شناسایی و بررسی بیان ژن‌های *HvPIP1;4* و *HvnsLTP* دخیل در تحمل به تنش خشکی در جو

سجاد زارع[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۱*]، احمد اسماعیلی[۱] و حسن پاک نیت[۲]

[۱] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران، [۲]گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۲۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸)

چکیده

مطالعه سازوکارهای تحمل تنش در گیاه جو، می‌تواند به درک بهتر اساس ژنتیکی تحمل به تنش خشکی کمک کند و در نهایت به بهبود خصوصیات ژنتیکی مرتبط با تحمل به تنش خشکی از طریق روش‌های نوین ژنتیک مولکولی منجر شود. به منظور شناسایی و بررسی بیان ژن‌های درگیر در تحمل به تنش خشکی گیاه جو، تجزیه و تحلیل ESTهای برگ و ریشه در ژنوتیپ‌های اسپانتانئوم (جو وحشی) و رقم زراعی نیمروز (متحمل در برابر تنش خشکی) صورت گرفت. اطلاعات اولیه کتابخانه‌ها از پایگاه‌های جهانی دریافت گردید، سپس پیش پردازش داده‌ها و شناسایی ژن‌های مرتبط با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها، به کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیک متعددی صورت گرفت. به منظور بررسی بیان ژن‌های کاندید با استفاده از روش Real time-PCR، یک آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار روی ژنوتیپ‌ها به عنوان عامل اول و تیمار آبیاری (شاهد و آبیاری در۵۰ درصد FC) به عنوان عامل دوم در گلدان صورت گرفت. همچنین عامل زمان نمونه‌برداری نیز در سه سطح صفر، ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش خشکی لحاظ شد. بر اساس میزان بیان ژن در شرایط تنش، دو ژن به نام‌های *HvPIP1;4* (Plasma Membrane Intrinsic Protein 1;4) و *HvnsLTP* (Non-Specific Lipid Transport; nsLTP) به عنوان ژن‌های مهم درگیر در پاسخ به تنش خشکی در جو شناسایی شدند. بر اساس نتایج حاصل از بررسی بیان این ژن‌ها مشخص گردید که ژنوتیپ نیمروز به عنوان رقم متحمل از بیان بالاتری برای ژن‌های کاندید برخوردار بود، به طوری که ژن‌های *PIP1;4* و *nsLTP* به ترتیب یک افزایش ۹۵/۹۸ و ۵۳/۵٤ برابری بعد از ۷۲ ساعت نسبت به شرایط شاهد از خود نشان دادند. به‌علاوه، نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات میزان بیان ژن *PIP1;4* در مقایسه با ژن *HvnsLTP* جو در ژنوتیپ متحمل نیمروز بطور معنی‌داری ($P<0.05$) بیشتر از ژنوتیپ اسپانتانئوم بود. از آنجایی که این ژن حرکت آب و مواد محلول غیر باردار و دارای جرم مولکولی پایین را از شامه‌های پلاسمایی و تونوپلاست تسهیل می‌کند، این ژن احتمالاً در روند تحمل به تنش خشکی نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: آکواپورین، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی، شبکه ژنی، غشاء پلاسمایی

مقدمه

تنش‌های غیر زیستی، از جمله تنش خشکی موجب از بین رفتن بخش زیادی از تولیدات کشاورزی می‌شوند. میزان بارندگی و پراکنش نامطلوب آن، موجب شده است تا تنش خشکی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصولات زراعی در اراضی خشک و نیمه خشک مورد توجه قرار گیرد (Wang *et al*., 2013). امروزه استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک برای تولید گیاهان برخوردار از سطوح بالای

[*]نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: Nazarian.f@lu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

تحمل به تنش‌های غیرزنده، توجه زیادی را به خود معطوف داشته است. مطالعه بر روی سازوکارهای تحمل تنش خشکی در گیاهان می‌تواند در درک بهتر اساس ژنتیکی تحمل به خشکی مفید واقع شود و در نهایت به ما در بهبود خصوصیات ژنتیکی درگیر در تحمل خشکی از طریق روش‌های نوین ژنتیک مولکولی کمک کند (زارع و همکاران، ۱۳۹۵).

بسیاری از تلاش‌ها برای آشکارسازی سازوکارهای تحمل به خشکی در گیاهان از طریق مطالعات مولکولی و ژنتیکی صورت می‌گیرد، به طوری که تاکنون به کمک این روش‌ها، تعدادی از ژن‌های مسئول پاسخ‌گویی به تنش خشکی شناسایی و گزارش شده‌اند (Hazen *et al*., 2005). تعیین عملکرد بسیاری از ژن‌ها، مبتنی بر شباهت توالی آن‌ها با پروتئین‌هایی است که عملکرد آن‌ها قبلاً در سایر گونه‌ها پیش بینی گردیده‌اند. بعضی از این ژن‌ها، نقش مهمی در تحمل گیاهان در مقابل تنش خشکی از طریق دریافت سیگنال‌های انتقال، شبکه‌های تنظیم کننده بیان ژن در سطح سلولی یا از طریق مقاومت به پسابیدگی ایفا می‌کنند (Umezawa *et al*., 2006 ; Zhang *et al*., 2004). بسیاری از ژن‌های القا شونده توسط تنش‌های محیطی می‌توانند از طریق انتقال ژن در جهت ایجاد مقاومت در گیاهان مورد استفاده قرار گیرند(Abebe *et al*., 2004). ژن‌هایی که بیان آن‌ها تحت شرایط تنش خشکی افزایش می‌یابد به دو گروه تقسیم می‌شوند: الف) ژن‌هایی که پروتئین‌هایی با نقش حفاظت سلول در برابر تنش را رمز می‌کنند و ب) ژن‌هایی که پروتئین‌هایی ضروری برای انتقال پیام‌ها و تنظیم ژن‌های مرتبط با تنش را کد می‌نمایند (Mittler *et al*., 2004). تنش خشکی باعث ایجاد طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی چون بسته شدن روزنه، کاهش رشد سلول، کاهش فتوسنتز و افزایش فعالیت تنفسی در گیاه می‌گردد. مطالعات دیگر نشان می‌دهند که برخی از ژن‌های گروه LEA (Late Embryogenesis Abundant) باعث افزایش مقاومت به تنش خشکی می‌شوند و پروتئین‌های مربوطه همانند مولکول‌های شبه‌محافظ عمل کرده و مانع آسیب دیدن سلول می‌شوند (Umezawa *et al*., 2006). ژن *Hva* مربوط به گیاه جو یکی از پروتئین‌های خانواده LEA است که در اواخر مرحله نمو بذر در لایه آلورن تجمع پیدا می‌کند و با افزایش میزان اسید آبسیزیک و پسابیدگی بذر، میزان بیان آن بالا می‌رود (Hong *et al*., 1992). انتقال این ژن به گیاه برنج، موجب افزایش مقاومت به کمبود آب و شوری در این گیاه گردید و سبب افزایش سرعت رشد، تأخیر در بروز علائم ناشی از صدمات تنش و پیشرفت در بازیابی مجدد گیاه پس از رفع تنش گردید (Xu *et al*., 1996).

