مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره پنجم، زمستان ۱۳۹۰

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

همسانه سازی و تعیین خصوصیات ژن زیر واحد c آنزیم H^+- ATPase واکوئلی در گیاه هالوفیت Aeluropus littoralis

نجمه نصیری[۱]، احسان شکری[۱]، قربانعلی نعمت زاده[۲*]

[۱] کارشناس ارشد اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ، ایران
[۲] استاد و محقق ارشد ژنتیک مولکولی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،ایران

چکیده

سابقه و هدف: مدیریت جذب، انتقال، تبادل و کده بندی کردن یون ها و تنظیم دقیق نسبت های یونی در گیاهان به واسطه فعالیت مجموعه ای از ناقل ها، حامل ها و کانال های یونی صورت می پذیرد. پمپ یونی H^+-ATPase واکوئلی، نقش مهّمی در ایجاد و حفظ شیب الکتروشیمیایی دارد و انتقال یون ها به داخل واکوئل سلول های گیاهی را تحت تأثیر قرار می دهد. فعالیت این پمپ باعث ایجاد نیروی محرکه پروتونی اولیه برای راه اندازی و تنظیم سایر ترانسپورترها، سیمپورترها و کانال های وابسته به H^+ مستقر در غشای واکوئل می شود. در این تحقیق بدلیل اهمیت آشکاری که این پمپ در زمینه بهبود مقاومت به شوری دارد، از گیاه تک لپه و شورزی Aeluropus littoralis به عنوان منبع ژن استفاده شد.

مواد و روش ها: یک کلون cDNA با طول کامل (۴۹۸ bp)، که حاوی اطلاعات لازم برای کد کردن زیر واحد (AlVHA-c) V- H^+ ATPase c می باشد از Aeluropus littoralis جداسازی و در باکتری E. coli همسانه سازی شد.

یافته ها: توالی نوکلئوتیدی این ژن (AlVHA-c)، همولوژی بسیار معنی داری با همتای خود در گونه های ارزن، برنج، گندم و ذرت نشان داد. همچنین آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی به منظور آشکارسازی روابط خویشاوندی و تکاملی و بررسی تفاوت های احتمالی با استفاده از توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی این ژن انجام شد. در نهایت توالی کامل ناحیه کد کننده در Genbank با شماره دسترسی (JF504672) ثبت شد.

نتیجه گیری: زیر واحد c، پمپ H^+-ATPase واکوئلی گیاه آلوروپوس نقش مهمی در فیزیولوژی پاسخ به تنش دارد.

کلمات کلیدی: پمپ پروتونی، زیر واحد c -H^+ ATPase واکوئلی

مقدمه

یکی از مشکلات رو به گسترش کشاورزی امروز که در حال حاضر تولید گیاهان زراعی را بشدت کاهش می دهد شوری منابع خاک و آب است (Chen et al., 2002). یون سدیم عمده ترین یون سمّی در خاک های شور می باشد و اغلب تنش های شوری در طبیعت به دلیل وجود یون سدیم، به ویژه نمک کلریدسدیم ایجاد می شود. شوری علاوه بر تنش اسمزی، منجر به ایجاد مشکل ویژه سمیت یونی، در نتیجه افزایش غلظت درون سلولی یون های مخرب سدیم و کلراید می شود. غلظت های بالای نمک فعالیت بسیاری از آنزیم ها را مهار می کنند. چراکه در چنین غلظت هایی سبب ایجاد عدم تعادل هیدروفوبیک- الکترواستاتیک بین نیروهای پایدار کننده ساختار پروتئین می گردند. (Birman et al., 1990). بنابراین برای تأمین تحمل به شوری سه جنبه به هم پیوسته از فعالیت گیاه شامل ممانعت از خسارت (سمیت زدایی)، استقرار مجدد شرایط هموستازی و از سر گیری رشد (کنترل رشد) حائز

آدرس نویسنده مسئول: پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
Email: gh.nematzadeh@sanru.ac.ir
تاریخ دریافت مقاله:۹۰/۰۸/۰۹
تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۵

