



بررسی بیوانفورماتیکی توالی‌های EST سنبله گندم چینی بهاره تحت تنش شوری

زهرا زیتتی^۱، عباس عالم‌زاده^{۲*}، اسماعیل ابراهیمی^۳

^۱استادیار بخش آگرواکولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب.

^۲دانشیار بخش زراعت و اصلاح نبات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز.

^۳دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۰۶

چکیده

تغییرات کارکرد ژنوم تحت شرایط تنش می‌تواند راهکاری برای درک بهتر سازوکارهای تحمل به تنش در گیاهان باشد. در این پژوهش سعی شده است تا با بررسی توالی‌های EST دو کتابخانه کنترل و تنش شوری در گندم، تغییرات کارکردی ژنوم در تنش شوری و ژن‌های مؤثر در تحمل به شوری شناسایی شوند. بدین منظور توالی‌های EST از وب‌گاه هاروارد و Graingenes دریافت شدند. به منظور دسته‌بندی توالی‌های EST، تعیین پروتئین‌های مرتبط با یونی‌ژن‌ها (کانتینگ‌ها و سینگل‌تون‌ها)، تعیین گروه‌های کارکردی و آزمون‌های آماری، به ترتیب از بانک اطلاعاتی Egassembler، بلاست وب‌گاه NCBI، وب‌گاه مؤسسه ماکس پلانک و نرم‌افزار IDEG6 استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین ۲۰ گروه کارکردی در شرایط کنترل و تنش شوری بود. در هر دو شرایط کنترل و تنش شوری، گروه‌های کارکردی پروتئین و RNA بیشترین و گروه‌های کارکردی متابولیسم کربوهیدرات اصلی، تبدیل مواد آلی و چرخه کربس کمترین فعالیت کارکردی ژنوم را نسبت به سایر گروه‌های کارکردی ژنوم به خود اختصاص دادند. تحت تنش شوری، فعالیت گروه‌های کارکردی سنتز ATP / انتقال الکترون میتوکندریایی، متابولیسم چربی، اکسایش-کاهش، پروتئین، RNA، DNA و سلول افزایش یافت. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که این گروه‌های کارکردی دارای نقش مهمی در مکانیسم پاسخ به تنش شوری هستند. تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها در شرایط کنترل و تنش شوری نشان داد ۲۷۱ ژن دارای بیان افتراقی معنی‌دار بودند که در ۲۳ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند. ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش می‌توانند جهت دست‌ورزی ژنتیکی با هدف بهبود تحمل به تنش شوری در گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، ژنومیکس کارکردی، سنبله.

مقدمه

امیکس^۱ برای مطالعه در سطح ترانسکریپتوم^۲، پروتئوم^۳، متابولوم^۴ استفاده می‌شود. این فن-آوری‌ها نحوه کارکرد ژنوم در یک شرایط محیطی خاص، روابط بین ژن‌ها، نقش بخش‌های رمز کننده و غیر رمز کننده ژنوم و نقاط کلیدی شبکه پاسخ به شرایط درونی و بیرونی گیاه را روشن می‌سازند (Fleury *et al.*, 2010; Urano *et al.*, 2010). از جمله روش‌های ژنومیکس کارکردی^۵، تولید و تجزیه و تحلیل توالی‌های EST^۶، فن-آوری ریزآرایه^۷ و توالی‌یابی RNA^۸ می‌باشند (Ali *et al.*, 2011).

توالی‌های EST، توالی‌های کوتاه cDNA (میانگین طول ۵۰۰ جفت باز) می‌باشند که به وسیله توالی‌یابی انتهای ۵' یا ۳' همسانه‌های cDNA ایجاد می‌شوند (Dong *et al.*, 2005). آنالیز توالی‌های EST یک روش مؤثر در نقشه-یابی بسیاری از ژن‌ها، کشف ژن‌های جدید و بررسی بیان ژن‌ها در اندام‌ها و بافت‌های مختلف در مراحل نمو و پاسخ به تنش‌ها می‌باشد (Gueguen *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2012; Zhuang & Zhu, 2014). Houde و همکاران (۲۰۰۶) با ایجاد ۷۳۵۲۱ توالی EST از گندم نان در مراحل مختلف نمو و در معرض تنش‌های سرما، شوری و خشکی و ترکیب آن‌ها با

در سیستم‌های کشاورزی، تنش‌های غیر زیستی به ویژه شوری، دمای پائین و خشکی باعث تفاوت عملکرد برداشت شده نسبت به عملکرد بالقوه می‌شوند. مطالعات متعددی با هدف کشف مکانیسم‌های مورد استفاده در گونه-های متحمل به تنش و عناصری که تحمل را به گیاهان حساس اعطا می‌کنند انجام شده است (Noctor & Foyer, 1998; Dat *et al.*, 2000). همچنین پژوهش‌های فراوانی در رابطه با تحمل به شوری در گیاهان زراعی انجام شده است اما ماهیت پیچیده و پلی ژنی تحمل به تنش شوری، اصلاح گیاهان برای تحمل به شوری را با مشکل روبرو کرده است (Zhu, 2000). شواهد زیادی وجود دارند که بیانگر تغییر بیان ژن‌های گیاهی در اثر تنش شوری هستند که احتمالاً به دلیل نقش آن‌ها در سازوکارهای تحمل می‌باشد. مطالعه گیاهان تراریخته این نظریه را که تغییر بیان ژن‌ها می‌تواند منجر به افزایش تحمل شود، حمایت می‌کند (Van Camp *et al.*, 1996; Shikanai *et al.*, 1998; Apse *et al.*, 1999). هم اکنون روش‌های جدیدی برای درک بیشتر ژنتیک تحمل به تنش‌های غیر زیستی در دسترس هستند و به ما این امکان را می‌دهند که پیچیدگی-های پاسخ به تنش را از طریق بررسی پروفایل بیان ژن‌ها در سطح کل ژنوم مورد توجه قرار دهیم (Reymond *et al.*, 2000; Richmond & Somerville, 2000). امروزه از فن‌آوری‌های

^۱ Omics

^۲ Transcriptome

^۳ Proteome

^۴ Metabolome

^۵ Functional genomics

^۶ Expressed Sequenced Tags

^۷ Microarray

^۸ RNA-sequencing

پژوهش سعی شده است تا با بررسی توالی‌های EST کتابخانه‌های کنترل و تنش شوری گندم تغییرات کارکرد ژنوم در تنش شوری، ژن‌های با بیان افتراقی و ژن‌های دخیل در پاسخ به شوری شناسایی شوند. پس از بررسی ژن‌ها می‌توان برنامه‌هایی در جهت انتقال ژن‌های مؤثر در تحمل به تنش شوری از طریق برنامه‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک به ژنوم گندم طرح ریزی کرد که در صورت موفقیت به تولید ارقامی با تحمل به شوری بالا خواهد انجامید.

