مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۴۱-۲۹)

بررسی بیان ژن‌های جو در پاسخ به تنش اسمزی با استفاده از فن‌آوری درشت‌آرایه

حسینعلی رامشینی[۱]، علی اکبر شاه نجات بوشهری[۲]، سید علی پیغمبری[۳]*، منصور امیدی[۴] و پاتریک شوایزر[۵]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق دکتری، دانشیاران و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۵، استاد موسسه تحقیقات IPK، آلمان
(تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱۵- تاریخ تصویب: ۸۸/۳/۲۴)

چکیده

جو (*Hordeum vulgare* L.) گیاهی مدل برای بررسی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی است. تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، رشد و توسعه گیاه را کاهش می‌دهند. هدف این آزمایش شناسایی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی با استفاده از فن‌آوری درشت‌آرایه (دارای ۱۳۰۵۰ cDNA) بود. در این آزمایش از برگ ۵ ژنوتیپ جو در دو شرایط تنش و بدون تنش و در سه زمان ۱، ۳ و ۷ روز پس از اعمال تنش RNA استخراج شد. پس از اندازه‌گیری بیان ژن‌ها و تجزیه واریانس داده‌ها، اثر شرایط در ۷٤٤ ژن معنی‌دار بود. تجزیهٔ مولفه‌های اصلی بر روی ماتریس اثر برهمکنش ژن × شرایط نشان داد ژن‌هایی که در متابولیسم چربی، مسیر پاسخ به تنش و متابولیسم اسید آمینه فعال هستند، در این آزمایش به تنش پاسخ داده‌اند. با انجام این تجزیه بر روی ماتریس اثر برهمکنش ژن× شرایط × ژنوتیپ و اثر برهمکنش ژن × شرایط × زمان ژن‌های به دست آمده بیشتر مربوط به تنش، متابولیسم هورمون و متابولیسم اسید آمینه بودند. پرتعدادترین گروه‌های ژنی پاسخ‌دهنده به تنش مربوط به ژن‌های دی‌هایدرین و پروتئین‌های انتقال دهنده لیپید بودند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش اسمزی، جو، ژن‌های پاسخ‌دهنده و درشت‌آرایه.

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) گیاهی مدل برای مطالعات ژنتیکی و فیزیولوژیکی است و سازگاری بالایی در شرایط مختلف نشان می‌دهد (Diab et al., 2004). این گیاه دارای مقاومت نسبی به تنش خشکی بوده (Ozturk et al., 2002) و در کشور ما از اهمیت خاصی برخوردار است. تنش‌های غیرزیستی محیطی مانند خشکی، گرما و شوری، رشد و توسعه این گیاه را کاهش می‌دهند. دسترسی به آب یکی از مهم‌ترین عواملی است که تولید محصولات کشاورزی را در سراسر دنیا تحت تاثیر قرار می‌دهد(Andjelkovic & Thompson, 2006). پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی محور اصلی بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی بوده است (Abraham et al., 2004).

مطالعات اخیر بیشتر در سطح مولکولی پاسخ به تنش را بررسی کرده که شامل مطالعه بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش، استفاده از نشانگرهای مولکولی و یا استفاده از گیاهان تراریخت بوده است (Andjelkovic & Thompson, 2006; Babu et al., 2004; Forster et al., 2000; Ozturk et al., 2002; Talame et al., 2007). توسعه کتابخانه‌های cDNA[۱] و EST[۲] این امکان را فراهم کرده تا بتوان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های

1. Complementary DNA
2. Expression Sequence Tag

* نویسنده مسئول: سید علی پیغمبری تلفن: ۰۹۱۲-۵۱۰۱۳۶۸ E-mail: alipey@ut.ac.ir

زیستی و غیرزیستی را بهتر بررسی کرد (Andjelkovic & Thompson, 2006; Talame et al., 2007; Tommasini et al., 2008). کاربرد مهم این‌گونه مطالعات به شناسایی ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی مربوط می‌شود که ممکن است بتوان برای آنها کارکردی مهم مانند تاثیر بر مقاومت یا دفاع در برابر تنش پیدا کرد. ابزارهای جدید و توانایی مانند درشت آرایه[1] یا ریزآرایه[2] DNA، تجزیه سریع و هم‌زمان هزاران ژن را ممکن می‌سازند (Andjelkovic & Thompson, 2006). در درشت‌آرایه، cDNA تکثیر شده بر روی غشاهایی قرار می‌گیرند که از نایلون ساخته شده‌اند. رنگ‌آمیزی با رادیوایزوتوپ‌ها صورت می‌گیرد و ابعاد غشاها در حدود ۱۲×۸ سانتیمتر است در حالی که در ریزآرایه از اسلایدهای شیشه‌ای استفاده می‌شود، رنگ‌آمیزی با رنگ‌های فلوئورسانس انجام می‌گیرد و ابعاد اسلایدها کوچک‌تر است (Andjelkovic & Thompson, 2006). با طراحی و تجزیه‌های آماری مناسب در چنین آزمایش‌هایی می‌توان نتایج قابل قبولی به دست آورد، به طوری که بر اساس این داده‌ها تا کنون اطلاعات جالبی در مورد بسیاری از فرآیندهایی که در گیاه اتفاق می‌افتد مانند روند انتقال علائم[3]، پاسخ به تنش خشکی و رویان‌زایی بدنی[4] به دست آمده است (Sreenivasulu et al., 2006; Zeng et al., 2006; Zheng et al., 2004).

تلاش‌های مختلفی در زمینه به‌نژادی برای مقاومت به خشکی در مورد گیاه جو انجام شده است. همچنین مطالعاتی در مورد ژن‌هایی که به خشکی پاسخ می‌دهند مانند ژن‌های دیهایدرین[5] یا آب‌گیری انجام گرفته است (Tama´s et al., 2006). این مطالعات نشان می‌دهند که بعضی از این ژن‌ها در حفاظت گیاه در برابر تنش خشکی نقش دارند. مشخص شده که پلی‌اتیلن گلیکول[6] ماده مناسبی برای شبیه‌سازی تنش خشکی بوده و تاثیر خشکی و پلی‌اتیلن گلیکول بر گیاهچه‌ها یکسان بوده است به‌طوری‌که بین ژن‌هایی که به خشکی و به پلی‌اتیلن گلیکول پاسخ داده‌اند همسانی بسیار بالایی وجود داشته است (Zheng et al., 2004). تاثیر تنش بر گیاه در زمان‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد، به طوریکه ژن‌های بیان شده در مراحل ابتدایی تنش با ژن‌هایی که در اثر تداوم تنش بیان می‌شوند کم و بیش متفاوت هستند (Talame et al., 2007). بررسی پاسخ ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به تنش اسمزی از نظر بیان ژن‌ها در فهم ساز و کارهای مختلف برای مقاومت به تنش به ما کمک خواهد کرد و می‌توان در مورد ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش بهترین ژن‌ها را در ژنوتیپ‌های مختلف شناسایی کرد. در تحقیقاتی که تاکنون در این زمینه انجام شده، تنها از ژنوتیپ‌های مقاوم استفاده شده است و تعداد ژنوتیپ‌ها به یک ژنوتیپ محدود بوده است (Ozturk et al., 2002; Talame et al., 2007; Tommasini et al., 2008; Xue et al., 2008).