اهمیت است (Massayoshi, 2000). در حال حاضر مشخص شده است که تنظیم دقیق نرخ خالص جذب یون های سدیم، کلر، پتاسیم و توزیع آن ها در درون گیاه از ویژگی های اساسی گیاهان شورزی است. به طوری که این پدیده در گیاهان گلیکوفیت ناکافی بوده و یا اصلاً وجود ندارد (Kasuga et al., 2000). مدیریت جذب، انتقال، تبادل و کد بندی کردن یون ها و تنظیم نسبت های یونی مختلف بویژه نسبت K^+/Na^+ در گیاهان هالوفیت به واسطه فعالیت مجموعه ای از ناقل ها، حامل ها و کانال های یونی صورت می پذیرد. در بین ناقل های مختلف یونی، پمپ های پروتونی از جایگاه ویژه ای برخوردار هستند، زیرا فعالیت این پمپ ها باعث ایجاد نیروی محرکه پروتونی اولیه برای راه اندازی و تنظیم سایر ترانسپورترها، سیمپورترها و کانال های وابسته به H^+ می شود. پمپ های پروتونی با هیدرولیز ATP و پمپ نمودن پروتون، موجب اسیدی شدن ارگانل های سلولی و ایجاد شیب پتانسیل الکتروشیمیایی لازم برای فعالیت سیستم های انتقال فعال ثانویه می شوند (Forgac et al., 2007). پمپ H^+-ATPase واکوئلی از لحاظ تعداد و ترکیب زیر واحد های سازنده پیچیده ترین پمپ پروتونی محسوب می شود. این پمپ یک کمپلکس چند زیر واحدی است که بخشی از آن در داخل غشاء و بخش دیگر سیتوپلاسمی می باشد. ناحیه سیتوپلاسمی، حداقل از هشت زیر واحد تشکیل شده است و در هیدرولیز ATP نقش دارد و ناحیه غشایی در انتقال پروتون از خلال غشاء نقش دارد. زیرواحدهای (A–H) و (c, c΄, c˝, a and d) به ترتیب اجزاء سیتوپلاسمی و غشایی این پمپ را تشکیل می دهند. عمده ترین زیر واحد در جزء غشایی این پمپ، پلی پپتیدی با وزن مولکولی ۱۶ کیلو دالتون است که تحت عنوان زیر واحد c معرفی شده است (Tester and Davenport et al., 2003). ژن کد کننده این پلی پپتید تا کنون از برخی گیاهان، قارچ ها، پستانداران، مهره داران و غیره کلون شده است (Tsiantis et al., 1996; Wei et al., 2001; Zhang et al., 1994; Zhu et al., 2001). این پروتئین غشایی در موجودات به شدت حفاظت شده، به طوری که همولوژی بیش از ۶۵ درصد بین تمام گونه ها مشاهده می شود. از خصوصیات عمومی پروتئین زیر واحد c، وجود چهار منطقه ترانس ممبران و حضور گلوتامیک اسید حفظ شده در چهارمین ناحیه ترانس ممبرانی می باشد. گلوتامیک اسید جایگاه اتصال به پروتون هایی است که بایستی منتقل شوند (Santoni et al., 1999; Ratajczak et al., 2000). تحقیقات اخیر نشان داده اند که تنش شوری باعث تغییر در سطح رو نوشت زیر واحدهای مختلف این پمپ می شود. به عنوان مثال افزایش در بیان زیر واحدهای A و B در چغندر قند و افزایش در سطح رونوشت زیر واحد c در هالوفیت (M. Crystallinum (Munns, 2002 و گیاه Tortula ruralis (Morsomme and Boutry, 2000)، تحت تنش شوری گزارش شده است. با این حال همچنان دانش اندکی در خصوص نحوه عمل و تغییرات زیر واحدهای سازنده این پمپ در اثر تنش های مختلف محیطی و ارتباط آن با شبکه پیچیده انتقال پیام در گیاهان بویژه در شرایط تنش شوری وجود دارد. بدیهی است که کاربرد بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان زراعی نیاز به منابع پایه ژنتیکی برای تحمل به شوری و پایداری عملکرد دارد (Chen et al., 2002). لذا اجرای راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی در تأمین این هدف نیازمند انجام تحقیقات گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به شوری و عوامل تنظیم کننده آن در طی دوره تنش می باشد. با توجه به این که تحمل گیاهان شورزی نسبت به تنش شوری از گلیکوفیت ها و گیاهان خویشاوند زراعی بیشتر است، این گیاهان می توانند به عنوان مدل های طبیعی الهام بخش بهنژدای مولکولی در سایر گیاهان استراتژیک باشند. یکی از هالوفیت های مورد توجه، گیاه تک لپه Aeluropus littoralis است. این گیاه به عنوان یکی از هالوفیت های بومی ایران که در اراضی شور نواحی خشک و نیمه خشک کشور متکامل شده است، دارای جنبه های بیولوژیک بسیار ارزشمندی است و می تواند به عنوان یک مخزن ژنی در اصلاح گیاهان تک لپه همچون برنج و گندم مورد استفاده قرار گیرد، لذا دستاورد این تحقیق می تواند به پیشرفت برنامه به نژدای شوری در گیاهان استراتژیک و زراعی کمک کند.

