

## Isolation and Study of *MPK2* and *AREB* to Evaluate Drought Resistance of Tomato Plants

Yousefi Javan I.<sup>\*1</sup> *PhD*, Gharari F.<sup>1</sup> *MSc*

<sup>1</sup>Plant Production Department, Agriculture Faculty, Torbat Heydarieh University, Torbat Heydarieh, Iran

### Abstract

**Aims:** Osmotic stress such as drought, salinity, and cold is one of the most important stresses. The aim of this study was to isolate and evaluate the genes of AREB and MPK2 in order to study the resistance to drought of tomato plants.

**Materials & Methods:** In this experimental study, seeds of two varieties of Tomato (Red Cloud) and (Peto Pride; resistant and susceptible to drought stress, respectively) were grown in drought treatment levels of -2 and -4. This study used 3 replications by a model based on a completely randomized block design. Sampling was done for Thiobarbituric acid reactive material (TBARM) for each treatment in 3 replications. Randomized and repeated sampling were done for molecular studies and the genes expression. *AREB1* and *MPK2* genes were studied, using bioinformatics resources and with the help of specific primers, making cDNA, PCR, and Electrophoresis. The analysis of variance test and SPSS 15 software were used

**Findings:** With increasing drought stress, most of morphological traits had a considerable decline, but cellular oxidative index increased with the increase of stress, so that TBARM increased. The expression of *AREB1* was higher than that of *MPK2* gene expression. The rate of similarity between LeAREB and kinase 2 protein sequences in resistant tomatoes was 31%.

**Conclusion:** With increasing drought stress, most morphological traits have a significant decline, but TBARM shows a significant increase with increasing stress. The *AREB1* resistant drought gene is induced by the effects of drought stresses, while the expression of the *MPK2* gene does not show a significant difference.

### Keywords

Gene Isolation [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/81000302>];

Transcription Factor [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68014157>];

Drought stress [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68055864>];

Osmotic Adjustment [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68009997>]

---

\*Corresponding Author

Tel: +98 (51) 5124000

Fax: +98 (51) 5124000

Post Address: Torbat Heydarieh University, 7 Kilometer Torbat Heydarieh- Mashhad Road, Razavi Khorasan Province, Iran

i.javan@torbath.ac.ir

Received: November 28, 2016

Accepted: December 4, 2017

ePublished: December 21, 2018

## جداسازی و بررسی ژن‌های *MPK2* و *AREB* به منظور بررسی مقاومت به خشکی گیاه گوجه‌فرنگی

ایمان یوسفی‌جوان\* PhD

گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

فائزه قراری MSc

گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

### چکیده

**اهداف:** تنش اسمزی از قبیل خشکی، شوری و سرما، یکی از مهم‌ترین تنش‌ها است. هدف پژوهش حاضر جداسازی و بررسی ژن‌های *MPK2* و *AREB* به منظور مطالعه مقاومت به خشکی گیاه گوجه‌فرنگی بود.

**مواد و روش‌ها:** در پژوهش تجربی حاضر، بذره‌ای دو رقم گوجه‌فرنگی ردکلود (Red Cloud) و پتوپراید (Peto Pride) (به ترتیب مقاوم و حساس به خشکی) در سطوح تیمار خشکی شامل ۲- و ۴-مگاپاسکال کشت داده شدند. آزمایش در قالب طرح آماری بلوک کامل تصادفی با سه تکرار و نمونه‌برداری برای محاسبه شاخص بیوشیمیایی اسیدتیوباریتوریک (TBARM) در مورد هر تیمار در سه تکرار انجام شد. نمونه‌برداری تصادفی و تکراردار برای انجام مطالعات مولکولی و بررسی میزان بیان ژن‌ها نیز صورت گرفت. ژن‌های *MPK2* و *AREB1* با کمک منابع بیوانفورماتیک و آغازگرهای اختصاصی، ساخت cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، الکتروفورز و استخراج بررسی شدند. آزمون آماری آنالیز واریانس و نرم‌افزار SPSS 15 به کار رفتند.

**یافته‌ها:** با افزایش میزان تنش خشکی، اغلب صفات مورفولوژیک، افت قابل توجهی داشتند اما شاخص اکسیداسیون سلولی با افزایش میزان تنش افزایش چشم‌گیری نشان داد، به طوری که میزان TBARM افزایش یافت. بیان ژن *AREB1* نسبت به بیان ژن *MPK2* بیشتر بود. درصد تشابه بین توالی‌های پروتئینی LeAREB و کیناز ۲ در گوجه‌فرنگی رقم مقاوم ۳۱٪ به دست آمد. **نتیجه‌گیری:** با افزایش میزان تنش خشکی، اغلب صفات مورفولوژیک، افت قابل توجهی دارند اما شاخص اکسیداسیون سلولی با افزایش میزان تنش، افزایش چشم‌گیری نشان می‌دهد. ژن مقاوم به تنش خشکی *AREB1* تحت تاثیر تنش‌های زیستی خشکی القا بیشتر می‌شود، در حالی که بیان ژن *MPK2* تفاوت زیادی نشان نمی‌دهد.

**کلیدواژه‌ها:** جداسازی ژن، عامل رونویسی، تنش خشکی، تنظیم اسمزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۳

\*نویسنده مسئول: i.javan@torbath.ac.ir

### مقدمه

گوجه‌فرنگی محصول فصل گرم است و رسیدن محصول به دمایی در حدود ۲۷ تا ۳۰°C نیاز دارد. گوجه‌فرنگی از نظر مصرف آب، گیاه پرمصرفی است و هر گونه تنش خشکی سبب ترک‌خوردن میوه‌های آن می‌شود. موفقیت در تولید عملکرد بالای این محصول به میوه‌دهی مناسب در هر خوشه و رسیدن میوه‌ها به بستیگی دارد. به طوری که ازدست‌رفتن یک یا دو میوه در هر خوشه عملکرد را به صورت معنی‌داری کاهش خواهد داد. با شناخت ژن‌های درگیر در ایجاد مقاومت به خشکی و انتخاب ارقام اصلاح‌شده مناسب می‌توان از گوجه‌فرنگی در اکثر مناطق میزان محصول نسبتاً مشابهی تولید کرد. حرارت‌های خیلی زیاد، در تبدیل گل به میوه دخالت دارند و از تشکیل میوه جلوگیری می‌کنند. سازش‌پذیری گیاه به گرما حاصل تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک متنوعی است که اساساً از تغییر در بیان تعدادی از ژن‌های مسئول در تحمل‌پذیری به تنش خشکی ناشی می‌شود<sup>[1]</sup>. گیاهان زراعی از نظر ظرفیت جذب آب، تعرق و واکنش نسبت به تنش خشکی

عکس‌العمل متفاوتی دارند. فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهان عمدتاً تابع وضع آب در گیاه هستند و تنها به طور غیرمستقیم تحت تاثیر تنش آب در خاک و هوا قرار می‌گیرند<sup>[2]</sup>.

بنابراین مقدار معینی تنش آب در خاک، الزاماً همان مقدار تنش در گیاه را ایجاد نخواهد کرد. این تفاوت در میزان تنش تابع عواملی مانند مقاومت در برابر جریان آب در خاک که با محتوی آب تغییر می‌کند. مقاومت در برابر حرکت آب از روزه‌ها به هوا که با شرایط جوی تغییر می‌کند و مهم‌تر از همه مقاومت در برابر حرکت آب در ریشه‌ها و سایر بافت‌های گیاهی، به عوامل فیزیولوژیکی و ساختار ژنتیکی بستگی داشته و به هیچ وجه ثابت نیستند. بنابراین، معمولاً پیش‌بینی وضع آب در گیاه، به تنهایی از روی شرایط خاک یا هوا امکان‌پذیر نیست و ممکن است یک گیاه با وجود رطوبت زیاد در خاک پژمرده شود یا با وجود خشکی نسبی خاک شاداب بماند<sup>[3]</sup>.

اتکا به پتانسیل ژنتیکی ارقام و تلاش در جهت بهبود و اصلاح ژنتیکی آنها نقشی اساسی در القای تحمل به خشکی ایجاد می‌کند. از آنجایی که اصول بنیادی هر برنامه به‌نژادی از طریق مطالعه پارامترهای ژنتیکی تعیین می‌شود، آگاهی از نحوه و اثر ژن‌ها در حصول موفقیت برنامه‌های به‌نژادی ضروری است. شناسایی مکانیزم‌های مولکولی در تحمل‌پذیری گیاهان به تنش‌های محیطی برای گیاهان زراعی اهمیت اقتصادی دارد. تنش آبی در گیاه یا کمبود آب که به آن تنش خشکی هم اطلاق می‌شود وضعیتی است که در آن سلول‌ها از حالت آماس خارج شده باشند. به عبارت ساده‌تر تنش خشکی زمانی رخ می‌دهد که سرعت تعرق بیش از سرعت جذب آب باشد. تنش خشکی زیاد موجب کاهش فتوسنتز، اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی و سرانجام خشک‌شدن و مرگ گیاه می‌شود<sup>[4,5]</sup>.

حالت دهیدراسیون در گیاهان به عنوان یک واکنش حفاظتی برای جلوگیری یا جبران خسارت‌های وارده به سلول‌ها عمل می‌کند. بررسی مسیر سیگنال‌دهی آبسزیک‌اسید (ABA) و مسیرهای القا‌شونده در گیاه گوجه‌فرنگی سهم بسزایی در شناخت مولکولی واکنش گیاهان در مقابل دهیدراسیون دارد. آب در تمام فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان نقشی محوری دارد. وضعیت آب در گیاه به وسیله اندازه‌گیری محتوی پتانسیل و محتوی نسبی آب توصیف می‌شود. سلول‌های تمام جانداران گیرنده‌ها، فرستنده‌ها و تنظیم‌کننده‌هایی دارند که به آنها امکان پاسخ و سازگاری در مقابل تغییرات میزان آب را می‌دهد. دستگاه پاسخ سلولی شامل مواد انتقال‌دهنده محلول‌هایی مانند آکوپورین‌ها، فعال‌کننده‌های رونویسی، آنزیم‌های سنتزکننده محلول‌های سازگار، تخریب‌کننده‌های اکسیژن فعال و پروتئین‌های محافظ است.

رشدونمو در گیاهان با سیگنال‌های داخلی و محیطی همراه است که گیاه از طریق تنظیم‌کننده‌های رشد یا همان هورمون به آنها پاسخ می‌دهد. از جمله این هورمون‌ها می‌توان به آبسزیک‌اسید، جیبرلین و اکسین اشاره کرد<sup>[6,7]</sup>.