اهدف این آزمایش عبارت بودند از: شناسایی ژن‌هایی که به تنش اسمزی پاسخ می‌دهند یا در بیان آنها اثر برهمکنش ژنوتیپ در محیط و یا اثر برهمکنش شرایط در زمان دیده می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

این آزمایش به صورت عاملی در سه تکرار انجام گرفت. به دلیل اینکه هر بار تنها یک تکرار در اتاقک رشد کشت می‌شد و تکرارها از نظر زمانی از همدیگر حدود یک ماه فاصله داشتند، بنابراین هر تکرار به عنوان یک بلوک در نظر گرفته شده و برای تجزیه داده‌ها از طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی استفاده شد. تمام مراحل آزمایش در موسسه تحقیقات IPK[7] کشور آلمان انجام گرفت. عوامل آزمایش شامل ژنوتیپ (۵ ژنوتیپ)، شرایط (شرایط نرمال و تنش ۱۵ درصد پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰) و زمان استخراج RNA (۱، ۳ و ۷ روز پس از اعمال تنش) بودند و چنانکه ذکر شد آزمایش دارای ۳ تکرار بیولوژیکی بود. ۵ ژنوتیپ جو با نام‌های

1. Macroarray
2. Microarray
3. Signal transduction
4. Somatic embryogenesis
5. Dehydrin
6. Poly Ethylene Glycol(PEG)
7. Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)

داری ۶-۸۳[1] ، ال۵۲۷[2]، ای‌سی ۱۰-۷۹[3]، نیوتانس[4] و ارکتوم[5] در این آزمایش استفاده شدند. سه ژنوتیپ داری۶-۸۳، ال۵۲۷ و ای‌سی۱۰-۷۹ ایرانی بودند و از موسسه تحقیقات دیم کشور، واحد مراغه تهیه شدند و دو ژنوتیپ نیوتانس و ارکتوم که منشا بریتانیایی داشتند از موسسه IPK آلمان تهیه شدند. در آزمایشی که قبلاً انجام دادیم ۳ ژنوتیپ اول مقاوم و ۲ ژنوتیپ موسسه IPK حساس به تنش اسمزی بودند (Ramshini et al., 2009) بذرهای این ۵ ژنوتیپ برای جوانه‌زنی در آزمایشگاه کشت شدند. پس از ۳ روز گیاهچه‌ها به جعبه‌های حاوی محلول غذایی هوگلند[6] ۵۰ درصد برای برای استقرار منتقل شدند. هر جعبه دارای ۴ واحد آزمایشی بود و در هر واحد ۱۵ گیاهچه قرار می‌گرفتند. این جعبه‌ها بعداً در اتاقک رشد (۲۲ درجه در روز و ۲۰ درجه در شب، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار داده شدند. پس از ۵ روز گیاهچه‌ها به جعبه‌های حاوی محلول هوگلند ۱۰۰ درصد (برای شرایط کنترل) و محلول هوگلند ۱۰۰ درصد که دارای ۱۵ درصد (حجم/وزن) PEG بود (برای شرایط تنش) منتقل شدند. استخراج RNA ۱، ۳ و ۷ روز پس از اعمال تنش انجام گرفت. برای هر واحد آزمایشی از تمام ۱۵ گیاه نمونه برگ قطع شده و در نیتروژن مایع قرار داده شد. سپس نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA به ۸۰- درجه منتقل شدند.

استخراج RNA و تهیه cDNA نشان‌دار شده برای آزمایش درشت‌آرایه

نمونه‌های برگ نگهداری شده در ۸۰- درجه در هاون‌های حاوی نیتروژن مایع پودر شدند و مقدار ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ گرم از آن وزن شد. استخراج RNA کل با استفاده از محلول شرکت Biomol انجام گرفت. به این ترتیب ۹۰ نمونه RNA برای آزمایش درشت‌آرایه آماده شد. نمونه‌های RNA از نظر کمی و کیفی بررسی شدند و نمونه‌هایی که مناسب نبودند دوباره استخراج شدند. بررسی کیفی با الکتروفورز ژل آگارز انجام گرفت. برای بررسی بیان ژن از درشت‌آرایه ۱۳ هزار لکه‌ای[7] موسسه IPK آلمان استفاده شد. آرایه یاد شده دارای ۱۳۰۵۰ cDNA در دو غشا A و B بود. هر غشا دارای ۲۴×۱۶ آرایه کوچک[8] بود که خود دارای ۶×۶ نقطه بود. هر ژن بر روی این آرایه کوچک دو بار نقطه‌گذاری شده بود و دو نقطه نیز خالی بود تا میزان سیگنال پس‌زمینه را اندازه‌گیری کند (شکل۱). ساخت cDNA نشان‌دار شده با ایزوتوپ فسفر ۳۳ بر اساس روش ارائه شده توسط Sreenivasulu et al. (2002) انجام گرفت با این تفاوت که در این آزمایش برای ساخت رشته دوم cDNA، از مخلوط آغازگرهای تصادفی ۶ نوکلئوتیدی[9] (Roche Co., Basel, Switzerland) استفاده شد و مقدار پلیمرازکلنو[10] (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) در واکنش ۲۰ واحد بود.

دورگ‌گیری

قبل از دورگ‌گیری، غشاها به مدت ۳۰ دقیقه در بافر ۰/۱ درصد SDS و ۰/۱ برابر SSC با دمای اولیه ۱۰۰ درجه بر روی همزن قرار گرفتند. در این مرحله نمونه‌های DNA که به خوبی به غشا متصل نباشند جدا می‌شوند. غشاها در محلول NaOH ۰/۴ مولار بر روی همزن در دمای ۴۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند تا DNA به صورت تک رشته‌ای درآید. سپس غشاها در محلول خنثی‌کننده ۰/۱ برابر SSC، ۰/۱ درصد SDS و ۰/۲ مولار تریس[11] با pH=۷/۵ بر روی همزن در دمای ۴۵ درجه به مدت ۴۵ دقیقه قرارگرفتند. بافر دورگ‌گیری استفاده شده در این آزمایش حاوی دکستران سولفات (۱۰ درصد حجم/وزن)، SDS (۰/۸ درصد (حجم/وزن)) و کلرید سدیم (غلظت ۱ مولار) بود. همه مراحل دورگ‌گیری طبق روش Sreenivasulu et al. (2002) انجام گرفت با این تفاوت که زمان دورگ‌گیری به ۲۰ ساعت افزایش

1. Dari-83-6
2. L.527
3. EC-79-10
4. Nutans
5. Erectum
6. Hoagland nutrient solution
7. BarleyPGRC2 13K cDNA array
8. Sub array
9. Hexa nucleotide mix
10. Klenow fragment
11. Tris

یافت. دورگ‌گیری در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انجام گرفت. پس از پایان دورگ‌گیری غشاها ۲ بار با محلول بافر SDS ۰/۱ درصد و SSC ۰/۱ برابر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه شستشو و در نایلون‌های نازک بسته‌بندی شدند و در معرض فیلم‌های Fuji BAS2000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) phosphpimager قرار گرفتند. مدت قرار گرفتن غشاها در معرض فیلم‌ها به کیفیت تصاویر پس از اسکن کردن بستگی داشت و از ۲۴ ساعت تا ۱۴روز متفاوت بود.