مواد و روش ها

تهیه مواد گیاهی: به منظور تهیه مواد اولیه گیاهی مورد نیاز در این تحقیق، بذرهای گیاه A.littoralis، پس از انجام بررسی های

گیاه شناسی و تأیید گونه، از رویش گاه های طبیعی آن در مناطق شمالی کشور (استان مازندران) جمع آوری و به گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، منتقل گردید. پس از انجام ضد عفونی سطحی بذرها در ماسه شسته کشت گردیدند. ۴۵ روز پس از کشت به منظور افزایش سطح ترانسکریپتوم پاسخ دهنده به شوری در گیاه، تیمار شوری ۴۰۰ میلی مولار نمک کلریدسدیم به مدت ۱۴ روز اعمال شد و سپس برگ های گیاه جهت استخراج RNA برداشت گردید.

طراحی آغازگرها

طراحی آغازگرهای دجنره با استفاده از نرم افزار پرایمر Primeir 5 و با استفاده از اطلاعات بدست آمده از همردیفی چند گانه برای ژن مورد نظر در گونه های Oryza sativa Avena sativa و Pennisetum glaucum انجام گردید. توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز به صورت زیر می باشد:

Fvhac: 5-ATGTCGTCGGTGTTCAGC -3

Rvhac: 5- CTAATC(T/G)GCACG(A/G)GATTG-3

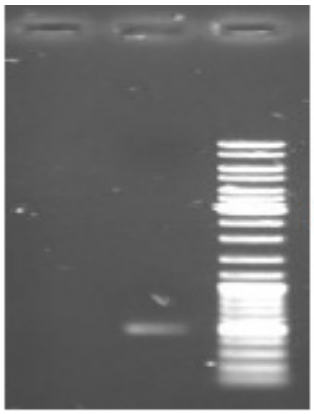
استخراج RNA، ساخت cDNA و تکثیر ژن AlVHA-c

استخراج RNA به روش ترایزول با اندکی تغییرات انجام شد. بدین منظور ۲۰۰ میلی گرم بافت برگی تازه در ازت مایع ساییده شد و پودر بدست آمده در ۱ میلی لیتر ماده تجاری ترایزول همگن گردید. سپس با افزودن کلروفورم فاز آبی که حاوی RNA کل می باشد از فاز آلی جداسازی شد و با استفاده از اتانول رسوب داده شد. ارزیابی غلظت و کیفیت RNA بدست آمده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و ژل آگاروز انجام شد. سپس جهت ساخت cDNA، واکنش نسخه برداری معکوس با استفاده از آنزیم M-Mulv Reverse transcriptas (شرکت Fermentas) و آغازگر برگشت انجام گردید. cDNA سنتز شده، به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلیمراز، جهت سنتز DNA دو رشته ای و تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای (Rvhac و Fvhac) و آنزیم Pfu polymerase (تاکارای ژاپن) استفاده شد. شرایط این تکثیر شامل: واسرشت اولیه ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه بصورت واسرشت سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای ۵۵/۳ درجه و بسط ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه و نهایتاً بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. نوار ۵۰۰bp بدست آمده با استفاده از کیت استخراج DNA از روی ژل شرکت Roche، جداسازی و در وکتور pTZ57R/T طبق دستورالعمل کیت InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) در باکتری E. coli کلون شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از باکتری بر روی محیط گزینش حاوی X-gal، IPTG و آنتی بیوتیک آمپی-سیلین به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ کشت گردید. پس از ظهور کلنی ها، استخراج پلاسمید با استفاده از روش مینی پرپ از کلنی های سفید انجام شد. در این روش با استفاده از بافر (گلوکز، EDTA وTris-Hcl با pH=۸) دیواره سلولی باکتری به صورت قلیایی لیز شد. سپس محلول دناتوره کننده (حاوی NaOH و SDS) اضافه گردید و در نهایت با استفاده محلول فنل/کلروفورم/ ایزوآمیل الکل، فاز آبی حاوی پلاسمید جداسازی و با استفاده از اتانول رسوب داده شد. تعیین توالی به روش تمام اتوماتیک فلورسانس و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گردید. آنالیزهای بیوانفورماتیکی درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbour joining، توسط نرم افزار MEGA 4 و آنالیز ساختار ثانویه به روش Kyte and Doolittle و به صورت آنلاین توسط برنامه Genetyx-Mac سرور www.expasy.org صورت پذیرفت. بازبینی قطعه توالی یابی شده با نرم افزار Chromas و شناسایی ORF، همردیفی های چندگانه و آنالیز توالی DNA و پروتئین با استفاده از نرم افزار DNASISMAX و همچنین برنامه BLAST پایگاه ژن NCBI انجام گردید.