روش‌های متعددی برای شناسایی ژن‌های درگیر در تحمل تنش‌های مختلف وجود دارد. از جمله این روش‌ها، می‌توان به روش‌هایی مانند مطالعه موردی ژن‌ها شامل روش نورترن بلاتینگ (Brown *et al*., 2004) و نسخه برداری کمی در زمان واقعی (Heid *et al*., 1996)، روش ریزآرایه (Schena *et al*., 1995)، روش RNA-seq (Wang *et al*., 2009b) و یا مطالعه وسیع سطوح رونوشت‌ها توسط روش‌هایی همچون تخمین بیان ژن از طریق ساخت کتابخانه‌های EST (Expressed Sequence Tag) (Cushman and Bohnert, 2000) اشاره کرد. تجزیه و تحلیل ESTهای موجود در پایگاه‌های داده، یکی از مؤثرترین روش‌ها برای کشف ژن‌های فعال درگیر در مسیرهای بیوسنتزی می‌باشد (Cushman and Bohnert, 2000). این راهکار به شناسایی ژن‌های مؤثر در متابولیسم ثانویه، مسیرهای بیوشیمیایی و همچنین پاسخ به حمله عوامل بیماری‌زا و تنش‌های محیطی کمک شایان توجهی می‌کند (زینتی، ۱۳۹۳). از کاربردهای پیچیده تر تجزیه و تحلیل ESTها، می‌توان به شناسایی خانواده‌های ژنی حفاظت شده بین گونه‌های مورد بررسی، کشف پیرایش‌های متعدد یک ژن، تعیین ساختار ژن از طریق صف‌بندی و انطباق ویرایش‌ها و بررسی بیان ژن اشاره کرد (حیدری و همکاران، ۱۳۹۰).

امروزه با بکارگیری روش های 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 امکان پذیر می باشد (Bausher *et al*., 2003). با تکمیل پروژه‌های توالی یابی ژنوم در تعدادی از گیاهان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

ESTهای فراوانی برای مطالعه سایر گیاهان فراهم شده است. چنانچه توالی یک EST با توالی یک ژن مشخص همولوگ 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 نسبت به مسیرهای بیوشیمیایی ژن‌های کنترل کننده 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). گیاه جو(*Hordeum vulgare* L) در مقایسه با سایر غلات، بیشترین مقاومت را به تنش خشکی نشان می‌دهد و نسبت به غلات دیگر دارای سازوکارهای کارآمدتری در برابر کمبود آب می‌باشد، هرچند که عملکرد این گیاه با تنش خشکی و دمای بالا در مرحله پر شدن دانه محدود می‌شود (مرادی و همکاران، ۱۳۹۱). بررسی ژنومیکس کارکردی و الگوی بیان ژن‌ها در جو در پاسخ به تنش خشکی می‌تواند منجر به شناسایی ژن‌های مؤثر در القای مقاومت به تنش در این گیاه استراتژیک گردد. از این رو هدف از این تحقیق شناسایی برخی ژن‌های درگیر در تحمل تنش خشکی در جو و بررسی بیان آن‌ها در دو رقم متحمل و حساس با استفاده از تجزیه و تحلیل ESTهای برگ و ریشه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری اطلاعات EST: یک کتابخانه EST '۵ مربوط به برگ گیاه جو با شناسه Lib.13887 از پایگاه داده NCBI دریافت گردید. این کتابخانه شامل ۲۰۱۶ توالی EST بود. لازم به ذکر است جستجوی کتابخانه‌ها بین کتابخانه‌هایی با حداقل ۱۰۰۰ توالی EST صورت گرفت. همچنین دو کتابخانه‌ی EST '۵ مربوط به ریشه گیاه جو نیز از پایگاه یاد شده دریافت گردید. کتابخانه اول با شناسه Lib.9798 شامل ۱۴۶۹ توالی در شرایط بدون تنش و کتابخانه دوم با شناسه Lib.9796 شامل ۳۸۶۳ توالی در شرایط تنش خشکی بود.

پیش پردازش: برای انجام مرحله پیش‌پردازش از سرویس بیوانفورماتیک EGassembler (Masoudi-Nejad *et al*., 2006) استفاده شد. خروجی این سرویس شامل کانتیگ‌ها، سینگلتون‌ها و فایل صف‌بندی توالی‌های EST بود.

دسته‌بندی و هم‌گذاری ESTها به منظور بررسی بیان ژن‌ها در کتابخانه برگ: از آنجایی که تعداد و نوع ESTهای هر کانتیگ قابل ردگیری است، امکان بررسی بیان آنها نیز فراهم است. ESTهای کتابخانه برگ با هم دسته‌بندی و هم‌گذاری شدند. پس از تشکیل کانتیگ‌ها، کانتیگ‌هایی با حداقل ۱۰ توالی EST، به عنوان ژن‌هایی با بیان بالا مد نظر قرار گرفتند.

دسته‌بندی و هم‌گذاری‌ESTها به منظور بررسی بیان ژن-ها در کتابخانه‌های ریشه: چون برای بافت ریشه هم کتابخانه شاهد و هم کتابخانه تنش وجود داشت، امکان مقایسه بین دو وضعیت فراهم بود. به همین خاطر، توالی‌های EST دو کتابخانه با به کارگیری مجدد سرویس EGassembler، هم زمان با هم و با در نظر گرفتن حداقل ٪۸۰ همانندی، دسته بندی و هم گذاری شدند. از آزمون آدیک و کلاوری برای شناسایی ژن‌هایی با بیان افتراقی استفاده گردید (Audic and Claverie, 1997). آزمون آدیک و کلاوری دقیق‌ترین آزمون برای شناسایی تغییرات بیان ژن در مقایسه‌های جفتی است و مبتنی بر محاسبه احتمال شرطی و یکسانی بیان ژن‌های مورد بررسی در هر دو کتابخانه است (Audic and Claverie, 1997)، از این رو، از این آزمون جهت بررسی بیان ژن‌ها طی تنش خشکی در جو استفاده شد. برای این منظور از ابزار IDEG6 (Romualdi *et al*., 2003) استفاده گردید. در اینجا، کانتیگ‌ها به عنوان نماینده‌ای از ژن‌های مختلف درنظر گرفته شدند و تعداد ESTهای هر کتابخانه در هر کانتیگ (به عنوان معیاری از تعداد رونوشت آن ژن در همان کتابخانه) و تعداد کل ESTهای هر کتابخانه به عنوان ورودی‌های لازم برای انجام آزمون در ابزار IDEG6 استفاده شدند. سطح معنی‌داری (α) نیز برابر با ٪۵ در نظر گرفته شد. پس از شناسایی کانتیگ‌های با بیان افتراقی بین دو کتابخانه، به منظور شناسایی ژن‌های متناظر با هر کانتیگ، کانتیگ‌های مورد نظر در مقابل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

جدول ۱ توالی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های منتخب، اکتین و برخی از ویژگی‌های آنها

نام ژن	آغازگر	طول قطعه مورد انتظار روی cDNA (جفت باز)
HvLTP	LqF 5′-GCAGGTGCCTCAAGAGTGTCG-3′ LqR 5′-CAGTCGACACTGGCGCTGATC-3′	۱۰۹
HvPIP1;4	PqF 5′-ACAACAAGAAGCAGGCGTGG-3′ PqR 5′-CTTGAAGGGGATTGCCCTGATC-3′	۱۱۳
Actin	ActF 5′- AGATGATAACAGCAGTGGAGC -3′ ActR 5′- TCCATCCTAGCCTCACTCAG -3′	۱۳۱

پروتئین‌های جو با استفاده از نرم‌افزار CLCGenomics workbench 3.6 بلاست ایکس شدند. برای این منظور، همه توالی‌های پروتئینی جو از پایگاه داده‌ی EXPASY دریافت گردیدند و از آن به عنوان مرجع در بلاست استفاده شد.