ارزیابی آرایه‌ها و تجزیه داده‌ها

تصاویر به دست آمده از Phosphoimager برای تشخیص لکه‌ها و کمی کردن علائم به نرم‌افزار AIDA (نسخه ۴/۰۸، شرکت Raytest) منتقل شدند. مقدار پس‌زمینه با توجه به مقدار دو نقطه‌ای[1] شماره ۱۸ در هر آرایه کوچک از مقادیر نقاط دیگر همان آرایه کوچک حذف شد (شکل۱). یعنی میزان پس‌زمینه برای هر آرایه کوچک به صورت جداگانه محاسبه می‌شد و برای تصحیح ژن‌های همان آرایه کوچک مورد استفاده قرار می‌گرفت. به این ترتیب ارزش تمام ۱۷ ژنی که بر روی هر آرایه کوچک قرار داشتند با استفاده از ارزش محاسبه شده پس زمینه بر اساس دو نقطه‌ای شماره ۱۸ همان آرایه کوچک، تصحیح می‌شدند. هر نقطه بر روی آرایه بر اساس ردیف، ستون و جایگاه آن در آرایه کوچک ردیابی می‌شود و با ژن خاصی مرتبط است. از روش میانه برای نرمال‌سازی استفاده شد(Knudsen, 2002) و مقدار هر دو نقطه‌ای میانگین‌گیری شد. به طور کلی نمی‌توان انتظار داشت که در اثر تنش همه ژن‌های گیاه روشن شده باشند. آرایه مورد استفاده در این آزمایش دارای cDNA ۱۳۰۵۰ بود. بسیاری از ژن‌ها به هیچ‌کدام از تیمارها پاسخ نداده بودند و بنابراین بهتر بود از ادامه تجزیه و تحلیل حذف شوند. اگرچه معیار آماری مشخصی برای شناسایی ژن‌هایی که در حد پس‌زمینه هستند وجود ندارد، ژن‌هایی که مقدار سیگنال آنها حداقل در ۳ نمونه از ۹۰ نمونه بیشتر از ۲/۵ برابر مقدار پس‌زمینه بود برای تجزیه‌های بعدی انتخاب شدند. زیرا ممکن است در یک یا دو نمونه به تصادف یا در اثر خطا، سیگنال یک نقطه خیلی بیشتر از پس زمینه باشد، ولی احتمال اینکه در تعداد بیشتری از نمونه‌ها این روند وجود داشته باشد کمتر است. برای بررسی تاثیر عوامل مختلف بر بیان ژن‌ها تجزیه واریانس انجام گرفت. پیش از تجزیه واریانس تبدیل لگاریتمی تعمیم یافته بر روی داده‌ها انجام گرفت (Durbin & Rocke, 2003; Rocke & Durbin, 2001) . مدل تجزیه واریانس به صورت زیر بود:

$$Y_{ijkl}= \mu + G_i+ C_j+ T_k+ GC_{ij} +GT_{ik}+ CT_{jk} +GCT_{ijk} +R_l + \varepsilon_{ijkl} \quad (۱$$

که در آن Y نشان‌دهنده سیگنال اندازه‌گیری شده، μ میانگین کل، G اثر ژنوتیپ، C اثر شرایط، T اثر زمان، R اثر تکرار، GC اثر برهمکنش ژنوتیپ در شرایط، GT اثر برهمکنش ژنوتیپ در زمان، CT اثر برهمکنش شرایط در زمان، GCT اثر برهمکنش ژنوتیپ در شرایط در زمان و ε_{ijkl} اثر خطا بودند. از روش بونفرونی[2] برای تصحیح سطح آلفا برای آزمون‌های چندگانه استفاده شد (Wrobel et al., 2005). پس از تجزیه واریانس می‌توان اثرهای اصلی و برهمکنش را برای هر ژن و در هر نمونه محاسبه کرد. با انجام تجزیه مولفه‌های اصلی بر روی ماتریس اثرهای برهمکنش نتایج جالب‌تری نسبت به تجزیه واریانس به دست می‌آید. مشخص شده است که این روش می‌تواند ابزاری ارزشمند برای تجزیه داده‌های ریزآرایه باشد (De Haan et al., 2007). برای انجام این روش بر اساس روش De Hann et al. (2007) عمل شده و مدل بیان هر ژن به صورت زیر نوشته شد:

$$Y_{ijklm}= \mu + G_i+ C_j+ T_k+ GC_{ij}+ GT_{ik}+ CT_{jk} +GCT_{ijk} +R_l +g_m+Gg_{im} +Cg_{jm}+Tg_{km}+ GCg_{ijm} +GTg_{ikm}+ CTg_{jkm} +GCTg_{ijkm} + \varepsilon_{ijklm} \quad (۲$$

تفاوت این مدل با مدل قبلی این است که اثر ژن(g) نیز به مدل اضافه شده است. سپس تجزیه مولفه‌های اصلی بر روی ماتریس اثر برهمکنش ژن×شرایط ، ژن× شرایط × ژنوتیپ و ژن × شرایط× زمان انجام گرفت و تعداد مناسبی مولفه برای تفسیر انتخاب شد و برای هر ژن مقدار T^2 هتلینگ (Lu et al., 2005) برای شناسایی

1. Double spot

2. Bonferroni

ژن‌هایی که بیان آنها با بقیه ژن‌ها متفاوت بود بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$T_i^2 = \sum_{k=1}^{a} \frac{u_{ik}^2}{s_u^2} \quad (۳$$

که در آن a تعداد مولفه مورد نظر، u_{ik} نمره مربوط به هر ژن از نظر مولفه k ام و s^2_u واریانس مولفه مربوطه است. مقدار T^2 هتلینگ بحرانی (T_c^2) از فرمول زیر و با توجه به مقدار F مورد نظر به دست آمد (De Haan et al., 2007):

$$T_c^2 = \frac{(n-1)p}{(n-p)} F_{\alpha;p,n-p} \quad (۴$$

این روش کمک می‌کند تا ژن‌هایی که پاسخ آنها به اثر ذکر شده متفاوت از دیگر ژن‌ها است، شناسایی شوند. از نرم‌افزار MeV[1] (Saeed et al., 2003) برای تجزیه گروه‌بندی استفاده شد. در تجزیه گروه‌بندی از الگوریتم UPGMA استفاده شد. برای آزمون دقیق فیشر[2] (Rivals et al., 2007) به منظور آزمون تعداد نماینده‌های گروه‌های ژنی خاص در یک گروه، از نرم افزار R استفاده گردید.