مواد و روش‌ها

به منظور مقایسه گروه‌های کارکردی و بیان ژن‌ها یک کتابخانه گندم چینی بهاره تحت تنش شوری با ۱۴۷۷۰ توالی EST تحت عنوان TA034G1X و یک کتابخانه گندم چینی بهاره در شرایط کنترل با ۱۰۵۴۴ توالی EST تحت عنوان TA019E1X که مربوط به سنبله گندم هستند از وب‌گاه‌های GrainGenes^۲ و هاروارد^۳ با فرمت FASTA دریافت شدند. توالی‌های EST مربوط به هر کدام از کتابخانه‌ها به صورت جداگانه با استفاده از سایت EGAssembler^۴ (MasoudiNejad *et al.*, 2006) با در نظر گرفتن ۸۰٪ شباهت دسته‌بندی و همگذاری شدند. این سایت توالی‌های مربوط به وکتور، توالی‌های کلروپلاستی و میتوکندریایی، توالی‌های تکرار

۱۹۶۰۴۱ توالی EST موجود در بانک‌های اطلاعاتی و دسته‌بندی آن‌ها، به ۷۵۴۸۸ یونی‌ژن^۱ (۳۱۵۸۰ کانتینگ و ۴۳۹۰۸ سینگل تون) دست یافتند. بیش از ۴۳٪ از این یونی‌ژن‌ها مورد آنالیز کارکردی قرار گرفت و گروه‌های کارکردی مربوط به آن‌ها تعیین شد (Houde *et al.*, 2006). روش EST به منظور پیدا کردن ژن‌های جدید و تعیین الگوی‌های بیان در گیاه *Suaeda salsa* (Zhang *et al.*, 2001)، *Thellungiella halophila* (Wang *et al.*, 2004) و *Mesembryanthemum crystallinum* (Kore-eda *et al.*, 2004) در پاسخ به تنش شوری استفاده شده است. در پژوهشی روی گیاه شورپسند *Aeloropous litorallis*، به عنوان گیاهی که می‌تواند منبع ژنتیکی ارزشمندی برای ژن‌های مقاومت به شوری و خشکی باشد، سه کتابخانه cDNA از بافت‌های ریشه و برگ در شرایط مختلف تیمار شوری ایجاد کردند و نهایتاً ۱۲۶۸ توالی EST را توالی‌یابی کردند (Zouari *et al.*, 2007). پس از مقایسه با پایگاه‌های داده‌ی پروتئینی، ۶۸٪ از توالی‌ها در گروه پروتئین‌های با کارکرد مشخص، ۱۲٪ در گروه توالی‌های مشابه ناشناس و ۲۰٪ در هیچ گروهی قرار نگرفت که می‌تواند دلیلی بر جدید بودن آن‌ها باشد (Zouari *et al.*, 2007). شناسایی و بررسی کارکرد ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری به درک مکانیسم‌های کلیدی تنش شوری کمک می‌کند. در این راستا، در این

^۱ http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/est_lib.cgi

^۲ <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>

^۳ <http://egassembler.hgc.jp/>

^۴ Unigenes

سپس فهرست کدهای Tair یونی‌ژن‌های مربوط به هر کتابخانه به عنوان ورودی سرویس Gene Classify در سایت ماکس پلانک^۱ (Usadel et al., 2006) و با مرجع قرار دادن ژنوم آرآیدوپسیس در سطح ۱ درصد مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق EST‌های دو کتابخانه به صورت توأم توسط EGassembler بر اساس میزان شباهت ۸۰٪ شباهت دسته‌بندی و همگذاری شدند. مبنای بررسی و مقایسه بیان ژن‌ها در شرایط کنترل و تنش شوری تعداد رونوشت‌های هر ژن در هر کدام از کتابخانه‌ها می‌باشد. تمام کانتیگ‌ها و سینگل‌تون‌های مربوط به دسته‌بندی و همگذاری EST‌های مربوط به دو کتابخانه با استفاده از نرم افزار CLC Protein Workbench version 5.1 و توالی‌های پروتئینی nr پایگاه NCBI بلاست ایکس شدند. ژن‌هایی که در گندم گزارشی در مورد آن‌ها وجود ندارد و همچنین توالی‌هایی که با هیچ کدام از توالی‌های موجود در پایگاه داده شباهتی نداشتند به عنوان نامزدهای ژن‌های جدید احتمالی در نظر گرفته شدند. به منظور تعیین گروه‌های کارکردی ژن‌هایی که تغییر بیان داشتند، کدهای Tair مربوط به هر کدام از آن‌ها به صورت جداگانه به عنوان ورودی سرویس Gene Classify در سایت ماکس پلانک مورد استفاده قرار گرفت.

برای یافتن گروه‌های کارکردی متفاوت و همچنین تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بیان ژن‌ها در شرایط تحت تنش و کنترل از نرم‌افزار تحت وب

شونده و توالی‌های با طول کوتاه‌تر از ۱۰۰bp را حذف می‌کند. سپس توالی‌های باقیمانده با کیفیت بالا با در نظر گرفتن ۸۰٪ شباهت دسته‌بندی و همگذاری شدند. به عبارتی توالی‌هایی که به هم شبیه هستند در یک دسته قرار می‌گیرند. خروجی این سرویس شامل سه فایل بود. یک فایل شامل توالی‌های منفرد بود که در هیچ دسته‌ای قرار نگرفتند و به آن‌ها سینگل‌تون (شامل تنها یک EST) می‌گویند. فایل دیگر شامل دسته‌هایی بیش از یک توالی بود که به آن‌ها کانتیگ (شامل دو یا تعداد بیشتری EST) می‌گویند و فایل دیگر شامل صف‌بندی توالی‌های EST بود. بلاست ایکس برای یونی‌ژن‌های (کانتیگ‌ها و سینگل‌تون‌های) هر کتابخانه به منظور تعیین پروتئین‌های مرتبط با آن‌ها انجام شد. این کار با استفاده از نرم افزار CLC Protein Workbench version 5.1 صورت گرفت. ماتریس مورد استفاده برای انجام بلاست ایکس Blosum 62 و حداکثر E-value برابر 10^{-5} بود. از آن‌جا که بانک اطلاعات کارکردی گیاه آرآیدوپسیس کامل‌ترین بانک گیاهی است، به منظور تعیین گروه‌های کارکردی ژنوم تحت شرایط نرمال و تنش شوری، توالی‌های پروتئینی آرآیدوپسیس از سایت Tair (<https://www.arabidopsis.org>) دریافت شدند. سپس بلاست ایکس با استفاده از نرم افزار CLC Protein Workbench version 5.1، برای یونی‌ژن‌های (کانتیگ‌ها و سینگل‌تون‌های) هر کتابخانه در مقابل پروتئین‌های آرآیدوپسیس انجام شد و کدهای Tair مربوط به یونی‌ژن‌ها دریافت شدند.