تعیین و بررسی شبکه ژنی: به منظور تعیین شبکه ژنی بین ژن‌هایی با بیان بالا در بافت برگ و همچنین ژن‌هایی با بیان تغییر یافته در بافت ریشه گیاه جو، تمام کانتیگ‌های مربوطه همزمان با هم در مقابل توالی‌های پروتئینی گیاه آرابیدوپسیس (http://www.arabidopsis.org) با استفاده از نرم‌افزار CLC genomics workbench بلاست ایکس شدند. در مرحله بعد، با استفاده از نرم‌افزار PathwayStudio7 ، شبکه ژنی بین کدهای پروتئنی به دست آمده در مرحله بلاست ایکس تعیین گردید. تجزیه و تحلیل این شبکه با نرم افزار Cytoscape 3.4.0 انجام شد. در اینجا پارامترهای Betweenness centrality، Closeness centrality و edge betweenness (Girvan and Newman, 2002; Boccaletti *et al*., 2006) برای شناسایی ژن‌های مهم شبکه بکار گرفته شدند.

کشت گیاه و اعمال تنش: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلدان روی ارقام زراعی نیمروز (متحمل در برابر تنش خشکی) و اکوتیپ جو وحشی اسپانتانئوم (با شماره دسترسی TN49402 بانک ژن ملی ایران) به عنوان عامل اول و تیمار آبیاری (شاهد و آبیاری در۵۰ درصد ظرفیت زراعی) به عنوان عامل دوم با ۳ تکرار منظور گردید. همچنین عامل زمان نمونه‌برداری نیز در سه سطح صفر، ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش خشکی لحاظ گردید.

مطالعه‌ی الگوی بیان ژن‌ها: به منظور بررسی بیان ژن‌های کاندید، طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی با بهره گیری از برنامه OLIGO5 صورت گرفت (جدول ۱). RNA کل با استفاده از محلول ترایزول (شرکت Invitrogen) از اندام برگ و ریشه استخراج شد. سپس برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم DNase1 (RQ1 RNase-free DNase, Promega) تیمار شدند. پس از همسان سازی غلظت RNAهای مختلف، واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت iScript cDNA synthesis kit (BIO-RAD) انجام گرفت. الگوی بیان ژن‌های شناسایی شده با استفاده از Real time-PCR (iCycler iQ real-time PCR, Bio-Rad) بررسی شد. میزان بیان ژن با روش Efficiency adjusted ΔΔCt (Yuan *et al*., 2008) محاسبه گردید.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل داده‌هایEST برگ جو در شرایط تنش خشکی: با پیش پردازش ۲۰۱٦ توالی EST از بافت برگ گیاه جو در شرایط تنش خشکی، توالی‌های نامناسب حذف گردیدند و تعداد ۱۹۳۹ توالی با کیفیت مناسب باقی ماندند. با هم‌گذاری این تعداد EST، تعداد ۱۵۷۸ توالی unigenes شامل تعداد ۱۹۳ کانتیگ (با میانگین طول ۵۷۹ جفت باز) و ۱۳۹٤ سینگلتون به دست آمد. در مجموع، ۲۸/۱۱ درصد از کل توالی‌های ESTی این کتابخانه وارد کانتیگ‌ها شدند. همچنین، تعداد ESTهای تشکیل دهنده کانتیگ‌ها از ۲ (برای ۱۸۸ کانتیگ) تا ۲۵ (برای یک کانتیگ) متغیر بود.

بررسی کارکردی unigeneهای با بیان بالا در شرایط تنش خشکی در برگ جو: جستجوی بلاست ایکس در مقابل توالی‌های پروتئینی جو برای تمام کانتیگ‌های کتابخانه‌های EST انجام شد. نتایج نشان داد که ٤۳/۵۲ درصد از کانتیگ‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

جدول ۲- درصد گروه‌های کارکردی مهم پروتئینی فعال طی تنش خشکی در برگ جو

گروه‌های کارکردی فعال	درصد کانتیگ‌ها	گروه‌های کارکردی فعال	درصد کانتیگ‌ها	گروه‌های کارکردی فعال	درصد کانتیگ‌ها
chlorophyll binding	۷/۹۲	acyl-CoA dehydrogenase	۱/۰	Nucleic acid binding	۱/۰
ATP binding	٦/۹۳	adenine phosphoribosyltransferase	۱/۰	Oxidoreductase	۱/۰
calcium ion binding	٥/۹٤	ATP:ADP antiporter	۱/۰	Peptidase	۱/۰
transporter	٤/۹٥	calcium:proton antiporter	۱/۰	Phosphatidylcholine biosynthetic process	۱/۰
catalytic	۳/۹٦	carbonate dehydratase	۱/۰	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	۱/۰
lipid binding	۳/۹٦	chitinase	۱/۰	Protein kinase C inhibitor	۱/۰
cysteine-type peptidase	۲/۹۷	chromatin binding	۱/۰	Protein serine/threonine phosphatase	۱/۰
metal ion binding	۲/۹۷	copper ion binding	۱/۰	Protein-cysteine S-palmitoyltransferase	۱/۰
structural constituent of ribosome	۲/۹۷	defense response to fungus	۱/۰	Pyridoxal phosphate binding	۱/۰
GTPase	۱/۹۸	DNA binding	۱/۰	Ribosome binding	۱/۰
hydrolase	۱/۹۸	electron carrier	۱/۰	Sequence-specific DNA binding	۱/۰
L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase	۱/۹۸	fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase	۱/۰	Serine-type carboxypeptidase	۱/۰
O-methyltransferase	۱/۹۸	fructose-bisphosphate aldolase	۱/۰	Transferase	۱/۰
proton-transporting ATPase	۱/۹۸	GTP binding	۱/۰	Transferase , transferring acyl groups	۱/۰
raffinose alpha-galactosidase	۱/۹۸	hydrogen ion transmembrane transporter	۱/۰	Translation elongation factor	۱/۰
transferase , transferring acyl groups	۱/۹۸	inositol oxygenase	۱/۰	Translation initiation factor	۱/۰
transferase , transferring glycosyl groups	۱/۹۸	kinase	۱/۰	Transmembrane receptor protein kinase	۱/۰
1,3-beta-D-glucan synthase	۰/۹۹	licheninase	۱/۰	Triose-phosphate isomerase	۱/۰
4 iron, 4 sulfur cluster binding	۰/۹۹	L-malate dehydrogenase	۱/۰	UDP-glucose 4-epimerase	۱/۰
		NAD binding	۱/۰	Zinc ion binding	۱/۰

مربوط به کتابخانه تنش خشکی شباهت معنی‌داری با ژن‌های شناخته شده یا مفروض (Putative) جو دارند. همچنین ٤۳/۰۱ درصد از کانتیگ‌ها با ژن‌های با کارکرد ناشناخته هم‌خوانی داشتند. باقی‌مانده توالی‌ها یعنی ۱۳/٤۷ درصد، هیچ خروجی مشخصی در بین پروتئین‌های جو نداشتند.