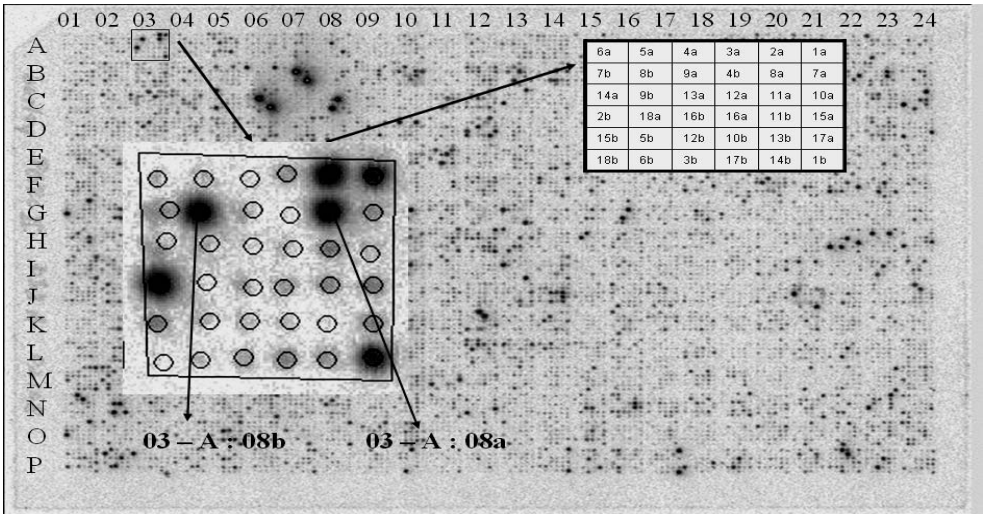
نتایج و بحث

پس از انجام آزمایش درشت‌آرایه، فیلم‌ها اسکن شدند. شکل ۱ نمونه‌ای از این تصاویر را نشان می‌دهد. این تصویر شامل ۱۳۸۲۴=۲۴×۱۶×۳۶ نقطه مختلف است. هر غشا دارای۲۴ ×۱۶ آرایه کوچک است که تصویر یکی از آنها به شکل اضافه شده است. دو نقطه‌ای شماره ۱۸ در هر آرایه کوچک خالی بوده و برای اندازه‌گیری پس‌زمینه استفاده شدند. لکه‌ها توسط نرم‌افزار AIDA تشخیص داده شده و به داده‌های کمی تبدیل و سپس برای تجزیه و تحلیل استفاده شدند.

مقدار سیگنال ۸۲۱۹ ژن از ۱۳۰۵۰ ژن، حداقل در ۳ نمونه از ۹۰ نمونه بیشتر از ۲/۵ برابر مقدار پس‌زمینه بود. پس از تجزیه واریانس و تصحیح آزمون‌های چندگانه با استفاده از روش بونفرونی سطح احتمال برای ۸۲۱۹ ژن برابر ۰/۰۰۰۰۰۶۲۴۱به دست آمد. بر این اساس اثر ژنوتیپ در ۵۳۴ ژن، اثر شرایط در ۷۴۴ ژن و اثر زمان در ۱۸۳۴ ژن معنی‌دار بود. اثر برهمکنش ژنوتیپ×زمان و شرایط×زمان به ترتیب در مورد ۲۰ و ۹ ژن معنی‌دار بودند. با استفاده از این تصحیح اثر برهمکنش بین ژنوتیپ×شرایط برای هیچ ژن معنی‌داری به دست نیامد. استفاده از تجزیه واریانس به تنهایی، دارای دو ایراد بود. یکی اینکه برای تعداد کمی از ژن‌ها اثر برهمکنش معنی‌دار بود و دوم اینکه پس از بررسی ژن‌هایی که معنی‌دار بودند، مشخص شد مربوط به مسیرهای بیوشیمیایی غیرمرتبط با تنش هستند. برای برطرف شدن این ایرادها از تجزیه مولفه‌های اصلی بر روی ماتریس‌های اثر برهمکنش به دست آمده از تجزیه واریانس استفاده شد. در تجزیه واریانس اثر عوامل بر روی بیان هر ژن (به عنوان یک صفت) تفکیک می‌شوند و می‌توان برای هر ژن اثرهای اصلی و برهمکنش را محاسبه کرد.

اگر این اثرها برای تمام ژن‌ها در نظر گرفته شوند، آنگاه ماتریس اثر برهمکنش خواهیم داشت. با کمک این تجزیه ایرادهای تجزیه واریانس برطرف شد. به طوری که تعداد ژن‌های بیشتری پیدا شدند که اثر برهمکنش در آنها معنی‌دار بود و همچنین بررسی ژن‌های به دست آمده از این تجزیه نشان داد که برخلاف نتایج تجزیه واریانس، تعداد زیادی از ژن‌های شناسایی شده مرتبط با تنش هستند که این نتیجه خود بر اعتبار این تجزیه می‌افزاید (جدول ۱ و ۲). در سطح احتمال ۰/۰۰۴۷ (F برابر ۸) در مورد ماتریس اثر برهمکنش ژن × شرایط تعداد ۱۲۶ ژن انتخاب شدند.از این تعداد ۱۰۶ ژن در شرایط تنش بیشتر[3] و ۲۰ ژن درشرایط‌تنش کمتر[4] بیان شده بودند. در حقیقت این ژن‌ها، ژن‌هایی هستند که بیان آنها در اثر تنش تغییر معنی‌دار کرده است. جدول۱ گروه‌بندی این ژن‌ها را بر اساس مسیرهای بیوشیمیایی نشان می‌دهد. اطلاعاتی در مورد ژن‌های آرایه در اختیار وجود دارد که مشخص می‌کند هر ژن در چه مسیر یا چرخه بیوشیمیایی فعال است. بر این اساس آگاهی در

1. Multi Experiment Viewer –version 4.1.01
2. Fisher exact test
3. Up regulated
4. Down regulated



شکل۱- تصویر مربوط به غشاء A پس از اسکن کردن فیلم

مورد اینکه چه گروه ژنی بیش از حد انتظار یا کمتر از حد انتظار در گروه ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی وجود دارد، مهم است. آزمون معنی‌دار بودن برای این تجزیه با نرم افزار R انجام شد و احتمال آن در جدول ۱ آمده است. احتمال‌های کمتر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده این است که تعداد از حد انتظار به طور معنی‌داری کمتر یا بیشتر است. ژن‌های هر مسیر از نظر اینکه در شرایط تنش بیان بیشتر یا کمتری نسبت به شرایط نرمال داشته‌اند در جدول ۱ مشخص شده‌اند. برای انجام این تجزیه از آزمون دقیق فیشر[1] استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ژن‌های مربوط به متابولیسم چربی، تنش و متابولیسم اسید آمینه بسیار بیشتر از حد انتظار در این گروه قرار گرفته‌اند. همچنین بیان تعداد زیادی از ژن‌هایی که در گروه‌های یاد شده قرار دارند در اثر تنش بیشتر شده است. از طرفی ژن‌های مربوط به RNA و پروتئین بسیار کمتر از حد انتظار در این گروه نماینده دارند. شکل ۲ نتایج حاصل از تجزیه گروه‌بندی این ژن‌ها را نشان می‌دهد. در این شکل ردیف‌ها مربوط به ژن‌ها و ستون‌ها مربوط به تیمارها هستند. اسم هر ژن و اطلاعات مربوط به مسیر بیوشیمیایی که در آن فعالیت می‌کند در کنار شکل دیده می‌شود.