دهیدراسیون در گیاهان، منجر به افزایش میزان آبسزیک‌اسید می‌شود که در اثر اعمال تنش‌هایی مانند خشکی سنتز شده و همچنین موجب القای بیان ژن‌های چندگانه، مسئول دفاع، در مقابل اثرات سوء کم‌آبی می‌شود. آبسزیک‌اسید موجب بسته‌شدن روزه‌ها می‌شود، بنابراین تلفات آب در جریان تنفس را کاهش می‌دهد. مسیر بیوسنتزی آبسزیک‌اسید یک شاخه فرعی از مسیر کاروتنوئیدی بوده و بسیاری از آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی آبسزیک‌اسید، بر اثر وقوع دهیدراسیون تنظیم می‌شوند<sup>[8]</sup>.

تعدادی از ژن‌های درگیر در تنش خشکی، احتمالاً افزایش بیان این پیام‌رسان‌ها در رقم مقاوم، در مقاومت این رقم، تحت شرایط تنش نقش دارد. از نقش‌های عمده فاکتورهای رونویسی برای سنتز پروتئین‌ها مقاوم به تنش‌های خشکی، بیان و فعال کردن، ژن‌های هدف مانند ژن‌های لازم برای سنتز مولکول‌های حفاظتی است. به‌طور معمول، برای بررسی نحوه بیان ژن‌های القاشونده توسط تنش خشکی ناحیه پروموتور اهمیت زیادی دارد.

بیان ژن AREB کدکننده یک نوع پروتئین با نام LEAREB و تنظیم این ژن مرتبط با یک‌سری ژن‌های تنظیمی دیگر است که بدین‌ترتیب هنگام تنش نقش مهمی را خشکی ایفا می‌کند و دسته دیگر از پروتئین‌های موثر مورد مطالعه در این پژوهش، پروتئین‌کیناز هستند. پروتئین‌های کیناز آنزیم‌های کنترل‌کننده فرآیندهای مختلف سلولی از جمله پاسخ به محرک‌های محیطی هستند. مطالعات بسیاری به جهت شناسایی نقش پروتئین‌کیناز در مقاومت به تنش خشکی صورت پذیرفته است.

به‌طور کلی صفت مقاومت به خشکی صفتی پیچیده است که علاوه بر صفات مرفولوژیک گیاه، ژن‌ها و پروتئین‌های متعددی در آن نقش دارد و همچنین تنش ایجادشده در محیط، پیامی را ایجاد می‌کند که این پیام توسط گیرنده‌هایی که عمدتاً در سلول‌های ریشه قرار دارند دریافت و به سلول‌های اندام هوایی فرستاده می‌شود. این پیام‌ها فاکتورهای رونویسی را فعال کرده که منجر به رونویسی از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های عملکردی و ترکیبات اسمزی می‌شوند و نهایتاً با تولید این ترکیبات گیاه شرایط کم‌آبی را تحمل می‌کند. به‌دلیل هدفمندکردن تحقیقات آزمایشگاهی، در این مطالعه میزان بیان ژن‌های AREB و MPK2 همچنین با کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی، توالی و ساختار پروتئینی آنها بررسی شد. علاوه بر این با هدف مطالعه کارایی پروتئین‌های فوق، ابتدا با روش تشابه، ساختار آن مدل‌سازی شد و در ادامه، تاثیر موتیف‌ها و اسیدآمینه‌هایی که منجر به افزایش کارآمدی این پروتئین می‌شوند، پیش‌بینی شد. دستاوردهای پژوهش حاضر احتمالاً به‌منظور دست‌ورزی ژن این پروتئین و در راستای ارتقای کارآمدی آن، بسیار مفید خواهد بود.

پژوهش حاضر با هدف جداسازی و بررسی ژن‌های AREB و MPK2 به‌منظور مطالعه مقاومت به خشکی گوجه‌فرنگی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

ارقام مورد استفاده در پژوهش تجربی حاضر دو رقم پتوپراید با حساسیت به تنش‌های محیطی به‌ویژه به تنش دمایی و رقم ردکلود با عدم حساسیت به دمای بالا و رشد در نواحی گرمسیری بودند که این ویژگی قابلیت مناسبی برای حمل و نقل ایجاد کرده است.

**جداسازی بذرها و اندازه‌گیری شاخص اکسیداسیون سلولی اسیدتیوباریتوریک (TBARM):** بذرهاي گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) روی کاغذ صافی اتوکلاو و در پتری‌دیش قرار داده شدند، سپس با آب مقطر آبیاری صورت پذیرفت. بذور جوانه‌زده به گلدان‌های گلخانه آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربت حیدریه انتقال یافتند و از گیاهانی که به مرحله چندبرگی رسیدند برای استخراج DNA و RNA کل استفاده شد. بذرهاي دو رقم گوجه‌فرنگی مقاوم و حساس به تنش دمایی به‌ترتیب به نام‌های ردکلود و پتوپراید از بانک ژن گیاهی ایران واقع در کرج تهیه شدند. این بذرها ابتدا با محلول هیپوکلیت سدیم ۵٪

افزایش آبسزیک‌اسید منجر به فعال شدن یک‌سری عوامل رونویسی می‌شود که از جمله آنها عوامل رونویسی ژن AREB هستند. این عوامل رونویسی به‌نوبه‌خود ژن‌های پایین‌دستی که در ناحیه پیشبری خود مناطق ویژه‌ای به نام عوامل پاسخ ABA (ABRE) دارند، را فعال می‌کنند<sup>[8]</sup>. عوامل رونویسی در انتقال پیام تنش‌هایی مانند شوری، خشکی و نور فرابنفش نقش دارند<sup>[9]</sup>.

در مسیر وابسته به ABA دو خانواده از عوامل رونویسی نقش مهمی در سازگاری و تحمل گیاه در برابر تنش دارند که شامل عناصر واکنش پذیر اسیدآسبزییک (AREB/ABF) و MYC/MYB هستند. در مسیر مستقل از ABA، عوامل رونویسی خانواده DREB/CBF و خانواده عوامل رونویسی MPK است. در شرایط تنش اسمزی مانند خشکی و شوری بالا، هورمون گیاهی ABA، به کمک عوامل رونویسی در بیان ژن‌های مرتبط با استرس، مسئولیت از بین بردن تنش‌ها را بر عهده دارند.

مطالعات مولکولی در گیاهان نشان داده است که تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری و سرما، ژن‌هایی را تحریک می‌کنند که اعمال گوناگونی بر عهده دارند. پروتئین اتصال به عوامل رونویسی ژن AREB، بیان ژن وابسته به ABA را فعال می‌کند<sup>[10]</sup>.<sup>[11]</sup> که عمدتاً از طریق سه عامل رونویسی bZIP، این سازگاری شکل می‌گیرد. این سه عامل شامل AREB1/ABF2، AREB2/ABF4 و ABF3 هستند، این سه عامل توسط SNF1 مرتبط با کیناز 2s (SnRK2s) فعال می‌شوند.

سیگنال تنش وابسته به آبسزیک‌اسید، به‌وسیله فاکتور رونویسی AREB که به عناصر تنظیمی ABRE در ناحیه پروموتوری متصل می‌شود، موجب القای برخی ژن‌های پاسخگو به تنش می‌شود<sup>[12]</sup>. در بسیاری از گیاهان، از جمله گوجه‌فرنگی فاکتور رونویسی ژن‌های DREB و CBF تنظیم بیان بسیاری از ژن‌های هدف القاشونده با تنش را کنترل می‌کند که موجب افزایش مقاومت به خشکی و شوری در این گیاه شده است.

وضعیت آب در گیاه به‌وسیله اندازه‌گیری محتوی پتانسیل و محتوی نسبی آب توصیف می‌شود. اگر تعادل آب در گیاه به هم بخورد، گیاه وارد مرحله کم‌آبی شده و دچار تنش آبی می‌شود. حرکت مولکول‌های آب به‌وسیله شیب پتانسیل آبی در غشای پلاسمایی اندازه‌گیری می‌شود که خود تحت تاثیر غلظت مولکول‌های داخل و خارج سلول قرار می‌گیرد.

تنش خشکی آثار گوناگونی بر گیاهان زراعی دارد که می‌توان به تغییرات فنوتیپی، آنزیمی و تظاهر ژن آنها اشاره نمود. از دیدگاه مولکولی، به‌طور عمده آثار مضر تنش خشکی از طریق تولید مقادیر زیادی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن حاصل می‌شود. این رادیکال‌ها در غلظت‌های بالا موجب آسیب جدی به سلول می‌شوند، در حالی که در غلظت‌های پایین نقش پیام‌رسانی تنش را ایفا می‌کنند<sup>[13]</sup>.

ژن‌ها و پروتئین‌هایی که در مقاومت به خشکی در گیاهان دخیل هستند، به چهار دسته پروتئین‌های عملکردی، ترکیبات فعال اسمزی، عوامل رونویسی و عوامل سیگنالی تقسیم می‌شوند. عوامل رونویسی تنظیم بیان اکثر ژن‌ها را کنترل کرده و موجب افزایش یا کاهش بیان ژن‌های هدف می‌شوند. در نتیجه بیان فاکتورهای رونویسی، می‌تواند بیان ژن‌های هدف را در پاسخ به تنش خشکی تنظیم کند. افزایش مقاومت در گیاه مقاوم به‌دلیل حضور عوامل رونویسی ژن AREB و در نهایت به‌دلیل کاهش فعالیت پیام‌رسان‌ها است. با توجه به نقش فاکتورهای رونویسی AREB در تنظیم بیان ژن‌های القاشده توسط آبسزیک‌اسید و

به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی و سپس در گلدان‌های مجزا کشت داده شدند. بذرها در شرایط بستر سبک (کوارتز، ماسه، پرلیت و کوکوپیت به نسبت ۳۰ به ۲۰، ۳۰ و ۲۰٪) کشت و در مرحله چهاربرگی به منظور بهاره‌سازی به مدت شش هفته در دمای ۴°C قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها در اتاقک کشت گلخانه با شرایط طول روز ۱۶ ساعت و طول شب ۸ ساعت (دمای روز ۲۷°C و دمای شب ۱۶°C و رطوبت نسبی ۶۵٪) قرار داده شدند. در ابتدا در هر گلدان بزرگ ۲۰ کیلوگرمی، سه بوته و پس از استقرار کامل به یک بوته تنک یافت.

این آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت پذیرفت، سطوح تیمار خشکی مشتمل بر مقادیر بار و براساس مقدار ۲- و ۴-مگاپاسکال معادل حجم آب مورد نیاز در تکرارهای هر تیمار آبیاری شد. آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی به‌عنوان شاهد نیز اعمال شد. دوره آبیاری پس از انتقال به گلخانه تحقیقاتی به‌طور ثابت و به‌صورت هفتگی انجام شد. نمونه‌برداری برای محاسبه شاخص بیوشیمیایی TBARM در مورد هر تیمار، پنج روز پس از اعمال آبیاری در تیمار مربوطه و در مرحله آغاز گلدهی در سه تکرار انجام شد.

برای اندازه‌گیری TBARM که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است، مقدار اسیدتیوباربیتریک که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ حیاتی است، اندازه‌گیری می‌شود. در این خصوص از روش هگگ و همکاران استفاده شد<sup>[14]</sup>. در این روش ۵/۰ گرم نمونه برگ هموژنیزه و یک میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک (۱۵٪ وزنی/حجمی) به آن اضافه شد. محلول حاضر با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به‌شدت مخلوط (ورتکس)، سپس با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب کوچکی که پس از سانتریفوژ حاصل شد را با ۵ میلی‌لیتر استون شست‌وشو داده، ورتکس و مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۱٪ و یک میلی‌لیتر اسیدتیوباربیتریک (۶٪ وزنی/حجمی) افزوده و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰°C قرار گرفت، سپس واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف شد. مقدار جذب محلول حاصل با طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد.

**آزمایشات مولکولی:** نمونه‌برداری تصادفی و تکراردار برای انجام مطالعات مولکولی و بررسی بیان ژن نیز در زمان حداکثر رشد رویشی صورت گرفت و صفات فنوتیپی شامل تعداد برگ، سطح برگ، تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی و وضعیت ظاهری ثبت شد. در مورد وضعیت ظاهری رتبه‌دهی بر حسب رتبه یک برای شاهد و رتبه سه به بدترین وضعیت در تیمار ۴ بار (مگاپاسکال) اختصاص داده شد و بارز است که رتبه دو نیز به‌ترتیب وضعیت نسبی حد واسط را نشان می‌دهند.

**استخراج DNA ژنومی، RNA و cDNA:** استخراج DNA ژنومی با روش CTAB تغییر شکل‌یافته<sup>[15]</sup> از برگ گیاهچه‌های ۱۶ روزه

گوجه‌فرنگی صورت گرفت. استخراج RNA کل، در زمان اولیه گلدهی که بیان ژن‌های مسیر گلدهی برای پروتئین مورد نظر گیاه، به آن وابسته هستند، از برگ گیاهان شاهد و تیمار با استفاده از کیت استخراج RNA گیاهان (کیاژن؛ آلمان) براساس پروتکل کیت، استخراج شد. برای بررسی حضور و ارزیابی خلوص و تعیین غلظت RNA، روش‌های اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۰/۸٪ مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA سنتتاز (سیگما؛ آلمان) انجام شد، که این مرحله، توسط پرایمر اولیگو dT و همچنین با استفاده از آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس صورت پذیرفت. در انجام واکنش PCR نیمه‌کمی، غلظت و کیفیت cDNA نمونه‌های حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس بسیار مهم است به همین دلیل آنها با اسپکتروفوتومتری تعیین شدند.

**طراحی آغازگرها:** از آنجایی که توالی ژن‌های مورد نظر در بیشتر گونه‌ها و ارقام گوجه‌فرنگی نامشخص بود و اولویت در ساخت آغازگرها، با گیاهان هم‌جنس یا هم‌خانواده است، آغازگرهای این آزمایش، براساس توالی‌های ژن موجود از سایر گونه‌های گوجه‌فرنگی و سایر گیاهان طراحی شدند. بر همین اساس، گیاهان هم‌جنس یا هم‌خانواده این دو رقم گوجه‌فرنگی شناسایی و از توالی ژن آن گیاهان و سایر خانواده‌ها استفاده شد. برای این منظور توالی ناحیه کدکننده ژن *AREB1* برای ساخت پروتئین شبیه *AREB* و ژن *MPK2* برای ساخت پروتئین‌کیناز *Formin-like* (protein 2) به‌عنوان ژن‌های مورد نظر در *Arabidopsis thaliana* (AB017160)، شماره دسترسی: *Solanum lycopersicum* اسکولنتوم (AY530758)، شماره دسترسی: *esculentum* (AY261513)، شماره دسترسی: *Solanum lycopersicum* اسکولنتوم (AEKE02013223)، شماره دسترسی: *Solanum lycopersicum* تیپ فروم (Ferum GSS)، شماره دسترسی: (HE805209) و *Solanum lycopersicum* تیپ هینز (HE805171.1) از بانک ژن NCBI شناسایی شدند. این آغازگرها با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای پرایمر 3 و الیگو dT طراحی و سپس برای هم‌آرایی نمودن توالی‌های مشابه ثبت‌شده در بانک جهانی ژن NCBI به‌وسیله نرم‌افزارهای بلاست و GeneRunner 6.5.51 بررسی شدند.

محل آغازگرها تا حد امکان نزدیک به انتهای ۳' انتخاب شدند. طراحی آغازگرها به‌نحوی انجام شد، که حداقل یکی از دو آغازگر رفت یا برگشت در نواحی اگزون پیشین-اگزون پسین قرار گیرد تا از تکثیر غیراختصاصی ناشی از آلودگی‌های ژنومی جلوگیری شود. بازده تکثیر آغازگرها با استفاده از منحنی‌های استاندارد و رگرسیونی خطی منحنی تکثیر نرم‌افزار LinRegPCR 7.0 بررسی شدند<sup>[16]</sup>. جفت آغازگرهای مناسب ژن‌های مورد نظر طراحی و سپس توسط شرکت آلمانی ترموفیشر ساخته شدند (جدول‌های ۱ و ۲).

جدول ۱) آغازگرهای طراحی‌شده برای cDNA در ژن‌های *AREB1* و *MPK2*

| ویژگی‌های پرایمرها | ژن <i>MPK2</i>       | ژن <i>AREB1</i>      |
|--------------------|----------------------|----------------------|
| آغازگرهای رفت      | ACTTACTGTTGAAGACGCGC | AAGGCGCTTCTCTAATGGGT |
| آغازگرهای برگشت    | CACATGTGCTGGTATTCGGG | GCCTCCTTCAACGACCTTC  |
| سایز (جفت‌باز)     | 1485                 | 1344                 |
| برنامه PCR         | ۳۶-۶۰°C              | ۳۶-۵۹°C              |

| ژن           | آغازگر رفت           | آغازگر برگشت         | سایز (جفت باز) | برنامه PCR |
|--------------|----------------------|----------------------|----------------|------------|
| <b>MPK2</b>  |                      |                      |                |            |
| پرایمر ۱     | GTTGAAGACGCGCTTGCTCA | CATTTCTGGAAGTAAAAATA | ۳۹۱            | ۳۶-۶۰°C    |
| پرایمر ۲     | CAGTATTTCTTGTATCAGAT | CTCCATAAGCAGACGTAGCT | ۳۳۶            | ۳۶-۶۲°C    |
| پرایمر ۳     | CACACACAAACAGAAAAAGC | CAAACAATACCATAAGCTCC | ۳۱۳            | ۳۶-۵۹°C    |
| پرایمر ۴     | TTGCAGTTGATTGGCACCC  | TCACCAGTAAGTCTCTTCT  | ۱۹۱            | ۳۶-۶۰°C    |
| پرایمر ۵     | ATTGTTGCGATTAGAGATAT | CTGGCAATGTTCTTCTGATA | ۱۳۸            | ۳۶-۵۶°C    |
| پرایمر ۶     | GTTCTGCTTTGAATTCGGAG | ATTTTCATGATCCATATGTC | ۱۳۱            | ۳۶-۶۰°C    |
| <b>AREB1</b> |                      |                      |                |            |
| پرایمر ۱     | GTGTAAGATTCGAGCTATTA | GACTGAGGAGTTTGTAGTAA | ۱۱۶۸           | ۳۶-۵۹°C    |
| پرایمر ۲     | GCTAATACCACTAATTTCTT | TGTATTGCATCTTTGTGACA | ۷۸             | ۳۶-۶۰°C    |
| پرایمر ۳     | ATGTGATTGAATAAAAGGTC | TCATCTTTTAAATTTCTCT  | ۷۶             | ۳۶-۶۲°C    |
| پرایمر ۴     | AAAGAGGAACCAGAACTTTA | TAAGTAGATTACACTGCGTG | ۳۸             | ۳۶-۶۰°C    |

**مطالعه انطباق و بررسی توالی پروتئینی ژن *PIC2*:** توالی‌های به‌دست‌آمده از شرکت تکاپوزیست (ماکروژن) پس از مقایسه با بانک ژنی NCBI، بررسی شدند و ترجمه هر یک از توالی‌های نوکلئوتیدی کدکننده پروتئین به‌وسیله پایگاه داده مولکولی پروتئین (www.expasy.ch) انجام شد [18]. مطالعات ردیف‌سازی چندتایی با استفاده از بلاست موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI و CLUSTAL W موجود در پایگاه اطلاعاتی

http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/Expa  
ssy صورت پذیرفت [19].

مطالعات توالی پروتئینی ژن‌های *AREB1* و *MPK2*، رقم و گونه گوجه‌فرنگی ردکلود و پروتئین‌های مشابه با استفاده از پایگاه GeneBee (www.genebee.msu.su) به اجرا درآمد [20, 21]. محاسبه تئوری نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین با استفاده از ابزارهای موجود در پایگاه داده Expasy http://www.expasy.ch/tools/pi\_tool.html انجام شد. موتیف‌ها و اسیدآمین‌های موجود روی ساختار پروتئینی LeAREB و کیناز مورد بررسی قرار گرفتند (www.expasy.ch/motif scan). با استفاده از روش کولاسکار و تانگاکار و براساس نتایج تجربی، اپی‌توپ‌های موجود این پروتئین‌ها نیز شناخته شد [22-24]. به دنبال ساختارهای پروتئینی، مدل‌سازی پروتئین LeAREB و کیناز نیز انجام شد. مدل سه‌بعدی پروتئین ژن *AREB* و *MPK2* رقم ردکلود گوجه‌فرنگی، ابتدا با استفاده از پایگاه M4T (http://manaslu.aecom.yu.edu/M4T) و به روش مدل‌سازی براساس تشابه به دست آمد [25, 26]. به‌منظور پیدا کردن مدل مناسب، در این مرحله توالی پروتئینی این ژن‌ها با توالی ساختارهای شناخته‌شده، بلاست شد. آزمون آماری آنالیز واریانس و نرم‌افزار SPSS 15 به کار رفتند.