همچنین مشخص شد که ۱۰۱ توالی کانتیگ، حاوی اطلاعات ماهیت‌شناسی ژن (Gene ontology) می‌باشد و در ٥۹ گروه کارکردی مختلف قرار می‌گیرند (جدول ۲). همان طور که در جدول ۲ آورده شده است، در شرایط تنش خشکی بخش بزرگی از فعالیت ژنوم به ژن‌های مرتبط با فتوسنتز (اتصال به کلروفیل)، هم‌ایستایی انرژی (اتصال به ATP)، اتصال به یون کلسیم و ترانسپورترها اخصاص داشت.

بر مبنای تعداد ESTهای تشکیل دهنده کانتیگ‌ها و با لحاظ کردن حداقل ٥ توالی به صورت قراردادی، در جریان اعمال تنش خشکی، ۲۱ ژن با بیان بالا در بافت برگ جو شناسایی گردیدند (جدول ۳). کانتیگ شماره ۹ با ۲٥ توالی EST بیشترین بیان را نشان داد. این کانتیگ با پروتئین پیش‌بینی شده‌ای مطابقت داشت که در پاسخ به تنش آلودگی قارچی در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

جدول۳- تعداد توالی EST و نتایج بلاست مربوط به ژنهای با بیان بالا (حداقل ۵ توالی EST) طی تنش خشکی

Query	EST No.	Lowest E-value	Entry	Protein names	Gene ontology
Contig 9	۲۵	1.12E-64	F2EBL3	Predicted protein	Hordeum vulgare var. distichum (Domesticated barley)
Contig 173	۲۲	1.74E-48	F2E1T8	Non-specific lipid-transfer protein	lipid transport
Contig 98	۱۶	2.18E-97	M0Y7A8	Uncharacterized protein	phosphatidylcholine biosynthetic process
Contig 2	۱۴	2.35E-54	Q42848	Non-specific lipid-transfer protein	lipid transport
Contig 118	۱۱	3.05E-61	Q40047	Transmembrane protein	–
Contig 40	۱۰	1.28E-86	F2CT91	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	carbon fixation
Contig 27	۹	2.22E-97	M0YHQ0	Uncharacterized protein	–
Contig 26	۷	2.09E-20	F2EC03	Hexosyltransferase	–
Contig 1	۷	4.41E-19	I3QM88	Metallothionein	–
Contig 167	۷	4.77E-19	M0XTV9	Uncharacterized protein	fatty acid beta-oxidation
Contig 101	۶	1.21E-35	F2E5Q1	Profilin	–
Contig 186	۶	2.79E-25	M0VPD4	Uncharacterized protein	–
Contig 128	۶	2.04E-79	F2CT51	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	carbon fixation
Contig 143	۶	2.33E-26	Q7DM44	Lichenase	carbohydrate metabolic process
Contig 176	۵	1.96E-13	F2DXU8	Predicted protein	–
Contig 17	۵	1.01E-34	F2EJL5	Predicted protein (Uncharacterized protein)	–
Contig 123	۵	5.42E-06	Q40051	Glycine rich protein (Fragment)	–
Contig 82	۵	2.25E-74	F2DF63	Predicted protein (Uncharacterized protein)	polyamine metabolic process
Contig 50	۵	1.01E-34	F2CSG7	Non-specific lipid-transfer protein	lipid transport
Contig 56	۵	7.50E-38	M0V695	Non-specific lipid-transfer protein	lipid transport
Contig 37	۵	2.13E-31	M0WR69	Uncharacterized protein	–

جو نقش دارد (Accession; GO:0050832). کانتیگ ۱۷۳ نیز که دارای توالی کد کننده پروتئین nsLTP بود با ۲۲ توالی EST در رده بعدی قرار گرفت. همچنین کانتیگ‌های شماره ۲، ۵۰ و ۵۶، به ترتیب با ۱۴، ۵ و ۵ توالی EST نیز کدکننده نوع دیگری از این دست پروتئین‌ها بودند که در بین ژن‌های با بیان بالا قرار گرفتند. این موضوع، بازگو کننده اهمیت بیشتر این خانواده پروتئینی در پاسخ به تنش خشکی در برگ گیاه جو بود.

واکاوی آماری و جستجوی عملکردی کتابخانه‌های EST: پس از پیش‌پردازش هم‌زمان توالی‌های ESTی کتابخانه‌های بدون تنش و تنش خشکی ریشه جو، تعداد ۵۲۷۱ توالی با کیفیت بدست آمد. دسته‌بندی و هم‌گذاری این توالی‌ها نشان داد که ۲۵۲۸ توالی (۴۷/۹۶ درصد) در ۶۹۲ کانتیگ قرار گرفتند و ۲۷۴۳ توالی (۵۲/۰۴ درصد) به صورت سینگلتون باقی ماندند. تعداد ESTهای تشکیل دهنده کانتیگ‌ها از دو توالی (برای ۳۵۴ کانتیگ) تا ۳۹ توالی (برای یک کانتیگ) متغیر بود. میانگین طول کانتیگ‌ها نیز برابر با ۶۹۸ جفت باز بود.

آزمون آدیک و کلاوری مشخص کرد که ۱۳۷ کانتیگ دارای بیان افتراقی معنی‌داری ($P<0.05$) بین شرایط بدون تنش و تنش خشکی بودند. از این کانتیگ‌ها، ۲۲ کانتیگ با افزایش بیان و ۱۱۵ کانتیگ با کاهش بیان همراه بود. جستجوی بلاست

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

جدول ٤-میانگین مربعات بیان ژن‌ها در پاسخ به تیمارهای آزمایش

	درجه آزادی	HvnsLTP	HvPIP1;4
رقم	۱	٤۱۲٥/٤۹	۳٥٤۱/۸۷
تنش خشکی	۱	۱۲۹٤/٥٦	۲۸۷۱/٤۳
رقم*تنش خشکی	۱	۱۱۳٥/۰۱	٥٤۹/۹۸
زمان	۲	٤۰۹/۰٦	۸۹۷/۷٦
رقم*زمان	۲	۲٤۲/۸٦	٤۳۲/۸۹
تنش خشکی*زمان	۲	۲۷۰/۹۲	۲۹۸/۸۷
رقم*تنش خشکی*زمان	۲	۳٤۲/۳٥	٤۸۲/۱۲
خطا	۲٤	۱۰/۳۸	۸/۷٦
ضریب تغییرات		۲۳/۲۳	۱۹/٤۳

ایکس در برابر توالی‌های پروتئینی جو نشان داد که در بین کانتیگ‌هایی با بیان افتراقی، ۱۲۰ کانتیگ، خروجی مشخصی در بین پروتئین‌های جو نداشتند ($E\text{-value}\leq10^{-5}$). بر این اساس، بیشترین افزایش بیان به یک ژن از خانواده آکوآپورین به نام *PIP1:4* (کانتیگ ۳۲۰) و بیشترین میزان کاهش بیان به یک ژن با کارکرد ناشناخته (کانتیگ ١٦٢) اختصاص داشت.

با جستجوی بلاست کانتیگ‌های بافت برگ در مقابل پروتئین‌های گیاه آرابیدوپسیس، مشخص شد که برای ۱۳۵ کانتیگ، خروجی مشخصی با $E\text{-valu=1}\times10^{-5}$ وجود دارد. همچنین ۵۷۲ کانتیگ از بافت ریشه نیز حداقل با یکی از پروتئین‌های آرابیدوپسیس دارای شباهت معنی‌دار($P<0.05$) بود. شبکه ژنی به دست آمده از این ۷۰۷ ژن، دارای ۱۹۳ گره و ۲۳۲ لبه بود.