همچنین مشخص شده است که هر ژن در اثر تنش بیان بیشتر یا کمتر نسبت به شرایط نرمال داشته است. بسیاری از ژن‌های مربوط به متابولیسم چربی در این گروه مربوط به انتقال‌دهنده لیپید[2] هستند که همانند ژن‌های دی‌هایدرین نقش حفاظتی به عهده دارند (Talame et al., 2007). نقش‌حفاظتی این پروتئین‌ها در برابر تنش خشکی با احتمال زیاد از طریق ساخت کوتیکول انجام می‌گیرد (Cameron et al., 2006; Dunn et al., 1991). تظاهر این ژن‌ها به طور متوسط در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال ۲/۵ برابر بیشتر شده بود. Dunn et al. (1991) نشان دادند که بیان این پروتئین‌ها در جو در اثر سرما و تنش خشکی بیشتر می‌شود. Cameron et al. (2006) با استفاده از بررسی نورترن تظاهر ژن‌های انتقال‌دهنده چربی را در توتون در شرایط تنش خشکی ۶ برابر بیشتر نسبت به شرایط نرمال گزارش کردند.

ژن‌های دی‌هایدرین[3]، ژن‌های پاسخ‌دهنده به سرما، متالوتیونئین[4]، بازدارنده‌های پروتئیناز، متابولیسم قند و ژن‌های پاسخ‌دهنده به آلومینیوم از دیگر ژن‌هایی بودند که در این گروه مشاهده شدند. تظاهر بیشر ژن‌های متالوتیونئین (Andjelkovic & Thompson, 2006) و دی‌هایدرین در اثر تنش قبلاً نیز گزارش شده است

1. Fisher exact test

2. Lipid transfer protein
3. Dehydrins
4. Metallothionein

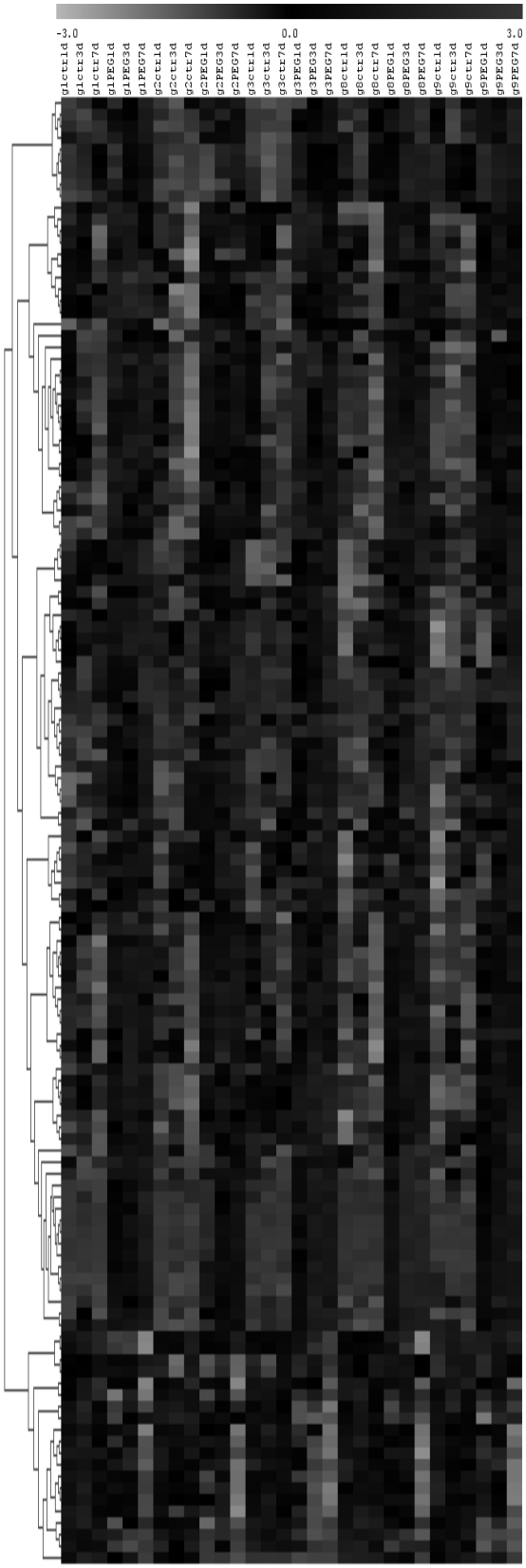
(Ozturk et al., 2002; Talame et al., 2007). Andjelkovic et al. (2006) تظاهر ژن متالوتیونئین را در شرایط تنش خشکی ۲/۱ برابر شرایط نرمال گزارش کردند. در این آزمایش، این افزایش به طور متوسط ۲/۵ برابر بود. ژن‌های دی‌هایدرین حدود ۲۱ بار بیشتر نسبت به شرایط نرمال تظاهر داشتند. Talame et al. (2007) نشان دادند که این گروه ژنی در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال تظاهر بیشتر داشتند. به نظرمی‌رسد که این پروتئین‌ها در نابود کردن اکسیژن‌های فعال تولید شده در اثر تنش نقش دارند (Palmiter, 1998). گروه ژن‌های دی‌هایدرین شامل دی‌هایدرین ۳، ۴، ۶، ۷، ۹ و ۱۲ بود. در مطالعه‌ای که Tommasini et al. (2008) انجام دادند ژن‌های دی‌هادرین ۱، ۲، ۳، ۴، ۷، ۹ و ۱۰ به خشکی پاسخ دادند در حالی که دی‌هایدرین ۶ و ۱۲ به هیچ یک از دو تنش خشکی و شوری پاسخ نداده بودند. دو ژن مرتبط با Δ۱پیرولین-۵-کربوکسیلاز سنتتاز[1] در این گروه دیده می‌شوند که رمزکننده یک آنزیم کلیدی در مسیر ساخت پرولین هستند. پرولین یکی از حفاظت‌کننده‌هایی است که به هنگام تنش از سلول حفاظت می‌کند. پرولین در شرایط تنش خشکی به تنظیم دوباره پتانسیل اسمزی سلول کمک می‌کند (Langridge et al., 2006). به علاوه پرولین و قندها در شرایط تنش خشکی پروتئین‌ها را پوشش داده و به این ترتیب از به هم ریختن ساختمان سه‌بعدی آنها جلوگیری به عمل می‌آورند (Hoekstra et al., 2001).