## یافته‌ها

در مورد کلیه صفات مورفولوژیکی در رقم ردکلود گوجه‌فرنگی، تفاوت معنی‌داری بین شاهد (آبیاری کامل) و تیمارهای ۲- و ۴-مگاپاسکال مشاهده نشد، در حالی که در رقم پتوپراید گوجه‌فرنگی، تفاوت‌ها بارز و تغییرات محسوس و معنی‌دار صفات مورفولوژیک بین تیمار شاهد و تیمار ۲-مگاپاسکال کاملاً مشهود بود، این تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای ۲- و ۴-مگاپاسکال نیز به شکل بارزتری آشکار شد، به‌گونه‌ای که در فنوتیپ ظاهری این تغییرات قابل مشاهده بود. در تمامی صفات به غیر از صفت ارتفاع بوته، اختلاف آماری بین این دو تیمار وجود داشت. گیاهان رقم

**مطالعات بیان ژن:** برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی (RealTime-PCR) از کیت RT-PCR یک‌مرحله‌ای (بیونیر؛ کره جنوبی) طبق روش ذکرشده در پروتکل دستگاه ریل‌تایم ترموسایکلر مدل PTC (بیور؛ ایالات متحده) استفاده شد. میزان مواد به‌کاررفته در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای ژن‌های *AREB*، *MPK2* و کنترل شاهد یکسان بودند و تنها آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر این دو ژن از هم متمایز بودند. برای انجام RT-PCR، از RNA استخراج‌شده از همه گیاهان شاهد و تیمار تحت تنش خشکی به مقدار مساوی (۶۰۰ نانوگرم) برداشته شد و برای هر نمونه (شاهد و تیمارها) به‌دلیل مطالعه دو ژن، دو تیوب برای هر ژن در نظر گرفته شد که در دو تیوب آغازگرهای ژن *AREB* و آغازگرهای ژن *MPK2* اضافه و دو تیوب دیگر، به‌عنوان کنترل داخلی برای هر یک از ژن‌ها، در نظر گرفته شدند. لوله‌های لیوفیلیزه موجود در کیت تمامی مواد لازم برای سنتز cDNA و انجام PCR را داشتند.

برنامه PCR به صورت زیر بود:

PCR توسط ترموسایکلر با برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR به‌صورت دمای اولیه ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل به‌صورت ۹۴، ۵۴ تا ۶۵ و ۷۲°C هر کدام به‌مدت یک دقیقه و دمای نهایی ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. درجه حرارتی اتصال آغازگرها طبق فرمول مازارس (۶۵۰/L) × (%GC) + ۰.۴۱ = ۶۹.۳ محاسبه شد. پس از انجام PCR کیفیت محصول روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. کارایی PCR برای این دو ژن براساس فرمول (1-(1/Slope) = کارایی محاسبه شد. ارزیابی کمی میزان بیان ژن با استفاده از روش مقایسه چرخه آستانه انجام شد. تغییرات نسبی بیان ژن‌های فوق نسبت به یکدیگر نرمالایزه شد. میزان بیان ژن‌های مورد نظر قبل از ایجاد تنش (محیط شاهد) به‌عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد. مقادیر چرخه آستانه، محاسبه و تغییرات بیان ژن مطابق روش لئوک و شمیپنگن اندازه‌گیری شد [17].

در بررسی بیان هر ژن، در هر نمونه، مقدار ۵ میکرولیتر محصول واکنش PCR، روی ژل ۱٪ آگارز، الکتروفورز و سپس به‌وسیله نرم‌افزار ImageJ 1.42q (www.rsby.info.nih.gov/ij/index.html) شدت باند موجود روی ژل آنالیز شد (درجه‌بندی شدت باند بین صفر تا ۱۰۰ بود). این نرم‌افزار قادر است شدت نسبی باند موجود روی ژل را اندازه‌گیری کند و به‌صورت عدد نمایش دهد. در نهایت آنالیز آماری داده‌های حاصل و رسم نمودارها با نرم‌افزارهای SPSS 15 و Excel 2016 انجام شد.



جداسازی و بررسی ژن‌های *AREB* و *MPK2* به منظور بررسی مقاومت به خشکی گیاه گوجه‌فرنگی ۵۸۵

**بررسی پروتئین‌های رونوشت‌شده:** در هر دو رقم مقاوم و حساس گوجه‌فرنگی طول توالی‌های cDNA برای توالی ژن‌های *AREB1* و *MPK2* تقریباً مشابه بود. نتایج تعیین توالی پروتئین نشان‌دهنده خوانش ۱۳۴۱ و ۱۱۸۲ نوکلئوتید مربوط به ژن‌های *AREB1* و *MPK2* بود (شکل‌های ۵ و ۶)

پروتئین LeAREB شامل ۴۴۷ اسیدآمینو بود، نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی این پروتئین به ترتیب ۹/۴۲ و ۴۷۹۷۷/۷۳ کیلودالتون محاسبه شد و از طرفی پروتئین‌کیناز نیز ۳۹۴ اسیدآمینو داشت که نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی این پروتئین نیز به ترتیب ۵/۵۳ و ۴۵۲۳۲/۹۲ کیلودالتون محاسبه شدند (شکل ۷).

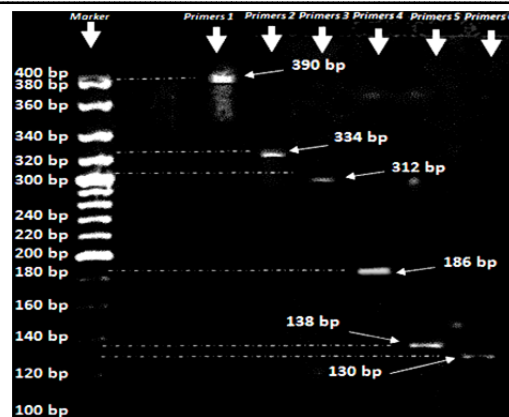
با در نظر گرفتن شرایط طبیعی، شبیه‌سازی‌ها، نشان داد که این دو پروتئین در مخلوط آب، تجمع کرده و ماتریکسی را شکل دادند که آب را دور کرد (جدول ۳).

پروتئین LeAREB بیشتر شامل ساختارهای مارپیچ آلفا (حدوداً ۹ ساختار) و ساختار رندوم کوئل بود. تعداد بسیار اندکی از ساختار صفحات بتا نیز در آن مشاهده شد. از طرفی پروتئین‌کیناز چهارده ساختار مارپیچ آلفا، پانزده ساختار از صفحات بتا و تقریباً، شش ساختار رندوم کوئل داشت (شکل ۸).

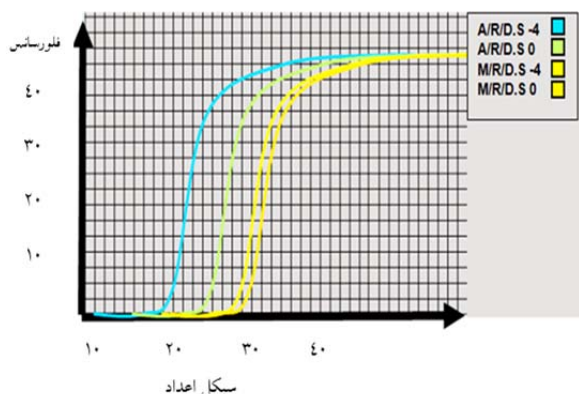
هم‌آرایی توالی اسیدآمینوهای تشکیل‌دهنده پروتئین LeAREB با توالی اسیدآمینوهای دیگر پروتئین‌ها نشان داد که تنها قسمت‌هایی از این پروتئین با دیگر پروتئین‌ها تشابه دارد، ولی مدل ساختار مولکولی پروتئین‌کیناز بیان شده از ژن *MPK2*، تشابه ۹۳٪ با پروتئین MAPK6 داشت.