^۱ <http://mapman.mpimp-golm.mpg.de>

قرار گرفت. علت این امر می‌تواند وجود تعداد رونوشت‌های بیشتری از یک ژن (یعنی افزایش بیان ژن) در کتابخانه تحت تنش باشد که سبب افزایش تعداد EST‌های تشکیل دهنده هر کانتیگ در کتابخانه تنش می‌شود. از آن جا که گروه‌های کارکردی گیاه آرابیدوپسیس به طور کامل شناخته شده است جستجوی بلاست برای کانتیگ‌ها و سینگل‌تون‌های دو کتابخانه در برابر بانک اطلاعاتی آرابیدوپسیس با استفاده از نرم افزار CLC Protein Workbench version 5.1 انجام شد. نتایج نشان داد که ۶۶/۹۶ درصد یونی‌ژن‌های کتابخانه کنترل و ۶۹/۹۹ درصد یونی‌ژن‌های کتابخانه تنش شوری با پروتئین‌های شناخته شده در آرابیدوپسیس و با $E\text{-value} \leq 10^{-5}$ شباهت داشتند و به ترتیب ۳۳/۰۳ درصد و ۳۰ درصد یونی‌ژن‌های کتابخانه‌های کنترل و تنش شوری با هیچ پروتئینی در آرابیدوپسیس شباهت نشان ندادند و به عبارتی فاقد hit بودند (جدول ۲).

IDEG6^۱ استفاده شد. این سرویس امکان اجرای شش آزمون آماری مختلف را فراهم کرده است. در این پژوهش از آزمون Audic and Claverie در سطح ۰.۵٪ استفاده شد. این آزمون دقیق‌ترین آزمون در مقایسات جفتی می‌باشد (Romualdi et al., 2003). آزمون Audic and Claverie کتابخانه‌ها را به صورت جفتی و بر پایه محاسبه احتمال شرطی و با فرض یکسان بودن تعداد ژن-ها در هر گروه کارکردی در دو کتابخانه مورد بررسی (Man et al., 2000) و یا یکسان بودن تعداد رونوشت‌ها در هر کانتیگ در دو کتابخانه، مقایسه می‌کند.

نتایج و بحث

در پژوهش حاضر، به منظور ارزیابی اثر شوری بر پروفایل ترانسکریپتوم سنبله‌های گندم و با توجه به نقش پراهمیت توالی‌های EST در دستیابی به ژن‌های جدید، از تجزیه و تحلیل توالی‌های EST استفاده شد. از دسته‌بندی توالی‌های EST کتابخانه‌های گندم تحت شرایط کنترل و شوری با استفاده از سرویس بیوانفورماتیک EGAssembler به ترتیب ۶۹۱۹ و ۵۵۸۵ یونی‌ژن مجزا تشکیل شد که نتایج همگذاری این توالی‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. در مجموع، ۴۸/۳۹ درصد کل توالی‌های EST کتابخانه گندم کنترل و ۷۹/۵۳۹ درصد کل توالی‌های EST کتابخانه گندم تحت تنش شوری درون کانتیگ‌ها

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

جدول ۱- نتایج دسته‌بندی و همگذاری توالی‌های EST دو کتابخانه گندم تحت شرایط کنترل و تنش شوری.

Table 1- Results of clustering and assembling ESTs from control and salt stress EST libraries.

کتابخانه Library	تعداد EST Number of ESTs	تعداد یونی‌ژن Number of unigenes	تعداد کانتیگ‌ها Number of contigs	تعداد سینگل‌تون‌ها Number of singletons
کنترل Control	10544	6919	1478	5441
تنش شوری Salt stress	14770	5585	2563	3022

جدول ۲- نتایج بلاست کانتیگ‌ها و سینگل‌تون‌های دو کتابخانه گندم تحت شرایط کنترل و شوری در مقابل توالی‌های پروتئینی آرابیدوپسیس.

Table 2- BLASTX results for the contigs and singletons obtained from control and salt stress EST libraries against the Arabidopsis proteins database.

کتابخانه Library	کانتیگ Contigs		سینگل‌تون Singletones		یونی‌ژن‌های دارای hit	یونی‌ژن‌های بدون hit
	دارای hit With hit	بدون hit Without hit	دارای hit With hit	بدون hit Without hit	Unigenes with significant matches (hit)	Unigenes with no significant matches (hit)
کنترل Control	1246	232	3387	2054	4633	2286
تنش شوری Salt stress	1946	617	1963	1059	3909	1676

شبهات در کارکرد و فعالیتشان به گروه‌های کارکردی مختلف تقسیم‌بندی شوند. این تقسیم‌بندی اطلاعات بسیار با ارزشی پیرامون قسمت‌های فعال ژنوم طی یک فرایند خاص و همچنین

ماهیت شناسی یا آنتالوژی ژن برای تشریح کارکرد ژن و پروتئین استفاده می‌شود. ماهیت-شناسی ژن این امکان را فراهم می‌آورد که ژن‌های مورد بررسی در یک فرایند مشخص بر اساس

میزان فعالیت این قسمت‌ها فراهم می‌کند (Rhee *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2003). بنابراین گروه‌های کارکردی مربوط به هر کتابخانه با استفاده از وب‌گاه ماکس پلانک تعیین شدند. یونی‌ژن‌های دارای hit کتابخانه گندم کنترل و کتابخانه گندم تحت تنش شوری به ترتیب در ۳۵ و ۳۴ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند. گروه کارکردی میکروRNA و آنتی‌سنس‌های طبیعی^۱ هیچ نماینده‌ای در کتابخانه کنترل و گروه‌های کارکردی چرخه گلی‌اکسیلات/ گلوکونئوزنز^۲ و چرخه جذب سولفات^۳ هیچ نماینده‌ای در کتابخانه گندم تحت تنش شوری نداشتند. بنابراین دو کتابخانه در ۳۲ گروه کارکردی مشترک بودند. یکی از اصلی‌ترین روش‌های تنظیم فرایندهای ژنتیکی از طریق مکانیسم‌های مرتبط با میکروRNA است. میکروRNAها مولکول‌های کوچک (۲۲ نوکلئوتیدی) و تک رشته‌ای هستند که مکمل mRNA یک ژن رمز کننده یک پروتئین می‌باشند و می‌توانند از بیان یک ژن یا تولید یک پروتئین جلوگیری کنند. از این رو تحقیقات فراوانی در مورد نقش این مولکول‌ها صورت گرفته است (Winter & Diederichs, 2011). میکروRNAها نقش‌های مهمی در پاسخ به محرومیت مواد غذایی، تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارند (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Sunkar & Zhu, 2004; Fujii *et al.*, 2005; Chiou *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2006; Sunkar *et al.*, 2006; Sunkar *et al.*, 2006).