تظاهر این ژن در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال به طور متوسط ۱۷ برابر افزایش نشان داد. Ozturk et al. (2002) افزایش تظاهر این ژن را در پاسخ به تنش خشکی گزارش کرده‌اند. به علاوه بیان بیشتر ژن‌های مربوط به بازدارنده‌های پروتئیناز (Talame et al., 2007)، ژن‌های پاسخ‌دهنده به آلومنیوم، ژن‌های آلدهید دهیدروژناز[2] و پیش‌ماده‌های تیونین[3] در اثر تنش با نتایج Ozturk et al. (2002) همخوانی دارد ولی در این آزمایش بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم اسیدآمینه در اثر تنش افزایش یافته بود، در حالی که در آزمایش Ozturk et al. (2002) عکس این نتیجه گزارش شده است. تظاهر بیشتر ۳ ژن مرتبط با متابولیسم قند در اثر تنش، احتمالاً با تنظم

جدول ۱- ژن‌هایی که اثر تنش بر آنها معنی‌دار بوده است. (این ژن‌ها بر اساس مسیرهای بیوشیمیایی که در آنها فعال هستند گروه‌بندی شده‌اند)

گروه متابولیسمی	تعداد ژن مشاهده شده	تعداد ژن مورد انتظار	احتمال به دست آمده از آزمون دقیق فیشر	تعداد ژن با بیان بیشتر در شرایط تنش	تعداد ژن با بیان کمتر در شرایط تنش
فتوسنتز	۰	۲/۰۲	۰/۲۷	۰	۰
متابولیسم CHO (major)	۳	۱/۴۴	۰/۱۷	۳	۰
متابولیسم CHO (minor)	۰	۰/۸۱	۱	۰	۰
گلیکولیز	۰	۰/۹۷	۱	۰	۰
تخمیر	۲	۰/۲۵	۰/۰۲۶	۲	۰
چرخه گلی اکسیلات	۰	۰/۱۰۴	۱	۰	۰
OPP	۰	۰/۲۹	۱	۰	۰
TCA / org. transformation	۴	۰/۹۹	۰/۰۱۷	۳	۱
انتقال‌الکترون‌میتوکندریایی‌یاساخت-ATP	۰	۰/۸۴	۱	۰	۰
دیواره سلولی	۲	۱/۷۹	۰/۷۰	۲	۰
متابولیسم چربی	۱۵	۲/۷۰	۷/۱۲ E-۰۸	۱۴	۱
متابولیسم نیتروژن	۰	۰/۲۰	۱	۰	۰
متابولیسم اسید آمینه	۹	۲/۲۴	۰/۰۰۰	۹	۰
S-assimilation	۰	۰/۰۸	۱	۰	۰
metal handling	۰	۰/۳۷	۱	۰	۰
متابولیسم ثانویه	۳	۲	۰/۴۵	۱	۲
متابولیسم هورمون	۲	۲/۱۵	۱	۲	۰
متابولیسم هورمون و کوفاکتور	۰	۰/۲۴	۱	۰	۰
ساخت تتراپیرول	۰	۰/۳۶	۱	۰	۰
تنش	۱۶	۳/۴۲	۲/۸۶ E-۰۷	۱۳	۳
رداکس اسکوربات و گلوتاتیون	۲	۱/۴۷	۰/۶۶	۰	۲
متابولیسم پلی آمین	۱	۰/۱۷	۰/۱۶	۱	۰
متابولیسم نوکلئوتید	۳	۱/۱۷	۰/۱۱	۲	۱
تجزیه زنوبیوتیکس	۰	۰/۱۶	۱	۰	۰
C1-metabolism	۲	۰/۲۰	۰/۰۱۶	۱	۱
Misc	۱۰	۵/۵۰	۰/۰۷۲	۴	۶
RNA	۲	۱۱/۶۶	۰/۰۰۰۹	۲	۰
DNA	۰	۲/۷۵	۰/۱۲	۰	۰
پروتئین	۶	۱۸/۷۶	۰/۰۰۰۵	۵	۱
انتقال سیگنال	۲	۴/۴۶	۰/۳۳	۲	۰
سلول	۰	۳/۱۷	۰/۰۸	۰	۰
نمو	۱	۱/۸۷	۱	۰	۱
انتقال	۳	۳/۷۷	۱	۳	۰
فعالیت ناشناخته	۳۸	۴۷/۶۰	۰/۰۸	۳۷	۱

1. Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
2. Aldehyde dehydrogenase
3. Thionin precursor