**جدول ۳** واحدهای آمینواسیدی تشکیل‌دهنده پروتئین بیان شده از ژن *PIC2*

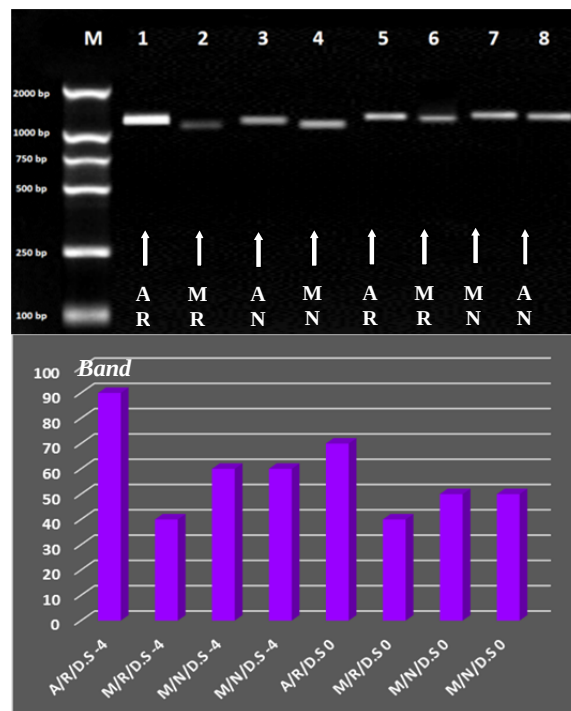
| ترکیب آمینواسید                                             |                |                                 |     |       |
|-------------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------|-----|-------|
| آمینواسید                                                   | پروتئین LeAREB | پروتئین‌کیناز فعال شده با میتوز | ٪/۶ | ٪/۸   |
| آلانی (A)                                                   | ۲۷             | ۶٪/۰                            | ۳۰  | ۷٪/۶  |
| آرژنین (A)                                                  | ۲۵             | ۵٪/۶                            | ۲۳  | ۵٪/۸  |
| آسپاراژین (N)                                               | ۳۴             | ۷٪/۶                            | ۱۹  | ۴٪/۸  |
| آسپارات (D)                                                 | ۱۲             | ۲٪/۷                            | ۲۴  | ۶٪/۱  |
| سیستئین (C)                                                 | ۱              | ۰٪/۲                            | ۶   | ۱٪/۵  |
| گلوتامین (Q)                                                | ۳۷             | ۸٪/۳                            | ۱۵  | ۳٪/۸  |
| گلوتامیک اسید (E)                                           | ۲۷             | ۶٪/۰                            | ۲۹  | ۷٪/۴  |
| گلیسین (G)                                                  | ۶۲             | ۱۳٪/۹                           | ۱۶  | ۴٪/۱  |
| هیستیدین (H)                                                | ۵              | ۱٪/۱                            | ۱۵  | ۳٪/۸  |
| ایزولوسین (I)                                               | ۱۵             | ۳٪/۴                            | ۲۸  | ۷٪/۱  |
| لوسین (L)                                                   | ۳۲             | ۷٪/۲                            | ۴۰  | ۱۰٪/۲ |
| لیزین (K)                                                   | ۲۲             | ۴٪/۹                            | ۱۶  | ۴٪/۱  |
| متیونین (M)                                                 | ۱۷             | ۳٪/۸                            | ۱۷  | ۴٪/۳  |
| فنیل آلانین (F)                                             | ۱۳             | ۲٪/۹                            | ۱۸  | ۴٪/۶  |
| پرولین (P)                                                  | ۲۹             | ۶٪/۵                            | ۲۶  | ۶٪/۶  |
| سری (S)                                                     | ۳۴             | ۷٪/۶                            | ۱۸  | ۴٪/۶  |
| ترئونین (T)                                                 | ۱۹             | ۴٪/۳                            | ۱۸  | ۴٪/۶  |
| تریپتوفان (W)                                               | ۳              | ۰٪/۷                            | ۲   | ۰٪/۵  |
| تیروزین (Y)                                                 | ۸              | ۱٪/۸                            | ۱۶  | ۴٪/۱  |
| والین (V)                                                   | ۲۵             | ۵٪/۶                            | ۱۸  | ۴٪/۶  |
| پیرولیزین (O)                                               | ۰              | ۰                               | ۰   | ۰     |
| سلنوسیتئین (U)                                              | ۰              | ۰                               | ۰   | ۰     |
| باقی‌مانده منفی                                             |                |                                 |     |       |
| (آسپاراژین+گلوتامیک اسید) ۳۹: (آسپاراژین+گلوتامیک اسید) ۵۳: |                |                                 |     |       |
| باقی‌مانده مثبت                                             |                |                                 |     |       |
| ۴۷: (آرژنین+لیزین) ۳۹: (آرژنین+لیزین)                       |                |                                 |     |       |



**شکل ۳** ژل الکتروفورز محصول PCR از شش جفت آغازگر متفاوت به منظور شناسایی طول قطعات تکثیرشده از ژن *MPK2*



**نمودار ۱** نتایج PCR در زمان واقعی استفاده شده برای ژن‌های *AREB1* و *MPK2* در تیمارهای تحت تنش ۴-بار و تیمار شاهد در گیاه ردکلود: A: ژن *AREB1*; M: ژن *MPK2*; R: مقاوم، D.S: شرایط تنش خشکی



**شکل ۴** بررسی بیان ژن‌های *AREB1* و *MPK2* در ارقام ردکلود و پتوپراید گوجه‌فرنگی در شرایط تیمار شاهد (بدون اعمال خشکی) و تیمار ۴-بار (شرایط تنش خشکی): A: ژن *AREB1*; M: ژن *MPK2*; R: مقاوم، N: غیرمقاوم، D.S: شرایط تنش خشکی

**شکل ۵)** توالی نوکلئوتید و آمینواسید استنباطی از ژن *AREB1* در گیاه گوجه‌فرنگی

شکل ۶) توالی نوکلئوتید و آمینواسید استنباطی از ژن *MPK2* در گیاه گوجه‌فرنگی

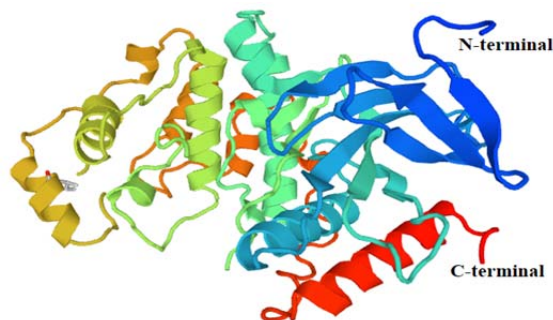
(الف)



زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

MDGSAPQTDITVMSDAAAGQQPAMFPLPMAGMENIPATLSHGGRFIQYNIFGNIFEVTAKYKPPIMPIGKGAYGIV 75  
M/G ENIPATLSHGGRFIQYNIFGNIFEVTAKYKPPIMPIGKGAYGIV 52  
CSALNSETNEHVAIKKIANAFDNKIDAKRTLREIKLLRMDHENIVAIRDIIFFPQREAFNDVYIAYELMDTDLH 150  
CSALNSETNEHVAIKKIANAFDNKIDAKRTLREIKLLRMDHENIVAIRDIIFFPQREAFNDVYIAYELMDTDLH 127  
QIIRSNQGLSEEHCQYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLLNANCDLKICDFGLARVTSETDFMTEYVVTR 225  
QIIRSNQGLSEEHCQYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLLNANCDLKICDFGLARVTSETDFMTEYVVTR 202  
WYRPFELLLNSSDYTAIDVWSVGCIFMELMDRKPLFPGRDHVHQLRLLMELIGTPSEAEEMFLNENAKRYIRQL 300  
WYRPFELLLNSSDYTAIDVWSVGCIFMELMDRKPLFPGRDHVHQLRLLMELIGTPSEAEEMFLNENAKRYIRQL 277  
PLYRRQSFVEKFPVNPAAIDLVEKMLTFDPERRRLTVEDALAHFYLTSLHDISDEPVCMTFFSFDFEQHALTEEQ 375  
PLYRRQSFVEKFPVNPAAIDLVEKMLTFDPERRRLTVEDALAHFYLTSLHDISDEPVCMTFFSFDFEQHALTEEQ 352  
MKELIYREGLAFFNPEYQHM 394  
MKELIYREGLAFFNPEYQ 370

(الف)



(ب)

شکل ۸ (الف) هم‌آرایی توالی اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده قسمتی از پروتئین بیان‌شده ژن MPK2 با توالی ساختاری این پروتئین، (ب) شکل فضایی و ساختار سه‌بعدی قسمتی از پروتئین بیان‌شده ژن MPK2

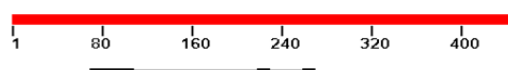
جدول ۴) همپوشانی مناطق پروتئینی

| سه منطقه همپوشانی یافته    | کد توالی مورد جستجو: ۲۱۰۰۲۷ |
|----------------------------|-----------------------------|
| منطقه اول: مکان ۴ تا ۴۰    |                             |
| فاصله                      | ۲/۳۹ (۵٪)                   |
| جانشینی حفظ‌شده            | ۱۸/۳۹ (۴۶٪)                 |
| یکسانی                     | ۱۲/۳۹ (۳۱٪)                 |
| منطقه دوم: مکان ۱۹ تا ۲۹   |                             |
| فاصله                      | ۱/۱۲ (۸٪)                   |
| جانشینی حفظ‌شده            | ۹/۱۲ (۷۵٪)                  |
| یکسانی                     | ۷/۱۲ (۵۸٪)                  |
| منطقه سوم: مکان ۱۸۸ تا ۱۹۹ |                             |
| فاصله                      | ۰/۱۲ (۰٪)                   |
| جانشینی حفظ‌شده            | ۸/۱۲ (۶۶٪)                  |
| یکسانی                     | ۵/۱۲ (۴۲٪)                  |

تعداد اسیدآمینه پروتئین: ۳۹۴

وجه مشترک بین این دو پروتئین: درصد تشابه بین توالی‌های پروتئینی LeAREB و کیناز در گوجه‌فرنگی رقم مقاوم ۳۱٪ به دست آمد. از هم‌ردیفی انجام‌شده، بیشترین حفظ‌شدگی، مربوط به مناطق ابتدایی و انتهایی این پروتئین‌ها (که با رنگ مشکی تمایز یافته‌اند) و کمترین حفظ‌شدگی در این پروتئین‌ها در مناطق مربوط به دومین‌ها بود (شکل ۹).

بعضی از مناطق اسیدآمینه‌ای این پروتئین، شباهت ناچیزی با دیگر عوامل رونویسی، ژن‌های مقاومت به تنش‌های خشکی را داشتند. از مقایسه مناطق توالی پروتئین LeAREB با ناحیه AP2 که عامل رونویسی ژن DREB نیز است، ۲۴٪ هم‌آرایی به دست آمد (شکل‌های ۹ و ۱۰؛ جدول ۴).



شکل ۹) هم‌ترازی توالی اسیدآمینه‌های دو پروتئین AREB و MPK2

|                 |                                          |     |
|-----------------|------------------------------------------|-----|
| ۱ پروتئین : 71  | NAEENQTIGGPGINGQEVGVPGHQLRQGSLLTPRTLSH   | 109 |
| منطقه اول       | +A + T+   GQ + P L G + P TLSH            |     |
| ۲ پروتئین : 4   | SAPQTDITVMSDAAAGQQPAMFP--LPMAGMENIPATLSH | 40  |
| ۱ پروتئین : 259 | KQPALPYGAPMA                             | 270 |
| منطقه دوم       | +QPA+P  PMA                              |     |
| ۲ پروتئین : 19  | QQPAMP-PLPMA                             | 29  |
| ۱ پروتئین : 219 | IQSANLPLNVNG                             | 230 |
| منطقه سوم       | ++ NL LN                                 |     |
| ۲ پروتئین : 188 | LKPSNLLLNANC                             | 199 |

شکل ۱۰) تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی از مقایسه توالی اسیدآمینه‌های حاصل از ترجمه توالی ژن AREB و MPK2 به منظور تظاهر پروتئین‌های LeAREB و کیناز در رقم گوجه‌فرنگی مقاوم؛ پروتئین ۱: LeAREB، پروتئین ۲: کیناز

بحث  
پژوهش حاضر با هدف جداسازی و بررسی ژن‌های AREB و MPK2 به منظور مطالعه مقاومت به خشکی گوجه‌فرنگی انجام شد.

وضعیت ظاهری گیاه و میزان تغییرات آن با انجام رتبه‌دهی در اوایل گلدهی صورت پذیرفت. صفات مورد ارزیابی شامل عملکرد بذر، ارتفاع بوته، وزن هزار دانه (که در مرحله انتهایی رشد اندازه‌گیری شد)، سطح اکسیداسیون سلولی و روند بیان ژن‌های AREB 1 و MPK2 بودند.