حضور گروه کارکردی میکرو RNA در کتابخانه تنش شوری، بیانگر تنظیم بیان بعضی از ژن‌ها در پاسخ به تنش شوری در سطح پس از رونویسی^۴ می‌باشد. آزمون Claverie and Audio در سطح ۵ درصد، وجود تفاوت معنی‌دار در ۲۰ گروه کارکردی بین دو شرایط کنترل و تحت تنش شوری را نشان داد (شکل ۱). چهار گروه کارکردی متابولیسم ثانویه^۵، misc^۶ (خانواده‌های آنزیمی متفاوت)، پروتئین و سیگنالینگ اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ بین شرایط کنترل و تنش شوری نشان دادند و بقیه گروه‌های کارکردی در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار داشتند. با توجه به شکل ۱ در هر دو کتابخانه کنترل و تنش شوری فعالیت گروه‌های کارکردی پروتئین، RNA نسبت به سایر گروه‌های کارکردی ژنوم در بالاترین سطح و در مقابل فعالیت گروه‌های کارکردی متابولیسم اصلی کربوهیدرات^۷ و تبدیل مواد آلی و چرخه کربس^۸ در پائین‌ترین سطح قرار داشت. همچنین فعالیت گروه‌های کارکردی سنتز ATP / انتقال الکترون میتوکندریایی^۹، متابولیسم لیپید^{۱۰}، اکسایش - احیا^{۱۱}، پروتئین، RNA و DNA سلول در شرایط تنش شوری افزایش و فعالیت گروه‌های کارکردی دیگر

میزان فعالیت این قسمت‌ها فراهم می‌کند (Rhee *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2003). بنابراین گروه‌های کارکردی مربوط به هر کتابخانه با استفاده از وب‌گاه ماکس پلانک تعیین شدند. یونی‌ژن‌های دارای hit کتابخانه گندم کنترل و کتابخانه گندم تحت تنش شوری به ترتیب در ۳۵ و ۳۴ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند. گروه کارکردی میکروRNA و آنتی‌سنس‌های طبیعی^۱ هیچ نماینده‌ای در کتابخانه کنترل و گروه‌های کارکردی چرخه گلی‌اکسیلات/ گلوکونئوزنز^۲ و چرخه جذب سولفات^۳ هیچ نماینده‌ای در کتابخانه گندم تحت تنش شوری نداشتند. بنابراین دو کتابخانه در ۳۲ گروه کارکردی مشترک بودند. یکی از اصلی‌ترین روش‌های تنظیم فرایندهای ژنتیکی از طریق مکانیسم‌های مرتبط با میکروRNA است. میکروRNAها مولکول‌های کوچک (۲۲ نوکلئوتیدی) و تک رشته‌ای هستند که مکمل mRNA یک ژن رمز کننده یک پروتئین می‌باشند و می‌توانند از بیان یک ژن یا تولید یک پروتئین جلوگیری کنند. از این رو تحقیقات فراوانی در مورد نقش این مولکول‌ها صورت گرفته است (Winter & Diederichs, 2011).

میکروRNAها نقش‌های مهمی در پاسخ به محرومیت مواد غذایی، تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارند (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Sunkar & Zhu, 2004; Fujii *et al.*, 2005; Chiou *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2006; Sunkar *et al.*, 2006; Sunkar *et al.*, 2006).