یافته ها

واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای دجنره و نمونه cDNA برگ بعنوان الگو منجر به تکثیر قطعه ای با اندازه مورد انتظار (۵۰۰ bp) گردید (شکل۱). قطعه DNA بدست آمده پس از همسانه سازی تعیین توالی شد. پس از آنالیز نتایج توالی یابی، وجود یک ناحیه ORF به طول ۴۹۸ bp با کدون خاتمه TAG در قطعه توالی یابی شده تأیید گردید. هم چنین مشخص شد که توالی پروتئینی در این ژن دارای ۱۶۵ اسید آمینه با وزن مولکولی ۱۶۶۵ دالتون می باشد.

نتایج آنالیز هم ردیفی با استفاده از امکانات برنامه BLAST پایگاه ژن NCBI در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی نشان داد که ژن مورد بررسی، همولوژی بالایی در سطح DNA و اسید آمینه با سایر ژن های همتای خود در گونه های گیاهی دیگر دارد. بر این اساس در سطح نوکلئوتیدی ۹۱ درصد همسانی با گونه های Oryza sativa، Pennisetum glaucum و Porteresia coarctata مشاهده گردید (جدول ۱). در سطح پروتئینی ۹۹ درصد تشابه با Avena sativa و ۹۸ درصد تشابه با گونه های Brachypodium distachyon، O. sativa (جدول ۲).



شکل ۱- تکثیر DNA با طول مورد انتظار ۵۰۰bp ، مربوط به ناحیه کد کننده زیرواحد c ژن H-ATPase واکوئلی با استفاده از پرایمرهای ویژه و نمونه برگ در گیاه Aeluropus littoralis، نشانگر مولکولی مورد استفاده GeneRuler DNA Ladder Mix شرکت فرمنتاز با شماره تجاری (SM0333) می باشد.

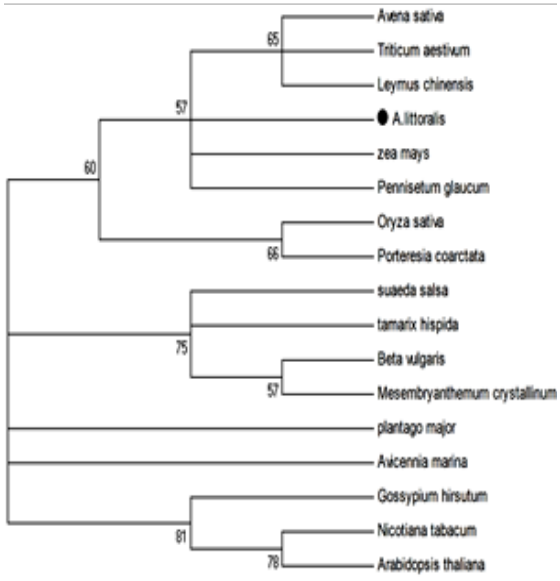
جدول۱- نتیجه بلاست توالی نوکلئوتیدی ژن AlVHA-c با سایر گونه ها

نام گونه	نام ژن	میزان پوشش	Eارزش	درصد همسانی
Pennisetum glaucum	vha-c	٪۱۰۰	۰	٪ ۹۱
Oryza sativa	vha-c	٪۱۰۰	۰	٪ ۹۱
Brachypodium distachyon	vha-c	٪۱۰۰	$۳ e^{-۱۷۶}$	٪ ۸۹
Triticum aestivum	vha-c	٪۱۰۰	$۱ e^{-۱۷۶}$	٪ ۸۹
Avena sativa	vha-c	٪۱۰۰	$۱ e^{-۱۷۴}$	٪ ۸۹
Lymus chinensis	vha-c	٪۱۰۰	$۳ e^{-۱۷۱}$	٪ ۸۹
Zea mays	vha-c	٪۱۰۰	$۱ e^{-۱۶۹}$	٪ ۸۹
Porteresia coarctata	vha-c	٪۹۹	۰	٪ ۹۱