Gene ID	up/down regulated	annotation
HW08A02	up	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit
HY06I22	up	aldehyde dehydrogenase homolog Dha1
HX02G03	up	aldehyde dehydrogenase homolog Dha1
HD04K15	up	early drought induced protein
HO14F24	up	proteinase inhibitor
HD07M22	up	proteinase inhibitor
HD04G07	up	<none>
HW08E20	up	wheat aluminum induced protein wali 5
HC14D22	up	wheat aluminum induced protein wali 5
HM01I09	up	putative C-4 sterol methyl oxidase
HI01C18	up	heat shock transcription factor HSF1
HV01P14	up	putative phosphoethanolamine methyltransferase
HF16N01	up	putative phosphoethanolamine methyltransferase
HK06P12	up	polyamine oxidase
HK03L18	up	RNase S-like protein
HK03N03	up	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
HV02F06	up	thionin precursor
HK03M03	up	thionin [Hordeum vulgare=barley
HC14G11	up	thionin [Hordeum vulgare=barley
HDP13P16	up	HISTIDINE-RICH GLYCOPROTEIN PRECURSOR
HW04J09	up	putative receptor-like protein kinase
HK04C13	up	probable phospholipid transfer protein precursor
HS01P06	up	NONSPECIFIC LIPID-TRANSFER PROTEIN 4.3 PRECURSOR
HS02P06	up	NONSPECIFIC LIPID-TRANSFER PROTEIN 4.3 PRECURSOR
HO03J03	up	(AAAB01008847) ebiP1657 [Anopheles gambiae str. PEST]
HV02H14	up	NONSPECIFIC LIPID-TRANSFER PROTEIN 4.1 PRECURSOR
HO36L14	up	NONSPECIFIC LIPID-TRANSFER PROTEIN 4.1 PRECURSOR
HK05P10	up	NONSPECIFIC LIPID-TRANSFER PROTEIN 4.1 PRECURSOR
HK05F10	up	NONSPECIFIC LIPID-TRANSFER PROTEIN 4.1 PRECURSOR
HV03E22	up	lipid transfer protein Cw(21)
HH06E16	up	NONSPECIFIC LIPID-TRANSFER PROTEIN 4.3 PRECURSOR
HO14E01	up	<none>
HA17L05	up	<none>
HW04J01	up	probable lipid transfer protein
HK06L05	up	<none>
HF01J01	up	(AC007202) Is a member of the PF|00171 aldehyde dehydrogenase family
GBN008O16	up	membrane related protein CP5
GBN006J10	up	(AC007202) Is a member of the PF|00171 aldehyde dehydrogenase family
HY07F02	up	(AF082347) C13 endopeptidase NP1 precursor
HY05P07	up	(AF082347) C13 endopeptidase NP1 precursor
HF01D11	up	putative protein; protein id: At5g18130.1
HB32F06	up	(AP003259) putative pyrroline-5-carboxylate reductas
HO04P24	up	permease 1 - like protein; protein id: At5g62890.1
HDP31G21	up	putative nuclease [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
HD04P22	up	putative protein; protein id: At5g44720.1
HV03C20	up	metallothionein [Porteresia coarctata]
HD11H02	up	metallothionein [Porteresia coarctata]
HD08N06	up	metallothionein [Porteresia coarctata]
HB09F06	up	glycine dehydrogenase (decarboxylating) (EC 1.4.4.2) [imported]
HW02F11	up	sucrose:sucrose 1-fructosytransferase [Triticum aestivum]
HW02C14	up	sucrose--fructan 6-fructosyltransferase (EC 2.4.1.-) large chain
HH01A21	up	sucrose--fructan 6-fructosyltransferase (EC 2.4.1.-) large chain
HT01K06	up	<none>
HV02B09	up	lipoxygenase (EC 1.13.11.12) 2
HO05K20	up	hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
HY08H04	up	Formate dehydrogenase
HDP41M17	up	putative amino acid transport protein AAP2 [Oryza sativa
HW07A08	up	putative CTP synthase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
HZ43K14	up	OSJNBa0086B14.13 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
HDP28J24	up	D1 CtpA arboxy-terminal protease
GCN002C22	up	D1 CtpA arboxy-terminal protease
HB30D11	up	(AE003801) CG10911-PA [Drosophila melanogaster]
GBN005K24	up	<none>
HDP31B22	up	(AC007591) Strong similarity to gb|X95263 Periodic tryptophan protein 2 gene
HY03F05	up	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4HPPD)
HO09H21	up	r40g3 protein - rice emb|CAA70175.1| osr40g3
HH07F19	up	r40c1 protein - rice emb|CAA64683.1|
GCN002H22	up	(AB045759) bundle sheath cell specific protein 1 [Zea mays]
HD09B24	up	expressed protein; protein id: At2g41190.1
GBN002O09	up	putative protein; protein id: At5g18130.1
HZ52A02	up	P0671B11.14 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
HK04H17	up	(AJ010440) GST7 protein [Zea mays]
HO07P16	up	abscisic acid- and stress-induced protein - rice gb|AAB96681.1|
HO38E21	up	nonspecific lipid transfer protein Cw-18 precursor
HO37H04	up	nonspecific lipid transfer protein Cw-18 precursor
HO04D12	up	(AF166121) Cf2/Cf5 disease resistance protein homolog
HM03P13	up	(AJ295942) beta expansin B3 [Festuca pratensis]
HO10M06	up	<none>
HO02B02	up	nonspecific lipid transfer protein Cw-18 precursor
HK03J16	up	nonspecific lipid transfer protein Cw-18 precursor
HH01A17	up	putative GTP-binding protein; protein id: At1g52980.1
HR01E04	up	beta expansin B2 [Festuca pratensis]
GCW003I10	up	(AP004339) hypothetical protein
HS01O07	up	respiratory burst oxidase homolog [Solanum tuberosum]
HT09D17	up	cold acclimation protein WCOR413
HW08I11	up	cold acclimation protein WCOR413
HO15O13	up	cold acclimation protein WCOR413
HX02C05	up	hypothetical protein [Nostoc sp. PCC 7120]
HW05K13	up	apyrase GS52 [Glycine soja]
HC02P10	up	(AF043091) dehydrin 6 [Hordeum vulgare] [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
HC14H04	up	ARGININE DECARBOXYLASE (ARGDC)
HD02J11	up	glutamine-dependent asparagine synthetase 1
HT08A04	up	(AF155129) dehydrin 12 [Hordeum vulgare]
HZ01F01	up	(NM_111720) putative aminotransferase
HV08B01	up	(AF043092) dehydrin 7 [Hordeum vulgare]
HU07D12	up	(AF181454) dehydrin; DHN4 [Hordeum vulgare]
HT06F17	up	(AF181454) dehydrin; DHN4 [Hordeum vulgare]
HS04E22	up	(AF181454) dehydrin; DHN4 [Hordeum vulgare]
HS01P15	up	(AF181454) dehydrin; DHN4 [Hordeum vulgare]
HDP03A21	up	(AF043089) dehydrin 3 [Hordeum vulgare]
HF24J18	up	(AF043094) dehydrin 9 [Hordeum vulgare]
HF02B03	up	putative delta l pyrroline-5-carboxylate synthetase
HB14O13	up	putative delta l pyrroline-5-carboxylate synthetase
GBN004N14	up	<none>
HY10F10	up	(AC007202) Is a member of the PF|00171 aldehyde dehydrogenase family
GBN002L16	up	cold-regulated protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
HK05M13	down	putative glutathione S-transferase
GCA001B19	down	putative glutathione S-transferase
HO16H10	down	pathogenesis-related protein 1a
GBN004L23	down	Pathogenesis-related protein 1 precursor pir
HX01A03	down	superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (Cu-Zn) 2
HO28N08	down	adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase
HY08F18	down	putative MtN3 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
HW05I06	down	(NM_116734) Expressed protein; protein id: At4g04955.1
HU03F15	down	licheninase (EC 3.2.1.73) 1 precursor
HZ37K17	down	monodehydroascorbate reductase [Brassica juncea]
HW06L16	down	NADP-specific isocitrate dehydrogenase
HU02K16	down	Acyl carrier protein 1
HV01J14	down	AAA32962.1 e-162 (M13237) (1->3
HV04D23	down	AAA32962.1 e-162 (M13237) (1->3
HV01J14	down	AAA32962.1 e-162 (M13237) (1->3
HM04D21	down	AAK14421.1 3e-59 (AC087851) hypothetical protein
HO04K22	down	CHALCONE SYNTHASE 1 (NARINGENIN-CHALCONE SYNTHASE 1)
HS03F11	down	OSJNBb0118P14.11 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
HA02M06	down	contains ESTs AU174016(S13261)
GBN002D03	down	Putative anthranilate N-benzoyltransferase

شکل۲- گروه‌بندی مربوط به ژن‌هایی که به تنش پاسخ معنی‌دار داده‌اند.

(در این گروه‌بندی از الگوریتم UPGMA استفاده شده است.)