^۲ Post-transcriptional level

^۳ Secondary metabolism

^۴ Miscellaneous enzyme families

^۵ Major CHO metabolism

^۶ TCA and organic transformation

^۷ Mitochondrial electron transport /ATP synthesis

^۸ Lipid metabolism

^۹ Redox

^۱ Micro RNA, natural antisense

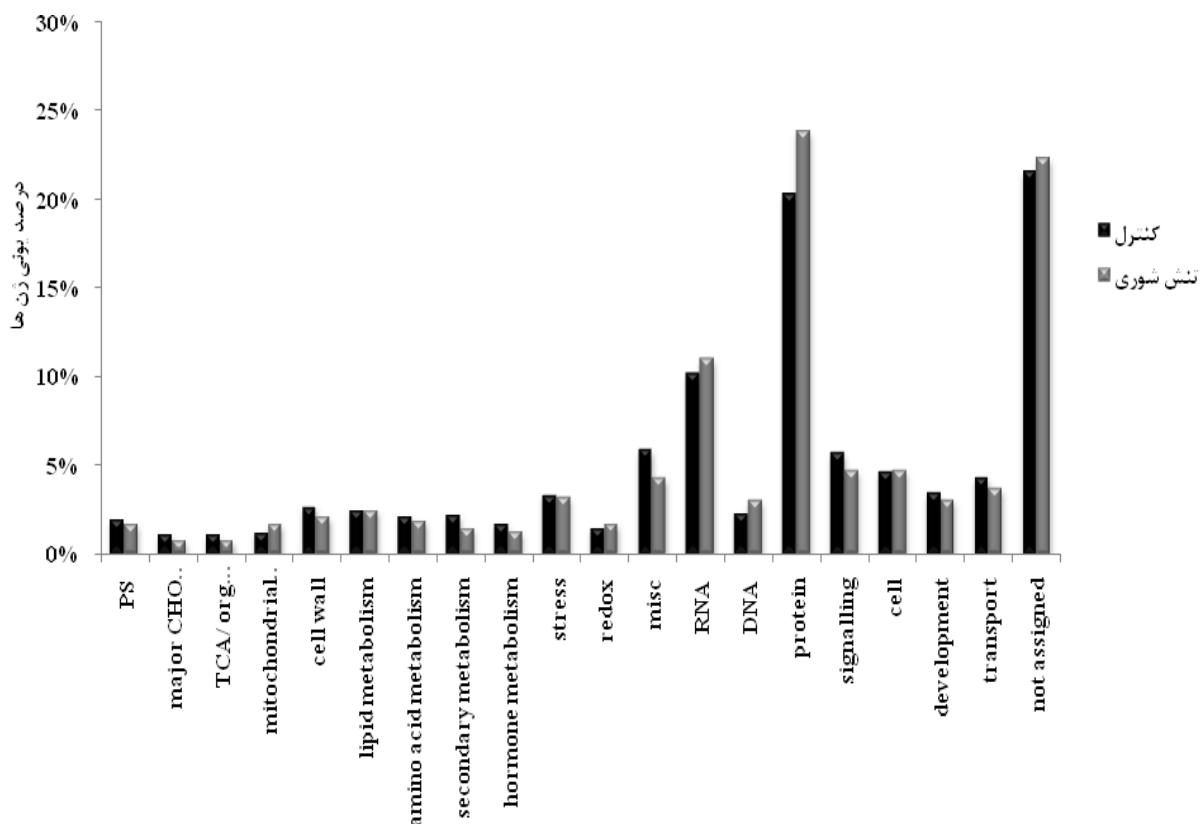
^۲ Gluconeogenesis/ glyoxylate cycle

^۳ S-assimilation

chlorophyll a-(XP_003562323.1), protein
 .b binding protein, chloroplastic-like
 ferredoxin-NADP(H) (CAD30025.1)
 Oxygen- (Q00434.1), oxidoreductase
 .evolving enhancer protein 2, chloroplastic
 ribulose-1,5-bisphosphate (BAB19814.1)
 carboxylase/oxygenase small subunit اشاره
 کرد. بنابراین، کاهش فعالیت گروه کارکردی
 فتوسنتز ممکن است ناشی از کاهش بیان این ژن-
 ها باشد. نقش برخی از این ژن‌ها در تنش شوری
 و سایر تنش‌های محیطی به خوبی شناخته شده
 است. برای مثال بر اساس نتایج پژوهشی با
 استفاده از روش پروتئومیکس انجام شد، تحت
 تنش شوری بیان پروتئین Oxygen-evolving
 enhancer protein 2 در برگ گیاه گندم کاهش
 یافت (Gao *et al.*, 2011). همچنین oxygen-
 evolving enhancer protein 1, chloroplast
 Oxygen-evolving enhancer (OEE1) و
 protein 2, chloroplastic (OEE2) در کمپلکس
 آزادسازی اکسیژن در فتوسیستم II نقش ایفا می-
 کنند و باعث تجزیه آب و آزادسازی اکسیژن می-
 شوند (de Vitry *et al.*, 1989).

کاهش یافته است. به عبارتی می‌توان گفت تحت
 تنش شوری فعالیت ژنوم به سمت افزایش سنتز
 ATP / انتقال الکترون میتوکندریایی، متابولیسم
 لیپید، اکسایش - احیا، پروتئین، RNA و DNA
 گرایش پیدا می‌کند که می‌تواند بیانگر نقش مهم
 این گروه‌های کارکردی در فرایند تحمل به
 شوری باشد. به علاوه، شناسایی ژن‌های پاسخ
 دهنده برای درک اساس مولکولی تحمل به
 شوری ضروری است. در این راستا، به منظور
 یافتن ژن‌های دارای بیان افتراقی، EST‌های دو
 کتابخانه به طور مجزا توسط EGAssembler بر
 اساس میزان شباهت دسته بندی شدند. طبق نتایج
 آزمون آماری Audic and Claverie، ۲۷۱ کانتیگ
 بین شرایط کنترل و تنش شوری دارای بیان
 افتراقی معنی‌دار در سطح ۰.۵٪ بودند. نتایج نشان
 داد که ۹۲ کانتیگ تنها در تنش شوری بیان شدند،
 ۱۰۱ کانتیگ در تنش شوری افزایش بیان نشان
 دادند، ۲۲ کانتیگ در تنش شوری کاهش بیان
 داشتند و ۵۶ کانتیگ تنها در شرایط کنترل بیان
 شدند.

بر اساس نتایج این پژوهش، فعالیت گروه
 کارکردی فتوسنتز تحت تنش شوری کاهش
 یافت. از طرف دیگر بررسی ژن‌های دارای بیان
 افتراقی نشان داد که ژن‌هایی که در این گروه
 کارکردی قرار می‌گیرند اغلب کاهش بیان داشتند.
 از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن‌های رمز کننده
 chloroplast oxygen-(ABQ52657.1)
 .evolving enhancer protein 1
 chlorophyll a-b binding (ACO06087.1)



شکل ۱- مقایسه گروه‌های کارکردی در شرایط کنترل و تنش شوری.

Figure 1- Comparison of functional categories between control and salt stress conditions
 PS: فتوسنتز، CHO metabolism major: متابولیسم کربوهیدرات‌های بزرگ، TCA/ org. Transformation: تری کربوکسیلیک اسید/تبدیل اسیدهای آلی، mitochondrial electron transport / ATP synthesis: انتقال الکترون در میتوکندری/ سنتز ATP، cell wall: دیواره سلولی، lipid metabolism: متابولیسم چربی، amino acid metabolism: متابولیسم اسید آمینه، secondary metabolism: متابولیسم ثانویه، hormone metabolism: متابولیسم هورمونی، stress: تنش، redox: اکسایش- احیا، misc: خانواده- های آنزیمی متفاوت، RNA: پردازش، رونویسی و تنظیم رونویسی، DNA: سنتز، ساختار کروماتین و ترمیم DNA، protein: سنتز پروتئین، signaling: علامت‌دهی، cell: تقسیم و چرخه سلولی و انتقال و زیکول، development: نمو، transport: انتقال، not assigned: پروتئین‌های ناشناخته و فرضی.

های اکسیژن آزاد کمتری تولید و در نتیجه تخریب کمتری به فتوسیستم II وارد گردد (Maleki et al., 2012). همچنین در گندم دوروم تحت تنش شوری، کاهش بیان پروتئین OEE2 گزارش شده است (Caruso et al., 2008).

در پژوهشی نیز کاهش بیان پروتئین OEE2 را در گیاهچه تحت تنش شوری گندم نان مشاهده کردند. آن‌ها گزارش کردند که کاهش بیان پروتئین OEE2 احتمالاً می‌تواند باعث کاهش سطح آزاد سازی اکسیژن شود تا رادیکال-

اختلاف معنی‌داری بین کتابخانه‌های کنترل و تنش نشان نداده بودند. این یافته می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که تنها مطالعه و بررسی گروه-های کارکردی به منظور چنین مقایساتی نمی‌تواند اطلاعات کاملی پیرامون تغییرات کارکردی ژنوم به دست دهد و در کنار آن لازم است که به صورت جداگانه بیان ژن‌ها و اختلافات احتمالی بین کتابخانه‌ها نیز بررسی شود (-Shamloo, 2009). توزیع ژن‌ها در گروه‌های کارکردی نیز متفاوت بود (شکل ۲). گروه کارکردی پروتئین با ۶۵ ژن دارای بیان افتراقی، بیشترین تعداد ژن‌ها را به خود اختصاص داد و چهار گروه کارکردی تجزیه زنبیوتیک‌ها، متابولیسم نوکلئوتید، متابولیسم کربوهیدرات اصلی و متابولیسم هورمون^۱ هم دارای یک ژن با بیان متفاوت بین دو کتابخانه کنترل و تنش شوری بودند.