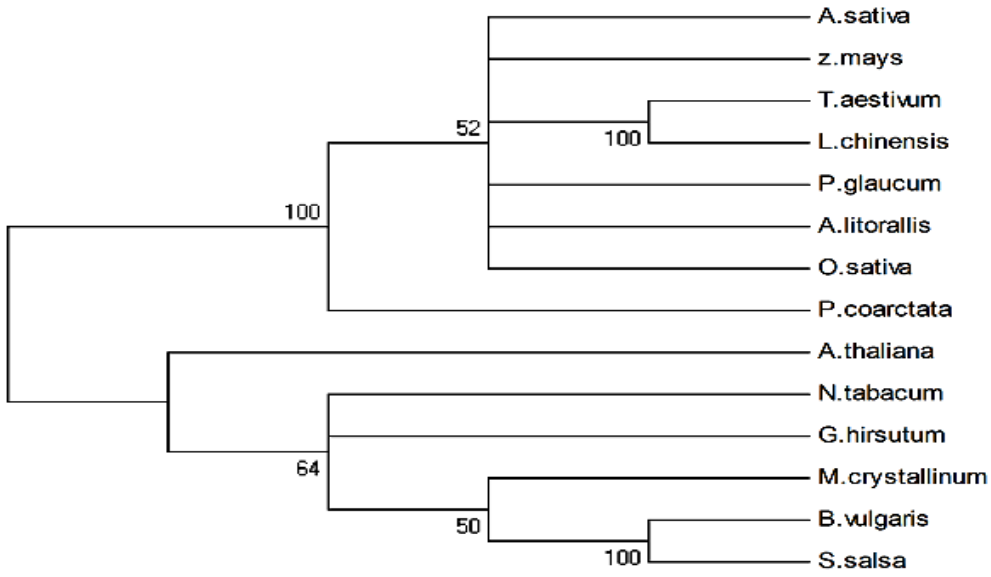
جدول۲ - نتیجه بلاست توالی آمینواسیدی ژن AlVHA-c با سایر گونه ها

نام گونه	نام ژن	میزان پوشش	Eارزش	درصد همسانی
Avena sativa	vha-c	٪۱۰۰	$۴e^{-۱۰۹}$	٪۹۹
Oryza sativa	hypotical protein similar to vha-c	٪۱۰۰	$۵e^{-۱۰۹}$	٪۹۸
Brachypodium distachyon	vha-c	٪۱۰۰	$۱e^{-۱۰۸}$	٪۹۸
Plant major	vha-c	٪۱۰۰	$۳e^{-۱۰۸}$	٪۹۸
Kalanchoe daigremon-tiana	vha-c	٪۱۰۰	$۱e^{-۱۰۷}$	٪۹۸
Citrus unshiu	vha-c	٪۱۰۰	$۱e^{-۱۰۷}$	٪۹۸
Mesembryanthemum crystallinum	vha-c	٪۱۰۰	$۲e^{-۱۰۷}$	٪۹۷
Avicennia marina	vha-c	٪۱۰۰	$۱e^{-۱۰۶}$	٪۹۷
Arabidopsis thaliana	vha-c	٪۹۹	$۲e^{-۱۰۵}$	٪۹۷
Suaeda salsa	vha-c	٪۹۸	$۱e^{-۱۰۵}$	٪۹۷

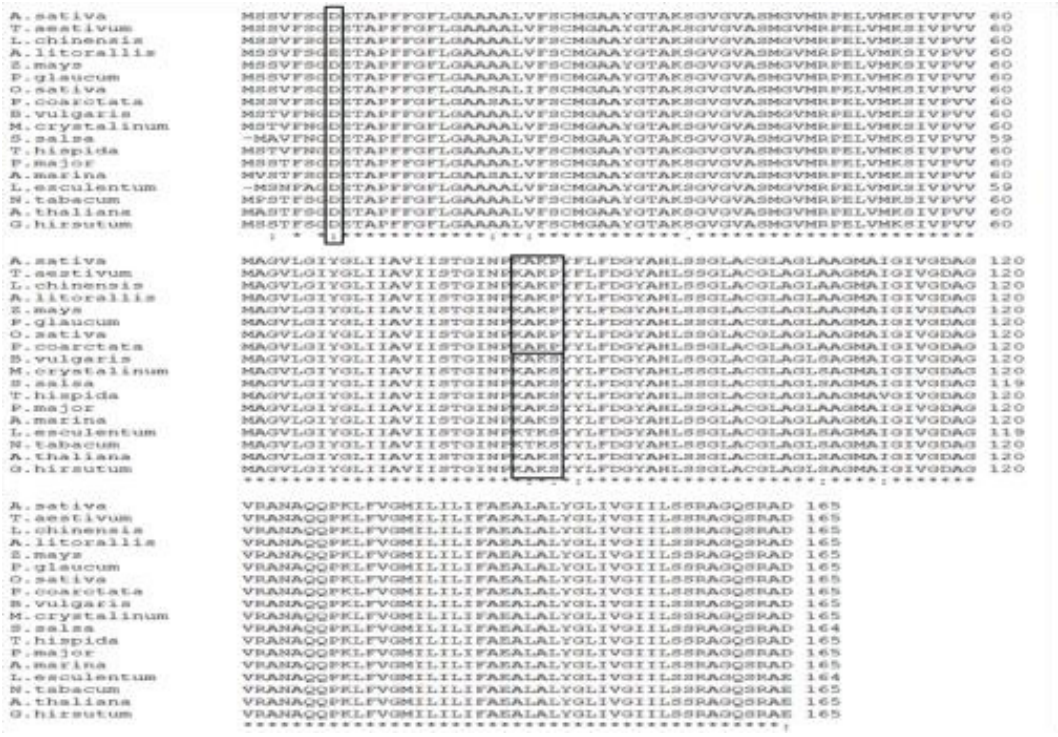
همچنین به منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی و تکاملی، آنالیز کلاستر توالی آمینواسیدی (شکل۲) و نوکلئوتیدی (شکل۳) با سایر گونه ها انجام شد. بر این اساس مشخص شد، ژن مورد بررسی ارتباط نزدیکی با ژن های همتای خود در گونه های تک لپه دارد و از گونه های حساس به شوری و هالوفیت های دو لپه مجزا می شود. مقایسه توالی پروتئینی با سایر توالی ها همچنین نشان داد، جایگزینی اسید آسپارتیک با گلوتامیک در موقعیت اسید آمینه هشتم، در هالوفیت Aeluropus littorali یک جایگزینی منحصر به فرد است که در سایر گونه ها دیده نمی شود. جایگاه فسفریله شدن که در گیاهان تک لپه بصورت KAKP می باشد شناسایی شد (شکل۴). در نهایت با بررسی ساختار ثانویه در توالی آمینواسیدی مشخص شد که در پلی پپتید مورد بررسی، ۴ ناحیه ترانس ممبران مورد انتظار وجود دارد و اسید آمینه گلوتامیک در موقعیت ۱۴۲ و در چهارمین ناحیه ترانس ممبرانی واقع شده است (شکل۵).