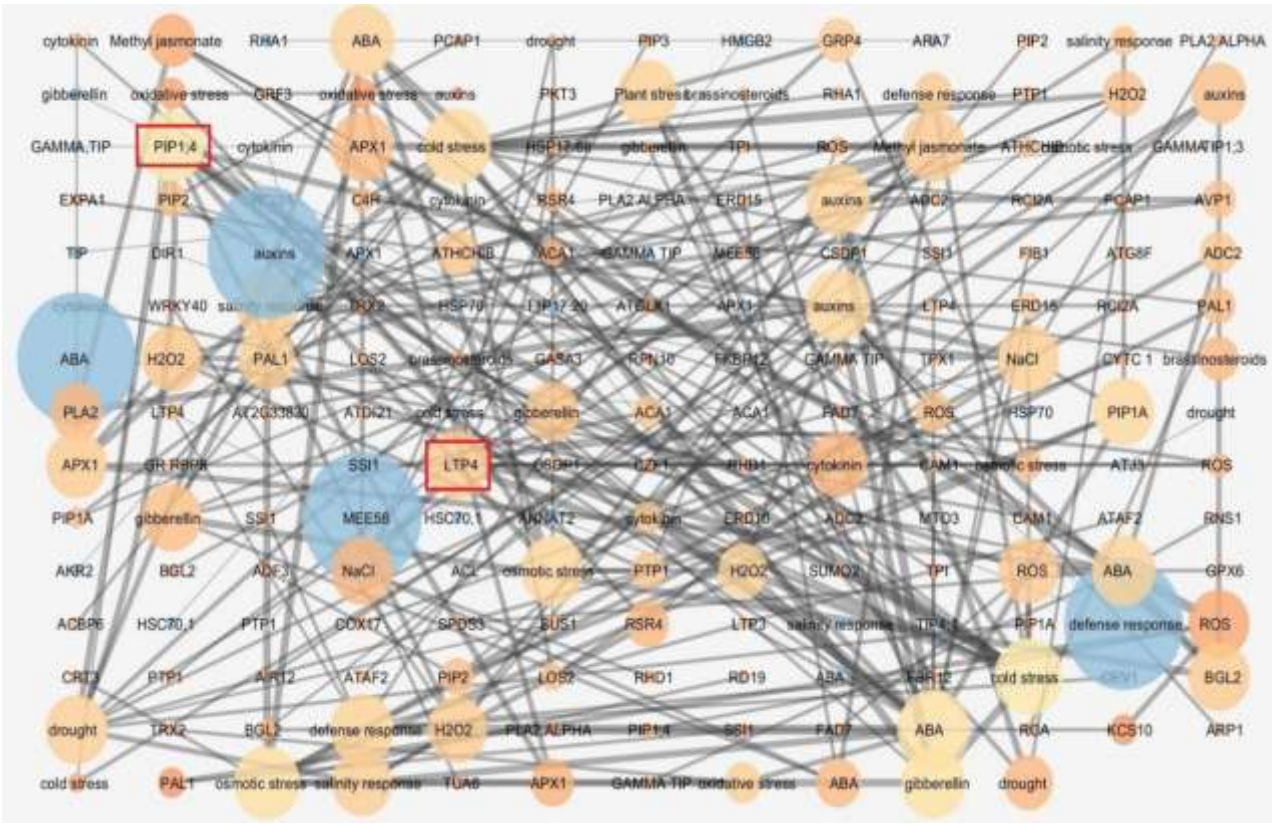
تجزیه و تحلیل این شبکه ژنی نشان داد که بر اساس پارامترهای Betweenness centrality، Closeness centrality و edge betweenness بخش عمده‌ای از ژن‌های شناسایی شده در مسیر پاسخ به هورمون ABA، پاسخ به تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی و همچنین مسیر پیام رسانی هورمون‌های گیاهی دخالت دارند (شکل ۱). در بین ژن‌های مطالعه شده نیز ژن‌های *APX1*، *PIP1;4*، *LTP4*، *PLA2* و *BGL2* به طور متوسط بیشترین پارامترهای مرکزیت شبکه را به خود اختصاص دادند.

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه کتابخانه‌های ESTی برگ و ریشه جو در شرایط تنش خشکی، دو ژن به نام‌های *PIP1;4* (کانتیگ ۳۲۰ از مطالعه ریشه) و *nsLTP* (کانتیگ ۱۷۳ از مطالعه برگ) برای ارزیابی بیشتر انتخاب شدند.

بررسی بیان نسبی ژن *HvnsLTP*: نتایج تجزیه داده‌های حاصل از بررسی بیان نسبی این ژن نشان داد که بیان این ژن بین دو رقم و بین شرایط بدون تنش و تنش خشکی دارای اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) می‌باشد و رقم نیمروز به عنوان رقم متحمل از بیان بالاتری برخوردار بود (شکل ۲a)، در ژنوتیپ وحشی با اعمال تنش خشکی اختلاف معنی‌داری ($P>0.05$) مشاهده نگردید، اما در رقم نیمروز با گذشت زمان و افزایش تأثیر تنش خشکی بیان این ژن تا ۷۲ ساعت پس از تنش افزایش نشان داد از آنجا که این ژن در پایداری غشا نقش دارد بنظر می‌رسد فعالیت ژن تا مدت زمانی که گیاه در برابر تنش مقاومت می‌کند ادامه داشته باشد. همچنین روند بیان این ژن در رقم نیمروز در شرایط عدم تنش با گذشت زمان یکسان بود و اختلاف معنی‌داری ($P>0.05$) را نشان نداد (شکل ۲a).

بررسی بیان نسبی ژن *HvPIP1;4*: نتایج مطالعه روی بیان این ژن نشان داد که بیان این ژن تحت تأثیر ژنوتیپ و تنش خشکی قرار می‌گیرد ($P<0.05$). بطور کلی، رقم نیمروز بیان بالاتری نسبت به ژنوتیپ اسپانتانئوم نشان داد از طرفی هر دو ژنوتیپ در شرایط تنش از افزایش بیان برخوردار بودند، اما این

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]