نتیجه قابل توجهی دیگری که از داده‌کاوی EST به دست آمد، شناسایی ژن‌های جدید مرتبط با پاسخ به تنش شوری می‌باشد. در این پژوهش برای نخستین بار، چندین ژن جدید مانند MIKC-type MADS-box transcription *Triticum* factor WM20 (AM502886) *aestivum* alternative splicing regulator (SRp30a) (DQ019639)، ژن رمزکننده پروتئین متصل شونده به whGRP-1^۶ (U32310) RNA، در پاسخ به شوری در گندم گزارش شدند. این ژن‌ها می‌توانند دارای اثرات بالقوه برای القای

بر اساس نتایج مشخص گردید از مجموع ۲۷۱ کانتینگ ذکر شده ۱۷ کانتینگ هیچ شباهتی با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها نداشتند و به عبارتی فاقد hit بودند. چندین احتمال برای توالی‌های بدون hit وجود دارد. ممکن است خطاهای توالی‌یابی یا همگذاری ESTها منجر به ایجاد چنین توالی‌هایی شده باشد. همچنین توالی‌های بدون hit ممکن است مختص گونه باشد بنابراین بلاست آن‌ها در گونه‌های دیگر نتیجه‌ای در بر نخواهد داشت. یک احتمال دیگر این است که توالی‌های بدون hit ممکن است ژن‌های واقعی باشند که هنوز شناسایی نشده‌اند و یا در پایگاه‌های داده‌ها قرار نگرفته‌اند و در نتیجه تعیین کارکرد و نقش آن‌ها در تنش شوری باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. بررسی آنتولوژی و تجزیه و تحلیل الگوی بیان این ژن‌ها به شناسایی کارکرد آن‌ها کمک می‌کنند.

همچنین دسته‌بندی ژن‌های با بیان افتراقی بر اساس گروه کارکردی که به آن تعلق دارند انجام شد. در مجموع ژن‌های با بیان افتراقی در ۲۳ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند که ۱۹ گروه از این ۲۳ گروه با ۲۰ گروه کارکردی که بین دو کتابخانه کنترل و تنش اختلاف معنی‌دار داشتند، مشترک بوده و ۴ گروه باقیمانده که شامل گروه-های کارکردی گلیکولیز^۱، تخمیر^۲، تجزیه زنبیوتیک‌ها^۳ و متابولیسم نوکلئوتیدها^۴ بودند،

^۱ Glycolysis

^۲ Fermentation

^۳ Biodegradation of Xenobiotics

^۴ Nucleotide metabolism

^۱ Hormone metabolism

^۲ Glycine-rich RNA-binding protein

،AY846819.1، AJ001161.1، AY846832.1، EU960877.1، AY290723.1، X62725.1، (، فاکتورهای شروع ترجمه^۲ (DQ167203.2) و ادامه ترجمه^۳ (M90077.1)، فاکتورهای رونویسی^۴ (AY781352.1، AY955493.2، AB272226.1، EU096087، AJ890015.1، AM502886.1)، پروتئین‌های متصل شونده به RNA^۵ (U32310.1) و تنظیم کننده اسپلایسینگ جایگزین^۶ (DQ019639.1) را در پاسخ به شوری نشان داد و بیانگر آن است که به جز رونوشت‌های مربوط به اسمولیت‌ها و ترانسپورترهای یونی، رونوشت‌های رمز کننده پروتئین‌های تنظیمی مرتبط با ماشین رونویسی و ترجمه نیز نقش مهمی در پاسخ به تنش شوری دارند. این نتایج با یافته‌های (Sahi et al., 2006) تطابق دارد. آن‌ها نشان دادند که پروتئین‌های مرتبط با ماشین رونویسی و ترجمه به ویژه فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های متصل شونده به RNA، ژن‌های ریوزومی و فاکتورهای شروع و ادامه ترجمه در طول تنش شوری اهمیت دارند. بنابراین نیاز جدی برای بررسی کارکرد سلولی این ژن‌ها که احتمالاً در تحمل به شوری نقش دارند، وجود دارد (Sahi et al., 2006).

تحمل به شوری و منابع با ارزشی برای سیستم‌های جدید تحمل به شوری باشند. اهمیت فاکتورهای رونویسی MADS box در شبکه ژنی پاسخ به شوری در برنج نشان داده شده است (Cooper et al., 2003) و طی تحقیقی نشان داده شده است که SR-rich splicing factorsها در تحمل به تنش شوری مؤثر هستند (Forment et al., 2002). همچنین طی پژوهشی مشخص شده است که فراوانی پروتئین‌های متصل شونده به splicing factor RNA در شرایط تنش افزایش می‌یابد (Agarwal and Grover, 2005). پروتئین‌های متصل شونده به RNA در سطوح پردازش، انتقال، پلی‌آدنیلایسون و پایداری RNA بیان ژن را کنترل می‌کنند (Higgins, 1991; Dreyfuss et al., 1993). ژن WhGRP-1، ژن رمز کننده پروتئین غنی از گلیاسین متصل شونده به RNA در گندم می‌باشد که علاوه بر یک موتیف متصل شونده به RNA (موتیف RNP)، یک دومین غنی از گلیاسین نیز دارد (Guiltinan & Niu, 1996). گزارش شده است که تعدادی از اعضای خانواده پروتئینی غنی از گلیاسین متصل شونده به RNA توسط تنش سرمایی القا می‌شوند (Bergeron et al., 1993; Heintzen et al., 1994; Carpenter et al., 1994).

افزون بر این، بررسی پروفایل رونوشت‌ها، افزایش و کاهش بیان ژن‌های ریوزومی^۱ (AY846823.1، AY846832.1، BK001234.1، EU957356.1، AY846831.1، AY846822.1