بذور گوجه‌فرنگی در پاسخ به سطوح مختلف تنش خشکی، پاسخ‌های رشدی متفاوتی نشان داد، سطح ۲-مگاپاسکال آستانه تحمل این گیاه بود و در سطح ۴-مگاپاسکال کاهش رشد آن به لحاظ صفات عملکرد بذر، ارتفاع بوته، وزن هزار دانه، سطح اکسیداسیون سلولی و روند بیان ژن‌های AREB 1 و MPK2، در

مقایسه با شاهد مشاهده شد. به طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ژن های *AREB1* و *MPK2* می توانند نقش مهمی در ایجاد مقاومت به تنش خشکی را ایجاد کنند.

از دیدگاه مولکولی اغلب تنش های محیطی از جنبه افزایش فرآیندهای اکسیداتیو مشترک هستند. از این نظر تنش خشکی نیز استثنا نیست. اساساً تنش خشکی ایجاد شده در گیاه در وضعیت ۲- و ۴-مگاپاسکال، میزان رادیکال های فعال اکسیژن را افزایش می دهد و چنانچه واکنش های آنزیمی و غیر آنزیمی، نتوانند، سطح مناسب این رادیکال ها را تعدیل کنند، تنش اکسیداتیو رخ می دهد. در پی آن خساراتی مانند آسیب غشای سلولی، افزایش بیش از حد اکسیداسیون چربی ها حاصل می شود. با تشدید این امر مولکول های حیاتی مانند پروتئین ها و DNA نیز در معرض خطر قرار گرفته و نهایتاً پیری سلولی و پس از آن نکروز و مرگ سلول رخ می دهد. در این راستا، ارزیابی ساده و سریع میزان تنش اکسیداتیو حایز اهمیت است. اندازه گیری میزان TBARM به عنوان شاخصی از میزان اکسیداسیون سلولی و پراکسیداسیون چربی ها کارایی قابل قبولی دارد [11].

شواهد حاکی از آن هستند که افزایش بیان این ژن ها، در پاسخ به تنش اسمزی حاصل از تنش خشکی که با افزایش دما ایجاد شده، است. البته در پژوهش حاضر میزان بیان ژن *AREB1* در مقایسه با میزان بیان ژن *MPK2* در رقم ردکلود بیشتر بود و بیشترین تعداد رونوشت های ژن *AREB1* در تیمار رقم ردکلود در شرایط خشکی تجمع و افزایش یافت. در رقم ردکلود که از ارقام مقاوم گوجه فرنگی بود، محصولات این ژن به عنوان پروتئین های مقاوم در برابر تنش خشکی و پاسخ دهنده ای برای تنش های خشکی هستند. این نتایج به دو دلیل می تواند ارزشمند باشد، اول این که کارایی مناسب راه انداز S35 برای بیان ژن در گیاهان دولپه را نشان می دهد و دوم اینکه بیان بسیار بالای ژن *AREB1* می تواند، موجب افزایش بیان ژن های پایین دست شده و تحمل به تنش های مختلف محیطی را بهبود می بخشد.

فاکتورهای پاسخ به تنش خشکی، از مهم ترین عوامل رونویسی گیاهی هستند که در تنظیم بیان ژن های مربوط به رشدونمو و مقاومت به تنش ها دخالت دارند و می توان به جای انتقال یک ژن عملکردی از فاکتورهای رونویسی برای افزایش و کاهش بیان تعدادی از ژن های عملکردی به منظور اصلاح گیاهان استفاده کرد [27]. بیان این دسته از فاکتورهای رونویسی هنگام آسیب دیدگی گیاه، حمله پاتوژن، در پاسخ به حضور هورمون گیاهی آبسزیک اسید و تنش های محیطی القا می شود [28]. به همین منظور در پژوهش حاضر ژن های *AREB1* و *MPK2* که فاکتورهای رونویسی هستند، جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. استخراج mRNA و سنتز cDNA انجام شد. پس از استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن های *AREB1* و *MPK2* تنها در رقم ردکلود تحت تاثیر تنش خشکی، قطعاتی از DNA ژنومی و cDNA به دست آمد.

برای اطمینان از استخراج و ساخت درست cDNA تعداد توالی و طول محصولات واکنش PCR و الکتروفورز cDNA با مجموع توالی های نوکلئوتیدی قطعات هگزونی استخراج شده از cDNA مورد نظر، مقایسه شدند، که این مقایسه برابری نسبی قطعات cDNA با مجموع قطعات هگزونی را اثبات نمود. برای ژن *AREB* تفاوت بین cDNA و مجموع قطعات اگزونی، ۱۲ جفت نوکلئوتید و برای ژن *MPK2* نیز تفاوت ۱۰ جفت نوکلئوتید بود احتمال می رود

طراحی پرایمرها در ترسیم قطعات اگزونی یا تفاوت در تک نوکلئوتیدهای ارقام گوناگون گوجه فرنگی موجب این تفاوت شده باشند. همچنین اطمینان بر این است که cDNA هر یک از ژن ها توالی متفاوتی از DNA ژنومی آن ژن ها داشت و دلیل آن کاسته شدن مناطق اینترون و باقی ماندن مناطق هگزونی است. در مطالعه توالی DNA ژنومی و cDNA ژن *AREB1*، پس از بلاست کردن این توالی از روی بانک جهانی NCBI مشخص شد که این ژن در رقم ردکلود گوجه فرنگی چهار اگزون و سه ناحیه اینترون داشت. منطقه حاوی ژن *MPK2* دارای شش اگزون و ۵ اینترون بود، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک نیز صحت و حضور این مناطق را تایید نمود.

توالی ژن *AREB1* و *MPK2* گوجه فرنگی که در این پژوهش از دو منبع ژنومی و cDNA در این رقم گوجه فرنگی به دست آمد، در واقع قسمتی از ژنوم کامل است که براساس بانک جهانی ژن طولی معادل با ۷۲۹۳۱ جفت باز برای ژن *AREB1* و طولی معادل با ۸۱۱۲۹ جفت باز برای ژن *MPK2* دارد.

برای توالی های ژنومی ژن *AREB* چهار جفت آغازگر طراحی شدند. در نهایت بعد از PCR و الکتروفورز، رقم مقاوم در ژل پلی اکریلامید مورد آزمایش قرار گرفتند و چهار باند با مکان های متفاوت ایجاد کردند. برای توالی های ژنومی ژن *MPK2* نیز شش جفت آغازگر طراحی شدند که در نهایت بعد از PCR و الکتروفورز، رقم ردکلود در ژل پلی اکریلامید مورد آزمایش و چهار باند با مکان های متفاوت ایجاد کردند.

تیمارهای شاهد و تیمارهای تحت تنش، ۴-مگاپاسکال صرفاً در مبحث پژوهش مولکولی پژوهش حاضر، مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام RT-PCR و ساخت cDNA، واکنش PCR برای تکثیر ژن های *AREB1* و *MPK2* با پرایمرهای اختصاصی انجام شد و نتیجه واکنش PCR روی ژل الکتروفورز هم برای رقم حساس و هم برای رقم مقاوم در دو حالت بدون القا، تنش خشکی (شاهد) و در صورت القا، تنش خشکی تنها به میزان ۴-مگاپاسکال بررسی شد.

در پژوهش حاضر میزان بیان ژن مقاوم به تنش خشکی *AREB1* با افزایش شدت تنش خشکی روند افزایشی را نشان داد. در حالی که در بیان ژن *MPK2* تفاوت خیلی بارزی مشاهده نشد.

مهم ترین خصوصیت ژن های مرجع، تغییر در تعداد رونوشت آن ها تحت شرایط آزمایش مورد نظر در ارقام متفاوت گوجه فرنگی بود. روش PCR در زمان واقعی که روش دقیق دیگری، برای تعیین مقدار بیان الگوی اولیه است [29]، نیز نتایج حاصل از پژوهش حاضر را تایید کرد، که نشان دهنده میزان بیان بالای ژن *AREB1* نسبت به ژن *MPK2* در گیاهان تحت تنش خشکی ۴-مگاپاسکال، در مقایسه با گیاه شاهد بود. در گیاهان تحت تاثیر تنش خشکی، افزایش بیان ژن *AREB1* نسبت به ژن *MPK2*، بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ برابر مشاهده شد. لازم به ذکر است که آزمایش PCR در زمان واقعی فقط روی گیاهان گونه ردکلود گوجه فرنگی صورت پذیرفت.

افزایش رادیکال های اکسیژن طی تنش خشکی القاشده، گاهی محرکی برای آغاز رونویسی توسط عوامل رونویسی است. تصور می شود که رادیکال های مشتق شده از اکسیژن می توانند نقش اساسی در رشدونمو گیاه داشته باشد [30]. تفاوت در الگوی بیان ژن ها در واریته های درون یک گونه ممکن است منشا ایجاد واریته های مقاوم و حساس به تنش خشکی باشد [31].

در هر دو رقم مقاوم و حساس گوجه فرنگی طول توالی های cDNA برای توالی ژن های *AREB1* و *MPK2* تقریباً مشابه بود. برای

از آنجا که میزان تظاهر هر دوی این پروتئین‌ها طی تنش خشکی به میزان معنی‌داری افزایش می‌یابد و هر دوی آنها از عوامل و فاکتورهای رونویسی هستند. به همین منظور ساختار و توالی‌های حاصل از اسیدآمینه‌های به‌دست‌آمده از ژن‌های *AREB1* و *MPK2* برای ساخت پروتئین‌های مربوطه، در رقم مقاوم با یکدیگر مقایسه شدند؛ که این هم‌ترازی برای نمایش رابطه میان اسیدآمینه‌ها و شناخت موتیف‌های موجود روی ساختار پروتئین‌های LeAREB (AREB-like protein) و کیناز (mitogen-activated protein kinase 2) صورت پذیرفت. درصد تشابه بین توالی‌های پروتئینی LeAREB و کیناز در گوجه‌فرنگی رقم مقاوم ۳۱٪ نشان داده شد. اسیدآمینه‌های یکسان، نشان‌دهنده وظیفه ساختاری یا کارکردی مشابه را دارند و عدم انطباق دو توالی را، می‌توان حاصل جهش‌های نقطه‌ای و حذفی یا کراسینگ‌اورهای تداخلی تفسیر نمود. احتمالاً این دو پروتئین همولوگ بوده و از نظر تکاملی نیز بهم مرتبط هستند، چنانچه از یک ژن اجدادی مشترک تکامل یافته‌اند. مناطق مشترک در توالی اسیدآمینه‌ای این دو پروتئین، احتمال حضور این مناطق را در ژن‌های دیگر برای ایجاد مقاومت به تنش‌ها را اثبات می‌نماید. پروتئین LeAREB، در صورت بیان‌شدن به هر میزان، مقاومت به تنش را ایجاد می‌نماید. بعضی از مناطق اسیدآمینه‌ای این پروتئین، شباهت ناچیزی با دیگر عوامل رونویسی، ژن‌های مقاومت به تنش‌های خشکی را دارد. در این پژوهش به‌طور جالب توجه، از مقایسه مناطق توالی پروتئین LeAREB با ناحیه AP2 که عامل رونویسی ژن *DREB* نیز است، ۲۴٪ هم‌آرایی به دست آمد. اخیراً مطالعات نشان داده‌اند که اغلب پروتئین‌های ایجاد مقاومت در برابر خشکی موجود در گیاهان، موتیف‌های مشابهی دارند و با وجود شباهت ساختاری در اعضای این خانواده از پروتئین‌ها، الزاماً بیان یکسانی را ندارند و در نتیجه تاکنون نقش این پروتئین‌ها در گیاهان مشخص نشده است<sup>[32]</sup>.