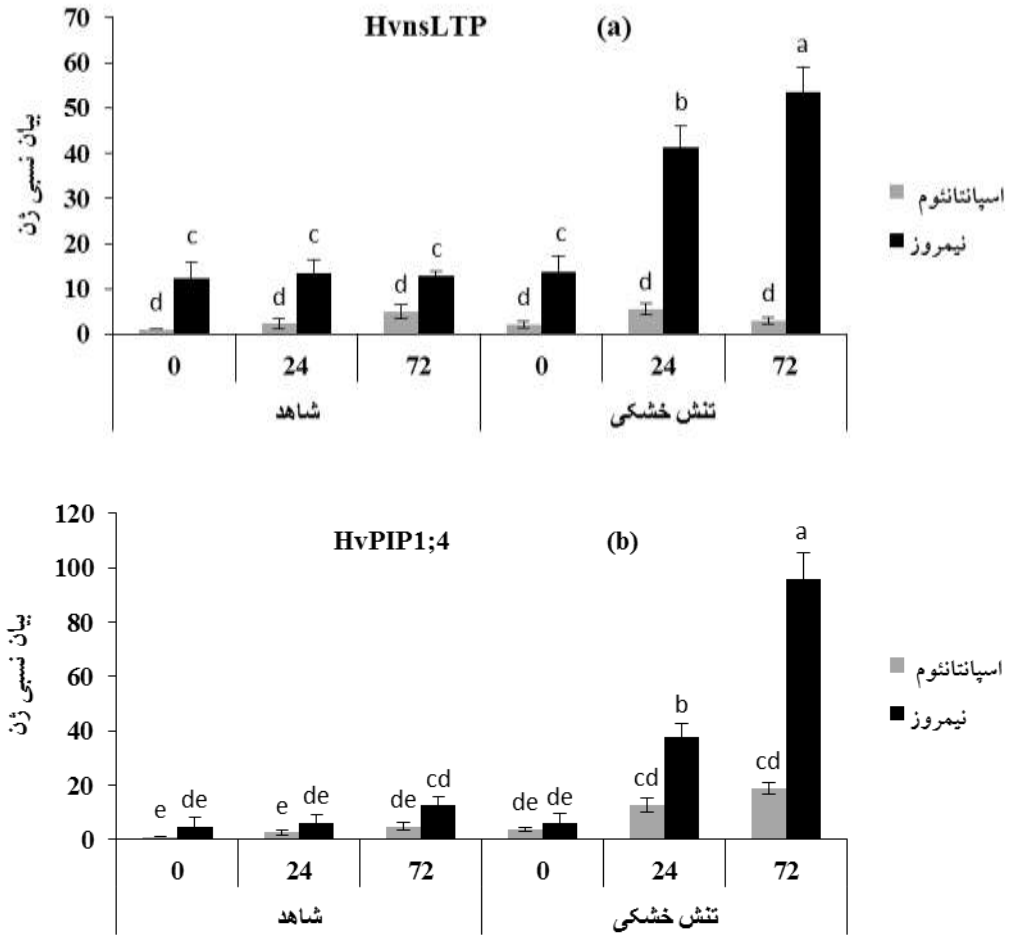
شکل ۱- تجزیه و تحلیل شبکه ژنی به دست آمده از ژن‌های پاسخ به تنش خشکی در جو: قطر دایره‌ها میزان Betweenness centrality، شدت رنگ دایره‌ها از رنگ سرد به رنگ گرم میزان Closeness centrality و قطور خطوط میزان Edge betweenness را نشان می‌دهد. جایگاه دو ژن *PIP1;4* و*nsLTP* نیز با مستطیل مشخص شده است.

افزایش بیان در رقم متحمل نیمروز بالاتر بود و با گذشت زمان از اعمال تیمارهای آزمایش و تأثیر تنش، این افزایش بیان شدت یافت (شکل ۲b).

دستگاه پاسخ سلولی به تنش شامل مواد انتقال دهنده محلول نظیر اکواپورین‌ها، فعال کننده‌های رونوشت برداری، آنزیم‌های رمزکننده محلول‌های سازگار همچون کربوهیدرات‌های محلول، مواد تخریب کننده اکسیژن فعال و نیز پروتئین‌های محافظت کننده می‌باشد (زینتی، ۱۳۹۳). برای دفاع در مقابل صدمات ناشی از کم آبی و پسابیدگی، دو استراتژی عمده را می‌توان برشمرد: الف) سنتز مولکول‌های محافظت‌کننده در طی مرحله جذب مجدد آب برای اجتناب از این صدمات؛ و ب) سازوکار جبران در طی جذب مجدد آب برای خنثی سازی صدمات وارده از طرف تنش کم آبی (زینتی، ۱۳۹۳). داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف در حین مواجهه با تنش خشکی پاسخ‌های متفاوتی نشان می‌دهند در همین رابطه فاروق و همکاران به پاسخ متفاوت ارقام به سطوح تنش اشاره نموده‌اند (Farooq *et al.*, 2009). ژنوتیپ‌هایی که دارای عملکرد بهتری در حین مواجهه با تنش می‌باشند، با سازوکارهای کارآمدتری مثل تنظیم اسمزی خوب، هدایت روزنه‌ای بالا و محتوی نسبی آب بالای برگ، سبب خنک نگه داشتن گیاه شده و در نتیجه از کارایی فتوسنتزی بالاتری برخوردار بوده‌اند که منجر به حصول عملکرد بالای گیاه شده است. آنچه که باعث مجموعه این رخدادها در چرخه زندگی یک گیاه می‌شود، سازوکارهای مولکولی هستند که با شروع تنش به راه می‌افتند (Harb *et al.*, 2010).

کانتیگ ۱۷۳ دارای ژن کد کننده پروتئین nsLTP، با ۲۲ توالی EST در بین کانتیگ‌هایی با بیشترین توالی قرار داشت.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]



شکل ۲- مقایسه بیان نسبی ژن (نسبت به شرایط شاهد در زمان صفر) a) HvnsLTP و b) HvPIP1;4 در ارقام مورد مطالعه در پاسخ به تیمار تنش خشکی در صفر، ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش خشکی

پروتئین‌های nsLTP پروتئین‌های کوچک و اساسی هستند که به میزان زیادی در گیاهان عالی وجود دارند و نقش مهمی در فرآیندهای سیتولوژی گیاهی از قبیل پایداری غشا، سازماندهی دیواره سلولی و القای پیام بازی می‌کنند (Liu *et al.*, 2015). نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بررسی بیان نسبی این ژن، نشان داد که بیان این ژن بین دو رقم و بین شرایط بدون تنش و تنش خشکی دارای اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) بود. در رقم نیمروز با گذشت زمان و افزایش تأثیر تنش خشکی بیان این ژن تا ۷۲ ساعت پس از تنش افزایش نشان داد. نتایج به دست آمده با سایر نتایج در گیاهان دیگر مطابقت دارد، بطوری که محققین بسیاری به نقش این ژن در القای مقاومت به تنش یخ زدگی (Giordani *et al.*, 2011) تنش شوری (Pitzschke *et al.*, 2014) تنش خشکی (Edstam and Kielbowicz-Matuk *et al.*, 2008) تنش دمای پایین (Edqvist, 2014) تنش قلیایی (Wang *et al.*, 2009a) تنش پروکسید هیدروژن (Tapia *et al.*, 2013) تنش فلزات سنگین (Wang *et al.*, 2009a) نور (Sohal *et al.*, 1999) و بریدگی (Cameron *et al.*, 2006) اشاره نموده‌اند. طبق مطالعات صورت گرفته افزایش بیان این ژن در گیاهان تراریخت منجر به افزایش و القای مقاومت به تنش‌های غیرزیستی می‌شود. همچنین مشخص شده است که جلوگیری از بیان ژن *ltp3* در گیاه مدل آرابیدوپسیس موجب القای حساسیت به تنش خشکی در این گیاه می‌گردد (Arondel *et al.*, 2000). مطالعات Sun و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که القای ژن *nsLTP* در پاسخ به تیمارهای تنش شوری، پلی اتیلن گلایکول، ابسیزیک اسید، دمای بالا (۳۷ درجه سانتیگراد) و دمای پایین (٤ درجه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

سانتیگراد) در گیاه *Thellungiella salsuginea* رخ می‌دهد (Sun *et al*., 2015). افزایش رونوشت‌های *LTP4* در پاسخ به تنش خشکی و شوری در ارقام مقاوم گندم نسبت به ارقام حساس نیز شده است (Safi *et al*., 2015).