شکل۲- درخت فیلوژنتیکی توالی پروتئینی زیرواحد c ژن H^+-ATPase واکوئلی هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس با گونه های گیاهی مختلف با استفاده از نرم افزار MEGA 4 به روش Neighbour joining. پارامتر تکرار در ترسیم درخت معادل ۱۰۰۰ در نظر گرفته شد.

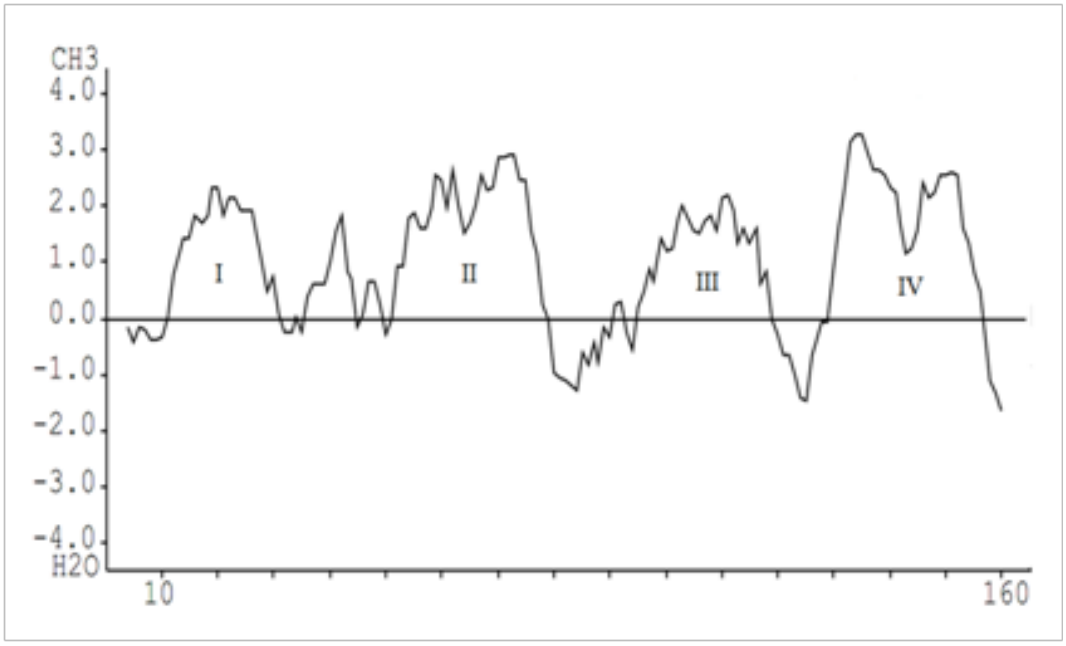


شکل۳- درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی زیرواحد c ژن H^+-ATPase واکوئلی هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس با گونه های گیاهی مختلف با استفاده از نرم افزار MEGA4 به روش Neighbour joining. پارامتر تکرار در ترسیم درخت معادل ۱۰۰۰ در نظر گرفته شد.