^۲ Translation initiation factor

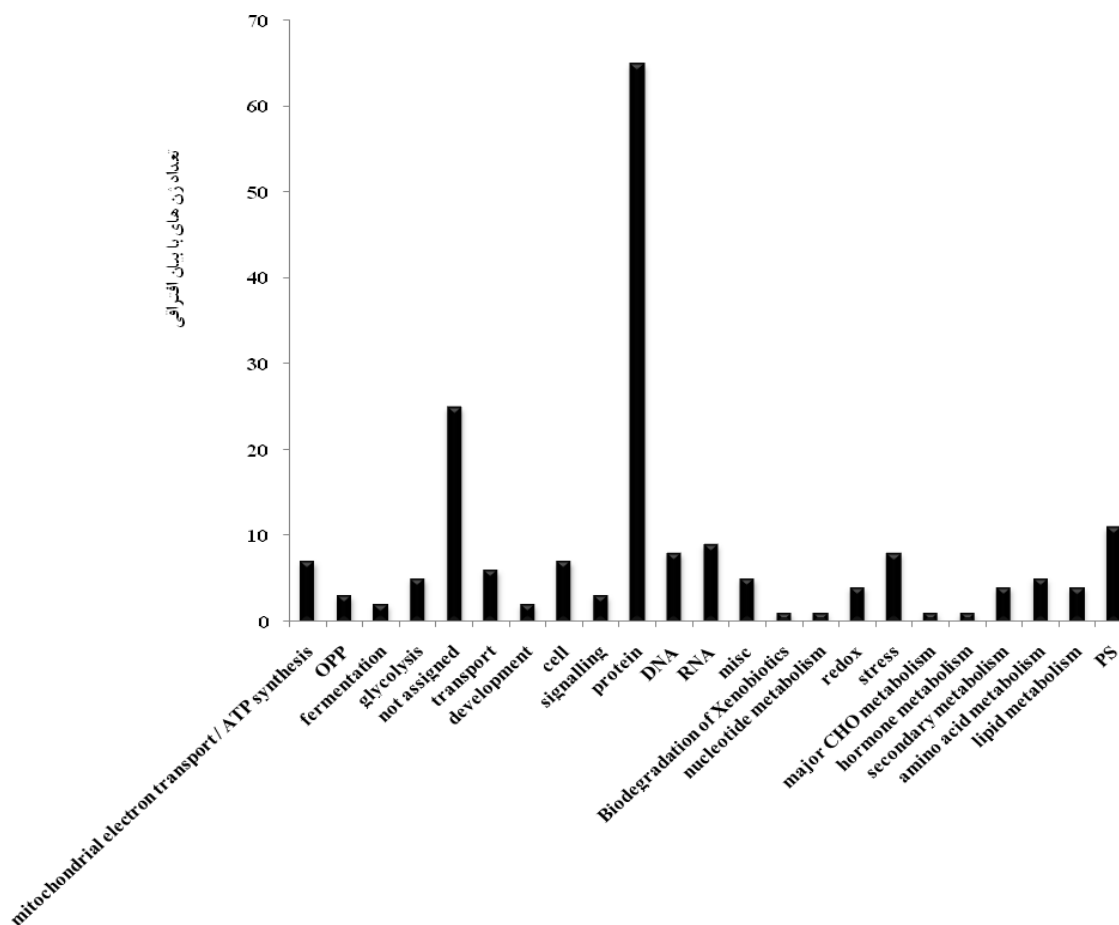
^۳ Translation elongation factor

^۴ Transcription factor

^۵ Single-stranded nucleic acid binding protein

^۶ Alternative splicing regulator

^۱ Ribosomal protein



شکل ۲- توزیع ژن‌های با بیان افتراقی در گروه‌های کارکردی.

Figure 2- Functional categorization of differentially expressed genes.

mitochondrial electron transport / ATP synthesis: انتقال الکترون در میتوکندری / سنتز ATP، چرخه اکسیداتیو پنتوز فسفات، تخمیر، glycolysis: گلیکولیز، not assigned: پروتئین‌های ناشناخته و فرضی، transport: انتقال، fermentation: تخمیر، cell: نمو، سازماندهی سلولی، تقسیم و چرخه سلولی و انتقال وزیکول، signaling: علامت‌دهی، protein: سنتز پروتئین، فعال‌سازی اسید آمینه، تغییرات پروتئین و تجزیه پروتئین، DNA: سنتز، ساختار کروماتین و ترمیم RNA، DNA: پردازش، رونویسی و تنظیم رونویسی، misc: خانواده‌های آنزیمی متفاوت، Biodegradation of Xenobiotics: تجزیه زنبیوتیک، nucleotide metabolism: متابولیسم نوکلئوتید، redox: اکسایش-کاهش، stress: تنش، major CHO metabolism: متابولیسم کربوهیدرات‌های بزرگ، hormone metabolism: متابولیسم هورمونی، secondary metabolism: متابولیسم ثانویه، amino acid metabolism: متابولیسم اسید آمینه، lipid metabolism: متابولیسم چربی، PS: فتوستتز.

شوری ایجاد کند. روش آنالیز EST، راهی سریع و منطقی برای یافتن گروه‌های کارکردی فعال ژنوم طی شرایط تنش و شناسایی ژن‌های نامزد جدید برای تحمل به تنش‌ها می‌باشد. از آنجا

به طور کلی مطالعات بیوانفورماتیک می‌تواند منجر به شناسایی مسیرهای مرتبط با تنش شوری و فهم مکانیسم‌های کنترل‌کننده تحمل به تنش شود و دید جامع‌تری در ایجاد تحمل به

تحمل به شوری باشند. cDNAهای کامل ژنهای نامزد قابل جداسازی هستند و می‌توان با استفاده از تراریزش گیاهان مدل، کارکرد خاص این ژن‌ها را در تحمل به شوری بررسی کرد و در نهایت از آن‌ها به عنوان ژنهای هدف در مهندسی ژنتیک گیاهان زراعی با هدف بهبود تحمل به تنش شوری استفاده نمود.

که تا کنون گزارشی از نقش این ژن‌ها در تحمل به شوری در گندم منتشر نشده است، ژنهای شناسایی شده در این پژوهش از قبیل whGRP-1 (U32310)، MADS-type MIKC-box transcription factor WM20 (*Triticum aestivum*, AM502886)، alternative splicing regulator (SRp30a) (DQ019639) می‌توانند نامزدهای ارزشمندی جهت بررسی بیشتر برای سیستم‌های جدید

منابع

- Agarwal S, Grover A (2005). Isolation and transcription profiling of low-O₂ stress-associated cDNA clones from the flooding-stress-tolerant FR13A rice genotype. *Annals of Botany* 96: 831-844.
- Ali Q, Ahsan M, Tahir M, Elahi M, farooq J, Waseem M (2011). Gene expression and functional genomics approach for abiotic stress tolerance in different crop species. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences* 5: 221-248.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Bergeron D, Beauseigle D, Bellemare G (1993). Sequence and expression of a gene encoding a protein with RNA-binding and glycine-rich domains in *Brassica napus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 19: 123-125.
- Carpenter CD, Kreps JA, Simon AE (1994). Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiology* 104: 1015-1025.
- Caruso G, Cavaliere C, Guarino C, Gubbiotti R, Foglia P, Lagana A (2008). Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391: 381-390.
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL (2006). Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 412-421.
- Cooper B, Clarke JD, Budworth P, Kreps J, Hutchison D, Park S, Guimil S, Dunn M, Luginbuhl P, Ellero C, Goff SA, Glazebrook J (2003). A network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 100: 945-9950.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular life Sciences* 57: 779-795.
- de Vitry C, Olive J, Drapier D, Recouvreur M, Wollman FA (1989). Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: a study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Cell Biology* 109: 991-1006.