در رابطه با بافت ریشه مشخص شد که بیشترین افزایش بیان به یک ژن از خانواده آکوآپورین به نام *HvPIP1:4* (کانتیگ ۳۲۰) و بیشترین میزان کاهش بیان به یک ژن با کارکرد ناشناخته (کانتیگ ۱۶۲) اختصاص داشت. بررسی بیان این ژن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که رقم نیمروز از بیان بالاتری نسبت به ژنوتیپ اسپانتانئوم برخوردار بود. آکوآپورین‌ها در تعادل اسمزی گیاهان تحت شرایط تنش خشکی نقش دارند، پروتئین‌های سازنده کانال آبی (آکواپورین‌ها) در همه موجودات زنده وجود دارند و هدایت آبی سلول‌ها و بافت‌ها با آن‌ها تنظیم می‌گردند. این پروتئین‌ها متعلق به خانواده بزرگی از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های سراسری (Integral) هستند که حرکت آب و مواد محلول غیر باردار و دارای جرم مولکولی پایین را از شامه‌های پلاسمایی و تونوپلاست تسهیل می‌کنند (Bohnert and Jensen, 1996). آکواپورین‌های گیاهی تنوع ایزوفرمی قابل توجهی را نشان می‌دهند. تعیین توالی ژنوم، تعداد دقیق ژن‌های آکواپورین را تا مرز ۳۵ عدد در گیاه آرابیدوپسیس (Johanson *et al*., 2001; Siefritz *et al*., 2001) و ۳۳ عدد در گیاه ذرت (Zelazny *et al*., 2007; Chaumont *et al*., 2001) نشان می‌دهد. Johanson و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که آکواپورین‌های *NtPIP1;1* و *NtPIP2;1* در بخش‌های مختلف گیاه توتون از جمله ریشه، برگ، گل، بساک و مادگی بیان می‌شوند. همچنین مطالعه دیگری نشان داد که آکواپورین *PIP1;2* با القای مقاومت به تنش خشکی در توتون از تجزیه کلروفیل جلوگیری می‌کند و کاهش معنی‌داری ($P<0.05$) در میزان کلروفیل a و کلروفیل کل در جهش یافته‌های *pip1;2* گزارش نمودند (مهدیه و همکاران، ۱۳۹۲). آکواپورین‌های PIP به عنوان انتقال دهنده‌های H_2O_2 در عرض غشا شناخته شده اند، طی مطالعه دیگری توسط این محققین در بررسی میزان فعالیت آنزیم های CAT, SOD و G-POD در شرایط مطلوب و تحت تنش خشکی در دو دسته از گیاهان شاهد و جهش یافته *pip1:2* به این نتیجه رسیدند که میزان فعالیت هر سه آنزیم در حد ۵٪ افزایش معنی داری در گیاهان تحت تنش نسبت به شرایط مطلوب داشت. کاهش معنی دار فعالیت آنزیم CAT در گیاهان جهش یافته نسبت به شاهد در شرایط مطلوب شاید نشان دهنده نقش غیر مستقیم *PIP1:2* در توزیع هیدروژن پراکسید باشد، در دو آنزیم SOD, G-POD این کاهش معنی دار دیده نشده است اما به نظر می‌رسد که جهش یافته های *pip1:2* تنش خشکی را نسبت به گیاهان شاهد زودتر احساس کرده باشند (مهدیه و همکاران، ۱۳۹۲). از طرفی مشخص شده است که القای *PIP1;4* در آرابیدوپسیس منجر به مقاومت به تنش سرما در ریشه های آرابیدوپسیس می‌شود و تنش سرما در نمونه های وحشی با کاهش هدایت الکترولیتی سلولی همراه بودند اما القای ژن *PIP1;4* از کاهش هدایت الکترولیتی سلولی تحت تیمار تنش سرما جلوگیری کرد (Lee *et al*., 2012).

منابع

حیدری، پ.، ملکی زنجانی، ب. و حیدری، ش. (۱۳۹۰) تجزیه و تحلیل منابع EST در گندم، برنج، پنبه و فستوکا تحت تنش خشکی به منظور بررسی بیان ژن و ژنومیکس عملکردی. مجله ژنتیک نوین ۲: ۱۲۹-۱۴۰

زارع، س.، شبر، ز. و فتوت، ر. (۱۳۹۵) بررسی بیان برخی ژن‌های کاندید دخیل در نرعقیمی گندم در شرایط تنش خشکی در مرحله میوز. مجله زیست فناوری گیاهان زراعی ۱۳: ۷۷-۶۹

زینتی، ز. (۱۳۹۳) بررسی ژنومیکس کارکردی و الگوی بیان ژن ها در گندم و خویشاوندان وحشی آن جهت یافتن ژن های مؤثر در مقاومت به شوری. پایان نامه دکتری، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

مرادی، م.، شبر، ز.، فتوت، ر. و حیدری، م. (۱۳۹۱) بررسی پاسخ گیاه جو به تنش خشکی با استفاده از داده‌های EST، چهارمین همایش بیوانفورماتیک ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

مهدیه، م.، شاهپوری، س. و امیرجانی، م.(۱۳۹۲) نقش *PIP 1;2* در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت گیاه *Arabidopsis thaliana* در پایخ به تنش خشکی، اولین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، همدان، ایران.

مهدیه، م.، شاهپوری، س. و امیرجانی، م.(۱۳۹۲) نقش آکواپورین *PIP1;2* در میزان کلروفیل های گیاه *Arabidopsis thaliana* در پاسخ به تنش خشکی، اولین همایش ملی مهندسی و مدیریت کشاورزی، محیط زیست و منابع طبیعی پایدار، همدان، ایران.

Abebe, T., Skadsen, R. W. and Kaeppler, H. F. (2004) Cloning and identification of highly expressed genes in barley lemma and palea. Crop Science 44: 942-950.

Arondel, V., Vergnolle, C., Cantrel, C. and Kader, J. C. (2000) Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science 157: 1-12.

Audic, S. and Claverie, J. M. (1997) The significance of digital gene expression profiles. Genome Research 7: 986-995.

Bausher, M., Shatters, R., Chaparro, J., Dang, P., Hunter, W. and Niedz, R. (2003) An expressed sequence tag (EST) set from *Citrus sinensis* L. Osbeck whole seedlings and the implications of further perennial source investigations. Plant Science 165: 415-422.

Boccaletti, S., Latora, V., Moreno, Y., Chavez, M. and Hwang, D. U. (2006) Complex networks: Structure and dynamics. Physics Reports 424:175-308.

Bohnert, H. J. and Jensen, R. G. (1996) Metabolic engineering for increased salt tolerance–the next step. Functional Plant Biology 23: 661-667.

Brown, T., Mackey, K. and Du, T. (2004) Analysis of RNA by Northern and slot blot hybridization. Current Protocols In Molecular Biology 4:9-19.

Cameron, K. D., Teece, M. A. and Smart, L. B. (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.

Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R. and Chrispeels, M. J. (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. Plant Physiology 122: 1025-1034.

Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M. J. and Jung, R. (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. Plant Physiology 125: 1206-1215.

Cushman, J. C. and Bohnert, H. J. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. Current Opinion in Plant Biology 3: 117-124.