شکل۴-همردیفی مقایسه ای توالی آمینواسیدی زیرواحد c ژن H^+-ATPase واکوئلی گیاه آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از برنامه .clustal w توالی آمینو اسیدی گونه های مورد مقایسه شامل:

O. sativa (Q40635); A. sativa (P23957); M. crystallinum (Q39437); G.hirsutum (Q43434, AAA82977), A. thaliana (Q39039, AAA99934); N. tabacum (Q40585, CAA65063); L. esculentum (O24011); Pennisetum glaucum(AF416606); Porteresia coarctata (AF286464); Triticum aestivum (DQ631550); Leymus chinensis (GQ397276); Suaeda salsa (AAP15165); Avicennia marina (AAK01292); Tamarix hispida (ACX50967); Plantago major (CAH58637); Zea mays (NP-001149195); Beta vulgaris (AJ002061).



شکل۵- نمودار هیدروفوبوسیتی توالی آمینواسیدی زیرواحد c ژن H^+-ATPase واکوئلی در گیاه Aeluropus littoralis به روش (Kyte & Doolittle) با استفاده از برنامه Genetyx-Mac . محل چهار ناحیه ترانس ممبران (I,II,III,IV) در شکل نمایش داده شده است.

بحث

برنامه تکامل در گیاهان هالوفیت، به نحوی پیشرفته است که پس از گذشت سالیان متمادی، این گیاهان اکنون از توانمندی قابل توجهی برای تنظیم نسبت های یونی در شرایط تنش شوری برخوردار هستند. Aeluropus littoralis به عنوان یک گیاه شورزی در مواجه با تنش شوری قادر است با حفظ نسبت مطلوب K^+/Na^+ در سیتوپلاسم، ماشین متابولیکی سلول را تا حد ممکن از اثرات سوء یون های سدیم و کلر محافظت کند. جلوگیری از ورود یون، دفع یون و کده بندی کردن یون در واکوئل، توانایی انباشت عناصر ضروری بویژه پتاسیم در حضور غلظت های بالای یون سدیم و تنظیم دقیق میزان تعرق، تنفس و فتوسنتز مکانیسم هایی هستند که در مدیریت نسبت مطلوب K^+/Na^+ در سیتوپلاسم سلول های این گیاه تأثیر گذار هستند. در این میان کده بندی و انباشت یون سدیم در واکوئل از اهمیت خاصی برخوردار است و به واسطه فعالیت مجموعه ای از کانال های یونی و ترانسپورترها انجام می شود. فعالیت پمپ های پروتونی بویژه پمپ H^+-ATPase واکوئلی باعث ایجاد شیب الکتروشیمیایی لازم برای ورود یون ها به داخل واکوئل می شود. لذا مطالعه عملکرد این پمپ در گیاهان هالوفیت و مقایسه روند تکاملی در آن با گونه های حساس به شوری و گلیکوفیت ها، می تواند در آتیه تحقیقات مقاوم سازی گیاهان زراعی به شوری حائز اهمیت باشد. اما اختصاصاً مشکلی که در مورد پمپ H^+-ATPase واکوئلی وجود دارد، پیچیدگی ساختاری و تعدد زیر واحدهای تشکیل دهنده آن است. تحقیقات مختلفی نشان داده اند که سطح بیان این اجزاء در سطح پروتئین و mRNA در اثر تنش های محیطی و از جمله شوری تغییر می کند. در این تحقیق گیاه Aeluropus littoralis به علت قابلیت بالایی که در مدیریت یون در شرایط شوری دارد به عنوان منبع ژنی برای جداسازی و کلونینگ ژن کد کننده زیر واحد c انتخاب گردید. سپس بر اساس آنالیزهای بیوانفورماتیکی مختلف (بلاست پروتئین، بلاست نوکلئوتید، درخت فیلوژنتیکی و همردیفی مقایسه ای) مشخص شد، قطعه کلون شده از این گیاه همولوژی بسیار بالایی با سایر ژن های همتای خود در سایر گونه ها دارد. در همین رابطه بر اساس نتایج بدست آمده از ترسیم درخت فیلوژنتیکی در سطح پروتئین و نوکلئوتید مشخص شد توالی پروتئینی و نوکلئوتیدی ژن AlVHA-c از نظر تکاملی به گیاهان تک لپه