- Dong Q, Kroiss L, Oakley FD, Wang B, Brendel V (2005). Comparative EST analysis in plant systems. *Methods in Enzymology* 395:400-416.
- Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annual Review of Biochemistry* 62: 289-321.
- Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, Langridge P (2010). Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* 61:3211-3222.
- Forment J, Naranjo MA, Roldan M, Serrano R, Vicente O (2002). Expression of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *The Plant Journal* 30: 511-519.
- Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Current Biology* 15: 2038-2043.
- Gao L, Yan X, Li X, Guo G, Hu Y, Ma W, Yan Y (2011). Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry* 72: 1180-1191.
- Gruber M, Wu L, Links M, Gietvai B, Durkin J, Lewis C, Sharpe A, Lydiate D, Hegedus D (2012). Analysis of expressed sequence tags in *Brassica napus* cotyledons damaged by crucifer flea beetle feeding. *Genome* 55:118-133
- Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguere C, Girardot AL, Garnier J, Hoareau A, Bachere E, Escoubas JM (2003). Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303: 139-145.
- Guiltinan MJ, Niu X (1996). cDNA encoding a wheat (*Triticum aestivum* cv. Chinese spring) glycine-rich RNA-binding protein. *Plant Molecular Biology* 30: 1301-1306.
- Heintzen C, Melzer S, Fischer R, Kappeler S, Apel K, Staiger D (1994). A light- and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *The Plant Journal* 5: 799-813.
- Higgins CF (1991). Stability and degradation of mRNA. *Current Opinion in Cell Biology* 3: 1013-1018.
- Houde M, Belcaid M, Ouellet F, Danyluk J, Monroy AF, Dryanova A, Gulick P, Bergeron A, Laroche A, Links MG, MacCarthy L, Crosby WL, Sarhan F (2006). Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress. *BMC Genomics* 7: 149-155.
- Jones-Rhoades, MW, Bartel DP (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* 14: 787-799.
- Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) Gene Regulatory Mechanisms* 1819:137-148
- Kore-eda S, Cushman MA, Akselrod I, Bufford D, Fredrickson M, Clark E, Cushman JC (2004). Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Gene* 341: 83-92.
- MasoudiNejad A, Tonomura K, Kawashima S, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo T, Goto S (2006). EGAssembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Research* 34: W459-462.
- Mehta PA, Sivaprakash K, Parani M, Venkataraman G, Parida AK (2005). Generation and analysis of expressed sequence tags from the salt-tolerant mangrove species *Avicennia marina* (Forsk) Vierh. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 416-424.

- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436-439.
- Noctor G, Foyer CH (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Rhee SY, Dickerson J, Xu D (2006). Bioinformatics and its applications in plant biology. *Annual Review of Plant Biology* 57: 335-360.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12: 707-720.
- Richmond T, Somerville S (2000). Chasing the dream: plant EST microarrays. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 108-116.
- Romualdi C, Bortoluzz S, Dalessi F, Danieli GA (2003). IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiological Genomics* 12: 159-162.
- Sahi C, Singh A, Blumwald E, Grover A (2006). Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiologia Plantarum* 127: 1-9.
- Shamloo-dashtpajardi R (2009). Analysis of EST sequences of *triticum monoccocum*, the wild relative of bread wheat, to assign functional categories and analyse genes expression. M.S. thesis. Iran, Shiraz Univ.
- Shikanai T, Takeda T, Yamauchi H, Sano S, Tomizawa KI, Yokota A, Shigeoka S (1998). Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Letter* 428: 47-51.
- Smith B, Williams J, Schulze-Kremer S (2003). The ontology of the gene ontology. *AMIA Annual Symposium Proceedings* 13: 606-609.
- Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science* 17:196–203.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18: 2051-2065 .
- Sunkar R, Zhu JK (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2001-2019.
- Urano K, Kurihara Y, Seki M, Shinozaki K (2010). ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 132-138.
- Usadel B, Nagel A, Steinhauser D, Gibon Y, Bläsing OE, Redestig H, Sreenivasulu N, Krall L, Hannah MA, Poree F, Fernie AR, Stitt M (2006). PageMan: An interactive ontology tool to generate, display, and annotate overview graphs for profiling experiments. *BMC Bioinformatics* 7: 535.
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inze D, Sloaten L (1996). Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* 112: 1703-1714.
- Wang ZL, Li Ph, Fredricksen M, Gong Zz, Kim CS, Zhang C, Bohnert HJ, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM, Zhao Yx, Zhang H (2004). Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance. *Plant Science* 166: 609-616.
- Winter J, Diederichs S (2011). MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods in Molecular Biology* 676: 3-22.

- Zhang L, Ma XL, Zhang Q, Ma CL, Wang PP, Sun YF, Zhao YX, Zhang H (2001). Expressed sequence tags from a NaCl-treated *Suaeda salsa* cDNA library. *Gene* 267: 193-200.
- Zhuang J, Zhu B (2014). Analysis of *Brassica napus* ESTs: gene discovery and expression patterns of AP2/ERF-family transcription factors. *Molecular Biology Reports* 41: 45–56.
- Zhu JK (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124: 941-948.
- Zouari N, Ben Saad R, Legavre T, Azaza J, Sabau X, Jaoua M, Masmoudi K, Hassairi A. 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Gene* 404: 61-69.

Bioinformatics analyses of expressed sequence tags in Chinese spring wheat spikes under salt stress

Zinati Z.¹, Alemzadeh A.^{*2}, Ebrahimie E.³

¹ Assistant Professor of plant breeding, Agroecology Department, College of Agriculture and Natural Resources of Darab, Iran.

² Assistant Professor of biotechnology, Department of Crop Production and Plant Breeding, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

³ Assistant Professor of biotechnology, Institute of Biotechnology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Abstract

Functional genomics helps to understand the key mechanisms involved in salt stress tolerance and allows the possibility of targeted genetic manipulation to improve crop tolerance to salinity. The goal of this study was to identify new genes related to salt stress and functional analysis based on expressed sequence tags (EST). Therefore, two EST libraries under control and salt stressed conditions were downloaded from Harvard and Graingenes databanks. EGAssembler, NCBI BLAST, MaxPlanck and IDEG6 software tools were applied for clustering and assembling EST sequences, determination of proteins related to unigenes (contigs and singletons), functional categories and statistics test, respectively. Results showed that twenty functional categories are significantly different between control and stress conditions. Most of contigs and singletons fell into protein and RNA categories whereas CHO metabolism and TCA and organic transformation had the minimum of numbers of contigs and singletons in both control and salt stressed conditions. Percentage of unigenes in mitochondrial electron transport/ATP synthesis, Lipid metabolism, redox, protein, RNA, DNA, and cell categories were significantly higher in stress condition compared with control condition. Therefore, these functional categories could be involved in the mechanism of response to salt stress. Two hundred and seventy-one genes were differentially expressed that grouped into 23 functional categories. The wheat genes identified in this study can be considered as candidates genes to improve salt tolerance through genetic manipulation.

Key words: *Salt stress, Functional genomics, Spike.*

* Corresponding Author: Alemzadeh A. Tel: 07132286134

Email: alemzadeh@shirazu.ac.ir