طبق مطالعات بیان افزایش‌یافته ژن *AREB1* تحت راه‌اندازهای مختلف منجر به تجمع محصولات ژن‌های پایین‌دست القاپذیر به‌وسیله تنش و بهبود تحمل به انواع تنش‌های محیطی غیرزیستی شده است. طبق نتایج پژوهش حاضر با اعمال تنش‌های طولانی‌مدت بیان برخی از عوامل رونویسی افزایش می‌یابد و در خلال دوره تنش همچنان بالا باقی می‌ماند، از طرفی معلوم شده که فعال‌سازی پروتئین‌های *AREB1* و *AREB2*، به تغییری با وابسته *ABA* نیازمند است که احتمالاً فسفوریلاسیون وابسته به *ABA* است<sup>[10]</sup>. این عمل، سرعت رونویسی را کاهش و تحمل گیاهان تراریخته را به تنش‌ها افزایش می‌دهد<sup>[33]</sup> زیرا پروتئین‌های LeAREB جزء مهمی از پیام‌رسانی گلوکز است و بیان بیشتر آن بر تحمل به تنش چندگانه شامل خشکی، شوری و گرما موثر است<sup>[34]</sup> پاسخ مولکولی دو سیستم بیان ژن و انتقال پیام و اثر متقابل میان آنها، در مواجهه با تنش‌های محیطی مختلف پیچیده است. سیستم *AREB* پس از تجمع *ABA* داخلی در شرایط خشکی عمل می‌کند. ساخت *ABA* توسط خشکی تحریک می‌شود و دو سیستم بیان ژن وابسته به *ABA* تنظیمی را فعال می‌کند که یکی سیستم *bZIP/ABRE* و دیگری سیستم *MYC/MYB* است<sup>[35]</sup>. الگوی بیان بعضی از ژن‌های مقاوم به تنش‌ها به این شکل است که در ارقام مقاوم دارای بیان بالایی تحت شرایط کنترل و تنش خشکی نسبت به ارقام حساس هستند و در اثر اعمال تنش، افزایش و کاهش معنی‌داری بیان آنها، در هر دو رقم متحمل و حساس مشاهده می‌شود. بنابراین این گروه

شناخت بهتر توالی این ژن‌ها، توالی اسیدآمینه پروتئین‌های بیان‌شده از این ژن‌ها و همچنین، ساختار اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده این پروتئین‌ها بررسی شدند. فرمول اتمی برای پروتئین LeAREB، C2061H3296N628O658S18 و برای پروتئین کیناز C2023H3147N545O587S23 است. خواص عملکردی و کاربرد پروتئین‌ها به میزان زیادی، از چگونگی ساختار سه‌بعدی آنها منشا می‌گیرد. در پژوهش حاضر، شکل فضایی بخشی از این پروتئین‌های LeAREB و کیناز با بلاست‌کردن توالی‌های مشابه و براساس مدل‌سازی همولوژیکی ترسیم شد. هر نوع تغییر در این ساختار می‌تواند موجب اختلال در عملکرد آن شود.

با توجه به فرم‌های سه‌بعدی ترسیم‌شده، از بخش‌های اصلی پروتئینی و نواحی ترسیم‌نشده از بخش‌های نامنظم پروتئینی مشخص شد که اصولاً پروتئین LeAREB بیشتر شامل ساختارهای مارپیچ آلفا و ساختار رندوم‌کوئل است. تعداد بسیار اندکی از ساختار صفحات بتا نیز در آن دیده شد. از طرفی پروتئین کیناز شامل چهارده ساختار مارپیچ آلفا، پانزده ساختار از صفحات بتا و تقریباً شش ساختار رندوم‌کوئل بود. ساختارهای ثانویه آلفا هلیکس و صفحات بتا در دسته ساختارهای دوم منظم پروتئین‌ها (دارای زوایا و انواع پیوندهای هیدروژنی ثابت و تکرارنشده) قرار می‌گیرند. پیچ‌های تصادفی به همراه بعضی از ساختارهای رندوم‌کوئل، جزء ساختارهای ثانویه نامنظم تکرارناپذیر و تصادفی پروتئینی طبقه‌بندی می‌شوند. اصل منظم‌شدن ساختار بعضی از قسمت‌های پروتئین LeAREB و پروتئین کیناز به‌دلیل حضور توالی آمینواسیدهای پرولین، تربیتوفان، فنیل آلانین، لوسین، ایزولوسین، والین، سیستئین و اسپارژین است.

وجود ناحیه دومین، اثبات نمود، که ژن *AREB1* از اعضای زیر خانواده مهم *DREB* است. عوامل دیگری از جمله آب‌دوستی، انعطاف‌پذیری، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک که به‌ترتیب بستگی به مجموع درصد آرژنین، گلوتامات، سرین، پرولین و مجموع درصد سیستئین، فنیل آلانین، تیروزین، تربیتوفان دارد، نیز در منظم‌شدن این ساختار نقش اساسی ایفا می‌نماید. البته لازم به ذکر است که حضور ساختار صفحات بتا در منظم‌تربودن پروتئین کیناز نسبت به پروتئین LeAREB کمک بیشتری کرده است.

در ساختار پروتئینی کیناز در ناحیه کربوکسیلی آن یک ناحیه فسفوریلاسیون و احتمالاً تعدادی نواحی توالی متمرکزکننده هسته‌ای یا سیگنال متمرکزکننده هسته‌ای (NLSS) پیش‌بینی می‌شود. پیش‌بینی این ژن دارای موتیف‌های TGACG، تکرارهای غنی از TC، HSE، ERE، LTR، موتیف CGTCA و جعبه CCAAT است. این موتیف‌ها سبب اختصاصی‌شدن زمان و مکان بیان ژن می‌شوند؛ و برای الگوهای بیانی خاص مانند پاسخ به تنش‌های خشکی در گیاهان ضروری هستند.

همچنین در بررسی ساختار سه‌بعدی این پروتئین با بلاست‌کردن توالی‌های مشابه و براساس مدل‌سازی همولوژیکی، شناخت بهتری از عملکرد پروتئین‌های LeAREB و کیناز مشخص شد. هم‌آرایی توالی اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده پروتئین LeAREB با توالی اسیدآمینه‌های دیگر پروتئین‌ها نشان داد که تنها قسمت‌هایی از این پروتئین با دیگر پروتئین‌ها تشابه دارد. ولی مدل ساختار مولکولی پروتئین کیناز بیان‌شده از ژن *MPK2*، تشابه ۹۳٪ با پروتئین MAPK6 را نشان داد. پروتئین‌های MAPKs فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه را، در ارتباط با سه پروتئین دیگر از خانواده کیناز، در اندام‌های گیاه کنترل می‌کند.

محیطی در سطح جهانی کمک کند. از نگاهی دیگر، پدیده خشک‌سالی و بحران کمبود آب مساله‌ای جدی است که شناسایی و انتقال ژن‌های مقاوم به خشکی در گیاهان، بیشترین سازگاری را به گیاه می‌بخشد؛ که این خود می‌تواند نقش عمده‌ای در راستای جبران کمبود آب را ایفا نماید.

دست‌آورد نهایی پژوهش حاضر، این بود که با توجه به کمبود آب به شکل روزافزون، و افزایش خشکی در مناطقی مشخص از ایران، شناسایی و حضور ژن‌های مقاوم به خشکی در برخی از گیاهان، افزایش بیان شدن این ژن‌ها در شرایط القا خشکی نسبت به شرایط نرمال و همچنین مطالعه ساختار سه‌بعدی، پروتئین‌های بیان‌شده از ژن‌های مورد نظر، و مقایسه این پروتئین‌ها، برای مشخص شدن سازوکار و عملکرد این پروتئین‌ها، همگی از الزامات مطالعه مقاومت به خشکی در گیاهان و ایجاد روند افزایشی در افزایش مقاومت، همچنین در پروژه‌های آتی، انتقال ژن‌های مذکور به دیگر گیاهان باعث انتقال صفت مذکور (مقاومت به خشکی) به دیگر گیاهان می‌شود.

از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به این مورد اشاره کرد که انتقال ژن‌های مقاوم به خشکی، مانند ژن *AREB* به‌طور همزمان القای چندین ژن القا‌شونده در تنش را تنظیم می‌کند و تنظیم بیان چندین ژن می‌تواند آثار متعدد داشته باشد.

توصیه می‌شود به‌منظور اصلاح گیاه از فاکتورهای پاسخ به تنش خشکی برای تنظیم بیان ژن‌های رشد‌نمو استفاده کرد، همچنین پیشنهاد می‌شود حضور ژن‌های *AREB* و *MPK* در دیگر گیاهان مورد بررسی و آزمون قرار گیرد، تا بتوان بر اهمیت این ژن‌ها بیشتر پی برد، و آنها را به دیگر گیاهان با شرایط مشابه انتقال داد. یادآور شویم، که صفت مقاومت به خشکی با توجه به محدودیت‌های منابع آب از مهم‌ترین صفت یک گیاه است.