مخصوصا گونه های C4، ذرت و ارزن نزدیک تر است و از گونه های دولپه و حساس به شوری فاصله دارد. هم چنین نتایج حاصل از هم ردیفی مقایسه ای توالی های پروتئینی نشان داد که تمام خصوصیات عمومی پروتئین های همولوگ زیر واحد c از جمله نواحی ترانس ممبران، اسید آمینه گلوتامیک ۱۴۲ و جایگاه فسفوریلاسیون (KAKP) در AlVHA-c نیز وجود دارد. هم چنین در توالی پروتئینی، هیچ گونه تغییر آمینواسیدی معنی داری که ساختمان یا عملکرد پروتئین را مختل کند در مقایسه با سایر گونه های مطالعه شده، وجود نداشت. نکته تازه در خصوص توالی بدست آمده، جایگزینی گلوتامیک اسید با آسپارتیک در موقعیت اسید آمینه هشتم می باشد که منحصراً در گیاه Aeluropus littoralis مشاهده می شود و سابقه آن در سایر توالی های مورد بررسی دیده نمی شود. اگرچه گلوتامیک و آسپارتیک هر دو اسید های آمینه قطبی هستند و از لحاظ ساختمانی مشابه اند و جایگزینی آن ها با هم اتفاق معمولی است اما به دو دلیل پیشنهاد می شود بررسی های بیشتری در این مورد صورت پذیرد. اولاً هر تغییری که سابقه قبلی برای آن دیده نمی شود، به ویژه در مورد پروتئینی که طبیعت بسیار حفاظت شده ای در ارگانیزم های گیاهی، قارچی و جانوری مختلف دارد می تواند حائز اهمیت باشد و ثانیاً با توجه به نقشی کلیدی که اسید آمینه گلوتامیک ۱۴۲ در این پروتئین ها، به عنوان جایگاه اتصال پروتون و به عنوان جایگاه تنظیم عمل پروتئین دارد، این احتمال بایستی مورد بررسی قرار گیرد که آیا جایگزینی آسپارتیک اسید با گلوتامیک می تواند تأثیر معنی داری در میزان فعالیت این زیرواحد بگذارد و در نهایت، قابلیت ویژه ای به کل پمپ واکوئلی در گیاه شورزی آلوروپوس لیتورالیس ببخشد در هر صورت دستاورد تحقیق حاضر، امکان مطالعه بیشتر برای پاسخ دادن به سوالات موجود و درک بهتر عمل پمپ H^+-ATPase واکوئلی را فراهم می کند و پس از بررسی های بیشتر می تواند کاندیدی برای انتقال ژن به گیاهان حساس باشد.

تشکر و قدردانی

از حمایت های مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، در تأمین هزینه های این تحقیق سپاسگزاری می شود.

منابع

Birman S, Meunier F, Lesbats B, LeCaer J, Rossier J , Israel M. A 15 kDa proteolipid found in mediatophore prepa rations from Torpedo electric organ presents high sequence homology with the bovine chromaffin granule protonop hore. FEBS Lett, 1990; 261: 303-306.

Chen X, Kanokporn T, Zeng Q, Wilkins TA , Wood AJ. Characterization of the V-H+ -ATPase in the resurrection plant Tortula ruralis: accumulation and polysomal. J Exp Bot, 2002; 53: 367-372.

Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007; 8: 917-929.

Kasuga M, Liu G, Miura S, Yamaguchi-Shnozaki K, Shinozaki k. Improving plant drought, salt., and freezing tole rance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nat Biotechnolo, 2000; 17: 287-291.

Massayoshi M. Vacular H+-Pyrophosphate. Biochem Biophys, 2000; 108:1-6.

Morsomme P, Boutry M. The plant plasma membrane H+-ATPase: structure, function and regulation. Biochim Biophys Acta, 2000; 1465:1–16.

Munns R. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ, 2002; 25: 239-250.

Ratajczak R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H+ -translocating ATPase. Biochim. Biophys Acta, 2000; 1465:17–36.

Santoni V, Doumas P, Rouquie D, Manison M, Rabilloud T, Rossingol M. Large-scale characterization of plant plasma membrane proteins. Biochemie, 1999; 81: 655-661.

Tester M, Davenport R. Na+ tolerance and Na+ transport in higher plants. Annals Bot, 2003; 91: 503-527.

Tsiantis MS, Bartholomew DM, Smith JAC. Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H^+-ATPase in the halophyte Mesembryanthemum crystallinum. Plant J, 1996; 9 (5): 729-736.

Wei Y, Guangmin X, Daying Z, Huimin C. Transfer of salt tolerance from Aeluropus littoralis sinensis to wheat (Triticum aestivum L.) via asymmetric somatic hybridization. Plant Sci, 2001; 161: 259-266.

Zhang J, Feng Y, Forgac M. Proton conduction and bafilomycin binding by the V0 domain of the coated vesicle V-ATPase. J Biol Chem, 1994; 269: 23518–23523.

Zhu JK. Plant salt tolerance. Trends in plant science, 2001; 6: 666-701.