را بر عهده دارند (Barret-Lennard et al. 2008). نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش آنزیم‌های فسفاتاز به ویژه در کتابخانه فستوکا تحت تنش خشکی گردیده و با افزایش سطح تنش، بیان این آنزیم‌ها افزایش یافت. عوامل محیطی مانند تنش خشکی می‌توانند سبب افزایش فعالیت درون سلولی و برون سلولی این آنزیم شود. اهمیت این آنزیم در تولید و انتقال فسفر می‌باشد (Julie et al. 2000). بعد از مقایسه دو به دوی کتابخانه‌ها و پیدا کردن اهمیت آن‌ها در این گیاهان مقایسه آماری بین نتایج بدست آمده از این تفاوت‌ها در چهار گیاه انجام شد و بررسی ژن‌های مهم دخیل در تنش خشکی در چهار کتابخانه تحت تنش خشکی نشان داد که لیپید ترانسفراز، گلوتاتیون اس ترانسفراز، دهیدرین، متالوتیونین، فسفاتازها، LEA که بیشتر اهمیت آن‌ها در مقاومت به تنش خشکی بیان شد، از جمله ژن‌های مهم دخیل در تنش خشکی در چهار کتابخانه برنج، گندم، پنبه و فستوکا تحت تنش بودند. بررسی توزیع این ژن‌ها در چهار کتابخانه تحت تنش خشکی در شکل ۳ آورده شده است. بررسی توزیع ژن‌های دخیل در تنش خشکی در چهار گیاه نشان داد که اکثر ژن‌های مهم دخیل در تنش خشکی، به ترتیب در گیاه فستوکا، پنبه، گندم و به مقدار کمتری در گیاه برنج تحت تنش خشکی افزایش بیان داشتند که نشان دهنده کارآمدتر بودن گیاه فستوکا و سپس پنبه در مقاومت به تنش خشکی می‌باشد.

perennial source investigations. Plant Science 165:415-422.

- Capell T, Bassie L, Christou P (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Plant Biology. 26:9909-9914.
- Chen L, Zhao LP, Gao QK (2005) Generation and analysis of expressed sequence tags from the tender shoots cDNA library of tea plant (*Camellia sinensis*). Plant Science. 168:359-363.
- Chugh A, Khurana P (2002) Gene expression during drought stress recent advances. Current Science 83:6-25.

- Dunand-Sauthier I, Walker C, Humphrey T (2005) Stress-Activated Protein Kinase Pathway Functions To Support Protein Synthesis and Translational Adaptation in Response to Environmental stress in Fission Yeast. *Eukaryotic Cell* 11:1785-1793.
- Ellis RJ, van SM (1991) Molecular chaperones embryogenic gene. *Plant Physiology* 94:690-695.
- Gao WR, Wang XS, Liu QY, Peng H, Chen Ch, Li JG, Zhang J, Hu SN, Ma H (2008) Comparative analysis of ESTs in response to drought stress in chickpea (*C. arietinum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communication* 376:578-583.
- Gorantla M, Babu PR, Lachagari VB, Feltus FA, Paterson AH, Reddy, AR (2005) Functional genomics of drought stress response in rice: Transcript mapping of annotated unigenes of an indica rice (*oryza sativa* L.cv. Nagina 22). *Current Science*. 89:496-513.
- Hide W, Miller R, Ptitsyn A, Kelso J, Gopallakrishnan C, Christoffels A (1999) EST Clustering Tutorial. *ISMB*. p. 24.
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M (2007) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Journal* 27:325-33.
- Julie EH, Simpson R J, Richardson AE (2000) The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose-1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant and Soil* 220:165-174.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (4):239-57.
- Kimberly D, Cameron A, Smart L (2006) Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. *Plant Physiology* 140:176-183.
- Kimura Y, Tanaka K (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *Journal of Biochem* 147:793-8.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2940-45.
- Kudla J, Xu Q, Harter K (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Plant Biology* 96:4718-4723.
- Lederer B, Boger P (2005) A Ligand Function of Glutathione S-Transferase. *Plant Physiology*. 171:63-87.
- Lein W, Usadel B, Stitt M, Reindl A, Ehrhardt T, Sonnewald U, Bornke F (2008) Large-scale phenotyping of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) to identify essential leaf functions. *Plant Biotechnology Journal* 6:246-263.
- Loones MT, Morange M (1998) Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo *Cell* 3:237-44.
- Lopez C, Banowitz G M, Kronstad W (2003) dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Science* 43:577-582.
- Man MZ, Wang X, Wang Y (2002) Power_SAGE: comparing statistical tests for SAGE experiments. *Bioinformatics* 16:953-959.
- Masoudi-Nejad A, Tonomura K, Kawashima Sh, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo T, Goto S (2006) EGASebler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Research* 34:459-462.
- McGinnis S, Madden TL (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 32:20-25.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Elsevier* 9:490-498.
- Mostajeran A, Rahimi-Eichi V (2009) Effects of Drought Stress on Growth and Yield of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars and Accumulation of Proline and Soluble Sugars in Sheath and Blades of Their Different Ages Leaves. *American-Eurasian* 5(2):264-272.
- Naghavi MR, malbobi M A, rashidi S (1388) bioinformatics.tehran university press, Tehran. Iran (In Farsi).
- Neerincx P, Leunissen, J (2005) Evolution of web service in bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*. 6:178-188.
- Persson B, Hedlund J, Jornvall H (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the MDR superfamily. *Cell Mol Life Sci* 65(24):3879-94.
- Pospisilova J, Synkova H, Rulcova J (2000) Cytokinins and water stress. *Biologia Plantarum*. 43(3):321-328.
- Reddy P, Sairanganayakulu G, Thippeswamy M, Reddy S, Reddy MK, Sudhakar Ch (2008) Identification of stress-induced genes from the drought tolerant semi-arid legume crop horsegram (*Macrotyloma uniflorum* Verdc.) through analysis of subtracted expressed sequence tags. *Plant Science* 175:372-384.
- Richards FJ, Coleman RG (1952) the polyamine biosynthetic pathway. *Nature* 170:460-463.
- Romualdi C, Bortoluzzi S, Dalessi G, Danieli GA (2003) IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiology Genomics* 12:159-162.
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Ulrich Guldener U, Mannhaupt G, Meunsterko M, Mewes HW (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research* 32:5539-5545.
- Sato m, Bremner L (1993) Oxygen free radicals and m et allothionein. *Biology and Medicine* 14:325-327.
- Sheffer KM, dunn JH, minner DD (2001) summer drought response and rooting depth of tree cool season turfgrasses. *HortSci* 22:296-297.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2008) Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol* 115:327-334.
- Shiota H, Satoh R, Watabe K, Harade H, Kamada H (1998) C-ABI3, the carrot homologue of the *Arabidopsis* ABI3, is expressed during both zygotic and somatic

embryogenesis and function in the regulation of embryo - specific ABA-Inducible genes. *plant cell physiology* 39:1184-1193.

Skuse G, Du Ch (2008) Bioinformatics Tools for Plant Genomics. *International Journal of Plant Genomics* 28:1-2.

Tausz M (2003) The Role of Glutathione in Plant Response and Adaptation to Natural Stress . *Plant Ecophysiology* 45:102-122.

Tibbles LA, Woodgett J R (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 55:1230-1254.

Tuberosa R, Salvi S (2006) Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Plant Science* 11:406-412.

Varshney RK, Langridge P, Graner A (2007) Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley. *Science direct* 58:121-55.

Wagner A, Krab K (2006) The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation. *Physiologia Plantarum* 95:318-325.

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann Rev Plant Biol* 53:247-273.