### نتیجه‌گیری

با افزایش میزان تنش خشکی، اغلب صفات مورفولوژیک، افت قابل توجهی دارند اما شاخص اکسیداسیون سلولی با افزایش میزان تنش، افزایش چشم‌گیری نشان می‌دهد. ژن مقاوم به تنش خشکی *AREB1* تحت تاثیر تنش‌های زیستی خشکی بیشتر القا می‌شود، در حالی که بیان ژن *MPK2* تفاوت زیادی نشان نمی‌دهد.

**تشکر و قدردانی:** بدین وسیله از همکاری ارزشمند دانشگاه دولتی تربت‌حیدریه و تمامی عزیزانی که نویسندگان مقاله را در انجام پژوهش یاری نمودند، قدردانی می‌شود.

**تأییدیه اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** ایمان یوسفی‌جوان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روشن‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۸۰٪)؛ فائزه قراری (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

**منابع مالی:** پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه دولتی تربت‌حیدریه انجام شده است.

### منابع

1- Thomashow MF. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1999;50:571-99.

شامل ژن‌هایی هستند که به‌طور پیوسته هم در شرایط کنترل و هم در شرایط تنش در ارقام متحمل بیان می‌شوند ولی بیان آنها به یک میزان نیست. در پژوهش حاضر طراحی آغازگرها براساس ناحیه یا ژن‌های مقاومت به تنش خشکی در این دو گونه گوجه‌فرنگی صورت گرفت که همین پرایمرها می‌توانند حضور این ژن‌ها را در دیگر گونه‌های گونه‌های مقاوم گوجه‌فرنگی یا حتی در دیگر گونه‌های مقاوم به تنش خشکی که هر روزه توالی‌های بی‌شماری از آن در بانک‌های اطلاعاتی به ثبت می‌رسد، اثبات نمایند. نکته دیگر قابل توجه پس از هم ردیفی توالی‌های cDNA این دو ژن، به لحاظ پروتئینی نشان دادند که شباهت‌هایی نیز با یکدیگر دارند. طبق مطالعات مشخص شده است که هم در مسیر وابسته به آبسزیک‌اسید و هم در مسیرهای مستقل از آن، خانواده عوامل رونویسی AP2 از عوامل رونویسی شناخته‌شده‌ای بوده که نقش مهم و موثری را ایفا می‌نمایند. در بررسی عمل این ژن‌ها اگرچه فقط توالی‌هایی از عامل رونویسی AP2 را دارند، ولی نمی‌توان عوامل رونویسی این ژن‌ها را از خانواده AP2 دانست، به همین دلیل این ژن‌ها عوامل رونویسی متفاوتی از AP2 را دارند که می‌توان عملشان را، نقش القایی در فعال‌سازی راه‌اندازها دانست. با توجه به اندک شباهت این دو ژن با عوامل رونویسی AP2 و شباهت بیشتر بین توالی‌های این دو ژن فرض بر این است که انتقال جانبی ژن‌های سیانوباکت‌ها و ویروس‌ها از طریق پدیده همزیستی داخلی به گیاهان صورت گرفته و منشا تشکیل خانواده بزرگ عوامل رونویسی دارای ناحیه AP2 شده است. سپس در گیاهان از طریق پدیده‌های مختلفی مانند حذف یا اضافه‌شدن اینترون‌ها و اگزون‌ها، جابه‌جایی یا طرق دیگر اعضای مختلف و زیرخانواده‌های گوناگون این خانواده بزرگ به وجود آمده‌اند [36]. طی مهندسی ژنتیک عامل رونویسی ژن *AREB* مانند ژن *DREB* قادر است همزمان القای چندین ژن القا‌شونده در تنش را تحت تنظیم خود داشته باشد. در روش‌های معمول انتقال ژن، گیاهان تراریخت فراوانی معرفی شده‌اند، ولی به دلیل انتقال تنها یک ژن، بهبود نسبی مشاهده شده است، اما انتقال ژن‌های مقاوم به خشکی به دلیل اینکه تنظیم بیان چندین ژن را بر عهده دارد و می‌تواند آثار چندگانه داشته باشد [37, 38]. تاکنون مطالعات زیادی روی ژن *AREB* و *MPK* صورت گرفته، به‌عنوان مثال انتقال ژن *AREB* از گوجه‌فرنگی به توتون یا برنج، نه تنها موجب افزایش مقاومت به خشکی و دمای پایین در توتون تراریخته شده، بلکه موجب بهبود مقاومت به شوری و بیماری‌ها نیز شده است. در روش‌های معمول انتقال ژن گیاهان تراریخت فراوانی معرفی شده‌اند که به دلیل انتقال تنها یک ژن، بهبود نسبی مشاهده شده است، اما انتقال ژن *AREB* به دلیل اینکه تنظیم بیان چندین ژن را بر عهده دارد می‌تواند آثار چندگانه داشته باشد [37, 38].

نتایج این پژوهش علاوه بر شناسایی ژن‌های مقاوم به تنش‌های خشکی و ژرم‌پلاسما گونه‌های گوجه‌فرنگی، به یافتن راه‌های القا مقاومت در ارقام پربازده به‌منظور افزایش محصول و کاهش خسارات ناشی از تنش‌های محیطی حساس کمک می‌نماید. دستاوردهای مطالعه حاضر قابلیت استفاده در دست‌ورزی‌های پروتئینی آینده را روی nsLTP2 دارد. بیان بیشتر ژن‌های *AREB* و *MPK* در بوته‌های تراریخته تعدادی از گیاهان زراعی، تحمل به یخبندان، خشکی و شوری را با موفقیت افزایش داده است. مطالعات روی سایر عوامل رونویسی مرتبط با پاسخ به تنش در حال پیشرفت است. امید است که نتایج این پژوهش‌ها به تولید غذای پایدار در کشورهای در حال توسعه و جلوگیری از آسیب

- interface. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Suppl 2):W5-9.
- 20- Edstam MM, Viitanen L, Salminen TA, Edqvist J. Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. *Mol Plant.* 2011;4(6):947-64.
- 21- Emamzadeh AR, Hosseinkhani S, Sadeghizadeh M, Nikkhah M, Chaichi MJ, Mortazavi M. CDNA cloning, expression and homology modeling of a luciferase from the Firefly *Luciferase* maculata. *Korean Soc Biochem Mol Biol.* 2006;39(5):578-85.
- 22- Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 1990;276(1-2):172-4.
- 23- Hartz C, Lauer I, Del Mar San Miguel Moncin M, Cistero-Bahima A, Foetisch K, Lidholm J, et al. Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;153(4):335-46.
- 24- Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol.* 1999;55(2):85-97.
- 25- Sarowar S, Kim YJ, Kim KD, Hwang BK, Ok Sh, Shin JS. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Rep.* 2009;28(3):419-27.
- 26- Fernandez-Fuentes N, Madrid-Aliste CJ, Rai BK, Fajardo JE, Fiser AS. M4T: A comparative protein structure modeling server. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Suppl 2):W363-8.
- 27- Yiliang L, Xiaohua S, Zhang B, Huang Q, Zhang X, Huang RF. Expression of jasmonic ethylene responsive factor gene in transgenic poplar tree leads to increased salt tolerance. *Tree Physiol.* 2009;29(2):273-9.
- 28- Zhang Z, Li F, Li D, Zhang H, Huang R. Expression of ethylene response factor JERF1 in rice improves tolerance to drought. *Planta.* 2010;232(3):765-74.
- 29- Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med.* 2006;84(11):901-10.
- 30- Zimmermann p, Zentgraf U. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(3):515-34.
- 31- Gomarian M, Malboobi MA, Darvish F, Mohammadi SA. Comparison inducible candidate gene expression patterns under salinity stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *New Find Agric.* 2012;6(2):151-63. [Persian]
- 32- Wang J, Yang L, Zhao X, Li J, Zhang D. Characterization and phylogenetic analysis of allergenic Tryp.alpha.amyl protein family in plants. *J Agric Food Chem.* 2014;62(1):270-8.
- 33- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsmoto K, et al. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(2):765-9.
- 34- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that
- 2- Bayoumil TY, Manal HE, Metwali EM. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *Afr J Biotechnol.* 2008;7(14):2341-52.
- 3- Bray EA. Molecular and physiological responses to water deficit stress. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SHM, editors. *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops.* Chicago: Springer Science & Business Media; 2009. pp. 121-40
- 4- Shao HB, Liang MA, Shao MA, Wang BC. Changes of anti-oxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes at seedling stage. *Bionterfaces.* 2005;42(2):107-13.
- 5- Amiri Oghan H, Moghadam M, Ahmadi MR, Valizadeh M, Shakiba MR. Heritability of seed yield and yield components in rapeseed (*Brassica napus*) under drought stress and normal conditions. *Seed Plant.* 2002;18(2):179-99. [Persian]
- 6- Gray WM. Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol.* 2004;2(9):e311.
- 7- Wilkinson S, Davies WJ. ABA-based chemical signalling: The co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ.* 2002;25(2):195-210.
- 8- Agarwal, PK, Agarwal P, Reddy M, Sopory S. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 2006;25(12):1263-74.
- 9- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(21):11632-7.
- 10- Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2002;53:247-73.
- 11- Kang JY, Choi HI, Im MY, Kim SY. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell.* 2002;14(2):343-57.
- 12- Tuteja N. Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav.* 2007;2(3):135-8.
- 13- Mazandarani A, Rahimmalek M, Navabpour S, Ramezanpoor S. Investigation of expression of catalase gene induced by drought in soybean cultivars. 3<sup>rd</sup> National Conference on Agricultural Biotechnology in Iran, Plant genetic engineering and production technology, Mashhad, University of Ferdowsi Mashhad, September 3-5, 2012. Mashhad: University of Ferdowsi Mashhad; 2012. [Persian]
- 14- Hagege D, Nouvelot A, Boucard J, Gaspar T. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: Avoidance of pigment interference. *Phytochem Anal.* 1990;1(2):86-9.
- 15- Aras S, Duran A, Yenilmez G. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis L.* specimens. *Plant Mol Biol Rep.* 2003;21(4):461-2.
- 16- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 2003;339(1):62-6.
- 17- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- 18- Van Ree R. Clinical importance of non-specific, lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(pt 6):910-3.
- 19- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: A better web

37- Savitch LV, Allard G, Seki M, Robert LS, Tinker NA, Huner NP, et al. The effect of overexpression of two Brassica CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in Brassica napus. *Plant Cell Physiol.* 2005;46(9):1525-39.

38- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 2003;33(4):751-63.

stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(3):1035-40.

35- Kizis D, Pages M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought- responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J.* 2002;30(6):679-89.

36- Magnani E, Sjölander K, Hake S. From endonucleases to transcription factors: Evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell.* 2004;16(9):2265-77.