Edstam, M. M. and Edqvist, J. (2014) Involvement of GPI-anchored lipid transfer proteins in the development of seed coats and pollen in *Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum 152: 32-42.

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Sustainable Agriculture 1: 153-188.

Giordani, T., Buti, M., Natali, L., Pugliesi, C., Cattonaro, F., Morgante, M. and Cavallini, A. (2011) An analysis of sequence variability in eight genes putatively involved in drought response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theoretical and Applied Genetics 122: 1039-1049.

Girvan, M. and Newman, M. E. (2002) Community structure in social and biological networks. Proceedings of The National Academy of Sciences 99: 7821-7826.

Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M. M. and Pereira, A. (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. Plant Physiology 154: 1254-1271.

Hazen, S. P., Pathan, M. S., Sanchez, A., Baxter, I., Dunn, M., Estes, B., Chang, H. S., Zhu, T., Kreps, J. A. and Nguyen, H. T. (2005) Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. Functional and Integrative Genomics 5: 104-116.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. Genome Research 6: 986-994

Hide, W., Miller, R., Ptitsyn, A., Kelso, J., Gopallakrishnan, C. and Christoffels, A. (1999) EST clustering tutorial. In: Proceedings of the 7th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology

Hong, B., Barg, R. and Ho, T. H. D. (1992) Developmental and organ-specific expression of an ABA-and stress-induced protein in barley. Plant Molecular Biology 18: 663-674.

Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjovall, S., Fraysse, L., Weig, A. R. and Kjellbom, P. (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. Plant Physiology 126: 1358-1369.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

Kielbowicz-Matuk, A., Rey, P. and Rorat, T. (2008) The organ-dependent abundance of a Solanum lipid transfer protein is up-regulated upon osmotic constraints and associated with cold acclimation ability. Journal of Experimental Botany 59: 2191-2203.

Lee, S. H., Chung, G. C., Jang, J. Y., Ahn, S. J. and Zwiazek, J. J. (2012) Overexpression of PIP2; 5 aquaporin alleviates effects of low root temperature on cell hydraulic conductivity and growth in Arabidopsis. Plant Physiology 159:479-488.

Liu, F., Zhang, X., Lu, C., Zeng, X., Li, Y., Fu, D. and Wu, G. (2015) Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis. Journal of Experimental Botany 66: 5663-5681.

Masoudi-Nejad, A., Tonomura, K., Kawashima, S., Moriya, Y., Suzuki, M., Itoh, M., Kanehisa, M., Endo, T. and Goto, S. (2006) EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. Nucleic Acids Research 34: 459-462.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science 9: 490-498.

Pitzschke, A., Datta, S. and Persak, H. (2014) Salt stress in Arabidopsis: lipid transfer protein AZI1 and its control by mitogen-activated protein kinase MPK3. Molecular Plant 7: 722-738.

Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Grondin, A., Boursiac, Y., Morillon, R., Schaffner, A. R. and Maurel, C. (2010) A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis. Plant Physiology 152: 1418-1430.

Romualdi, C., Bortoluzzi, S., d'Alessi, F. and Danieli, G. A. (2003) IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. Physiological Genomics 12: 159-162.

Safi, H., Saibi, W., Alaoui, M. M., Hmyene, A., Masmoudi, K., Hanin, M. and Brini, F. (2015) A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry 89:64-75.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. and Brown, P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science-New York Then Washington 1: 467-467.

Siefritz, F., Biela, A., Eckert, M., Otto, B., Uehlein, N. and Kaldenhoff, R. (2001) The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. Journal of Experimental Botany 52: 1953-1957.

Sohal, A. K., Pallas, J. A. and Jenkins, G. I. (1999) The promoter of a Brassica napus lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and stimulated by light and viral infection in transgenic Arabidopsis. Plant Molecular Biology 41: 75-87.

Sun, W., Li, Y., Zhao, Y. and Zhang, H. (2015) The tsnsltp4, a nonspecific lipid transfer protein involved in wax deposition and stress tolerance. Plant Molecular Biology Reporter 33: 962-974.

Tapia, G., Morales-Quintana, L., Parra, C., Berbel, A. and Alcorta, M. (2013) Study of *nsLTPs* in *Lotus japonicus* genome reveal a specific epidermal cell member (LjLTP10) regulated by drought stress in aerial organs with a putative role in cutin formation. Plant Molecular Biology 82: 485-501.

Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. Current Opinion In Biotechnology 17: 113-122.

Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q. and Guo, S. (2013) The critical role of potassium in plant stress response. International Journal of Molecular Sciences 14: 7370-7390.

Wang, P., Bouwman, F. G. and Mariman, E. (2009a) Generally detected proteins in comparative proteomics–a matter of cellular stress response? Proteomics 9:2955-2966.

Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009b) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics 10: 57-63.

Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T. H. D. and Wu, R. (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiology 110: 249-257.

Yuan, J. S., Wang, D. and Stewart, C. N. (2008) Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. Biotechnology Journal 3: 112-123.

Zelazny, E., Borst, J. W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M. A. and Chaumont, F. (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. Proceedings of the National Academy of Sciences 104: 12359-12364.

Zhang, J. Z., Creelman, R. A. and Zhu, J. K. (2004) From laboratory to field. Using information from Arabidopsis to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. Plant Physiology 135: 615-621.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]

Identification and evaluation of *HvPIP1; 4* and *HvnsLTP* genes expression for drought tolerance in barley

Sajjad Zare[1], Farhad Nazarian Firouzabadi[1], Ahmad Ismaili[1] and Hassan Pakniyat[2]

[1] Department of Agronomy and Plant breeding, Agriculture Faculty, Lorestan University, Khorramabad, Iran
[2]Department of Crop Production and Plant Breeding, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
(Received: 11/0711/2017, Accepted: 17/02/2018)

Abstract

It is of great significance to understand the tolerance mechanisms by which plants deal with drought stress and application of these mechanisms for improvement of genotypes in response to drought stress. In order to identify and investigate the expression of genes involved in tolerance to drought stress, leaf and root EST were analyzed in Spontaneum (wild barley) and Nimruz (tolernt to drought stress) barley genotypes. The library's initial information was received from the databases and the bioinformatics services were used for the pre-processing and identifying genes. In order to investigate the expression of candidate genes with Real time-PCR, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design in a pot with 3 replications. First factor included cultivars (Nimruz and Spontaneum) and second factor was irrigation (control and 50%FC). Also sampling times were considered at 3 levels of 0, 24 and 72 hours after drought stress. Two genes HvPIP1; 4 (Plasma Membrane Intrinsic Protein 1;4) and HvnsLTP(Non-specific lipid transport) were identified based on expression in stress conditions as important genes involved in response to drought stress in the barely. Based on the analysis of gene expression, it was found that Nimruz genotype as resistant cultivar had a higher expression for candidate genes. The expression of HvPIP1; 4 and HvnsLTP genes were 95.98 and 54.53fold after 72 hours, respectively. In addition, the results of this study showed that changes in HvPIP1; 4 gene expression were significantly ($P < 0.05$) higher than the HvnsLTP in the Nimruz genotype in the compared to the spontanum genotype. So, this gene played key role in drought resistance in Barley.
Keywords: Aquaporin, Bioinformatics Analysis, Gene Network, Plasma membrane

***Corresponding author, Email: Nazarian.f@lu.ac.ir**

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.30.22.6]