اسمزی سلول می‌تواند در ارتباط باشد (Rabbani et al., 2003) . این سه ژن به ویژه در روز هفتم پس از آغاز تنش بیان بسیار بالایی را نشان دادند. این ژن‌ها مربوط به دو آنزیم سوکروز: سوکروز ۱- فروکتوزیل ترانسفراز و سوکروز: فروکتان ۶- فروکتوزیل ترانسفراز هستند که در واکوئل در مسیر تولید فروکتان درگیر هستند. این ژن‌ها در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال ۷ برابر بیشتر تظاهر داشتند. شواهد نشان می‌دهند که فروکتان در شرایط تنش خشکی و سرما نقش حفاظتی به عهده دارد (Kawakami & Yoshida, 2005). تظاهر بیشتر ژن سوکروز: سوکروز ۱- فروکتوزیل ترانسفراز در اثر تنش خشکی در گندم قبلاً نیز گزارش شده است (Xue et al., 2008). تجزیه مولفه‌های اصلی بر روی ماتریس اثر برهمکنش ژن × ژنوتیپ × شرایط انجام شد تا مشخص شود چه ژن‌هایی در ژنوتیپ‌های مختلف واکنش متفاوتی به تنش نشان می‌دهند. در سطح احتمال ۰/۰۰۱ برای این ماتریس تعداد ۱۰۳ ژن انتخاب شدند که تظاهر ۷۷ ژن در اثر خشکی بیشتر و بیان ۲۶ ژن در اثر خشکی کمتر شده بود. ممکن است در اثر تنش یک ژن در یک ژنوتیپ بیان شود در حالی که در دیگر ژنوتیپ‌ها بیان نشود. این پدیده می‌تواند به دلایل مختلفی رخ دهد. مثلاً ممکن است توالی تنظیمی این ژن در یک ژنوتیپ به گونه‌ای باشد که در اثر تنش، عوامل تنظیمی آن را شناسایی کرده و بیان آن را شدید کنند حال آنکه در دیگر ژنوتیپ‌ها این توالی جهش یافته و عوامل تنظیمی قادر نباشند به این توالی متصل شوند. بنابراین بیان این ژن در ژنوتیپ‌های ذکر شده در اثر تنش زیاد نخواهد شد. به این ترتیب بیان این ژن در اثر

جدول ۲- ژن‌هایی که اثر برهمکنش ژنوتیپ در شرایط یا اثر برهمکنش شرایط در زمان در مورد آنها معنی‌دار بوده است. (این ژن‌ها بر اساس میسر بیوشیمیایی که در آنها فعال هستند گروه‌بندی شده‌اند.)

گروه متابولیسمی	نتایج مربوط به اثر برهمکنش ژن در ژنوتیپ در شرایط					نتایج مربوط به اثر برهمکنش ژن در شرایط در زمان				
	تعداد ژن مشاهده شده	تعداد ژن مورد انتظار	احتمال به دست آمده از آزمون دقیق فیشر	تعداد ژن با پاسخ افزایشی به تنش	تعداد ژن با پاسخ کاهشی به تنش	تعداد ژن مشاهده شده	تعداد ژن مورد انتظار	احتمال به دست آمده از آزمون دقیق فیشر	تعداد ژن با پاسخ افزایشی به تنش	تعداد ژن با پاسخ کاهشی به تنش
فتوسنتز	۱	۱/۶۵	۱	۰	۱	۲	۱/۴۶	۰/۶۶	۰	۲
متابولیسم CHO (major)	۰	۱/۱۸	۰/۶۳	۰	۰	۴	۱/۰۴	۰/۰۲۰	۴	۰
متابولیسم CHO (minor)	۰	۰/۶۶	۱	۰	۰	۰	۰/۵۹	۱	۰	۰
گلیکولیز	۰	۰/۸۰	۱	۰	۰	۰	۰/۷۰	۱	۰	۰
تخمیر	۲	۰/۲۱	۰/۰۱۸	۲	۰	۰	۰/۱۸	۱	۰	۰
چرخه گلی اکسیلات	۰	۰/۰۸۵	۱	۰	۰	۰	۰/۰۷۵	۱	۰	۰
OPP	۰	۰/۲۴	۱	۰	۰	۰	۰/۲۱	۱	۰	۰
TCA / org. transformation	۰	۰/۸۱	۱	۰	۰	۱	۰/۷۱	۰/۵۱	۰	۱
انتقال الکترون میتوکندریایی یا ساخت ATP	۰	۰/۶۸	۱	۰	۰	۰	۰/۶۰	۱	۰	۰
دیواره سلولی	۰	۱/۴۷	۰/۴۰۷	۰	۰	۱	۱/۲۹	۱	۱	۰
متابولیسم چربی	۰	۲/۲۰	۰/۱۷۶	۰	۰	۰	۱/۹۴	۰/۲۷	۰	۰
متابولیسم نیتروژن	۰	۰/۱۶	۱	۰	۰	۰	۰/۱۴	۱	۰	۰
متابولیسم اسید آمینه	۷	۱/۸۳	۰/۰۰۲	۷	۰	۵	۱/۶۲	۰/۰۲۳	۵	۰
S-assimilation	۰	۰/۰۷	۱	۰	۰	۰	۰/۰۵۸	۱	۰	۰
metal handling	۰	۰/۳۰۳	۱	۰	۰	۱	۰/۲۷	۰/۲۴	۱	۰
متابولیسم ثانویه	۲	۱/۶۳	۰/۶۸	۰	۲	۲	۱/۴۴	۰/۶۶	۰	۲
متابولیسم هورمون	۷	۱/۷۶	۰/۰۰۱۸	۳	۴	۳	۱/۵۵	۰/۲۰۲	۱	۲
متابولیسم هورمون و کوفاکتور	۰	۰/۲۰	۱	۰	۰	۰	۰/۱۸	۱	۰	۰
ساخت تتراپیرول	۰	۰/۲۹	۱	۰	۰	۰	۰/۲۶	۱	۰	۰
تنش	۱۵	۲/۸	۱/۰۹E-۷	۷	۸	۱۷	۲/۴۷	۲/۸ E-۱۰	۹	۸
رداکس اسکوربات و گلوتاتیون	۰	۱/۲	۰/۶۴	۰	۰	۰	۱/۰۶۵	۰/۶۳	۰	۰
متابولیسم پلی آمین	۰	۰/۱۴	۱	۰	۰	۱	۰/۱۳	۰/۱۲	۱	۰
متابولیسم نوکلئوتید	۰	۰/۹۶	۱	۰	۰	۰	۰/۸۴	۱	۰	۰
تجزیه زنوبیوتیکس	۰	۰/۱۳	۱	۰	۰	۰	۰/۱۲	۱	۰	۰
C1-metabolism	۰	۰/۱۶	۱	۰	۰	۰	۰/۱۴	۱	۰	۰
misc	۴	۴/۵۰	۱	۳	۱	۸	۳/۹۷	۰/۰۶۲	۲	۶
RNA	۵	۹/۵۳	۰/۱۷	۴	۱	۵	۸/۴۲	۰/۲۷	۴	۱
DNA	۶	۲/۲۵	۰/۰۲۵	۶	۰	۰	۱/۹۹	۰/۲۷	۰	۰
پروتئین	۶	۱۵/۳۴	۰/۰۰۷۵	۴	۲	۳	۱۳/۵۵	۰/۰۰۰۵۵	۱	۲
انتقال سیگنال	۱	۳/۶۴	۰/۲۷۳	۱	۰	۰	۳/۲۲	۰/۰۷۹	۰	۰
سلول	۱	۲/۵۹	۰/۵۲۴	۱	۰	۰	۲/۲۹	۰/۱۷۶	۰	۰
نمو	۱	۱/۵۳	۱	۱	۰	۱	۱/۳۵	۱	۱	۰
انتقال	۲	۳/۰۸	۰/۷۷	۱	۱	۱	۲/۷۲	۰/۵۳	۰	۱
فعالیت ناشناخته	۴۳	۳۸/۹۰	۰/۴۱۵	۳۷	۶	۳۶	۳۴/۳۷	۰/۷۴	۲۲	۱۴

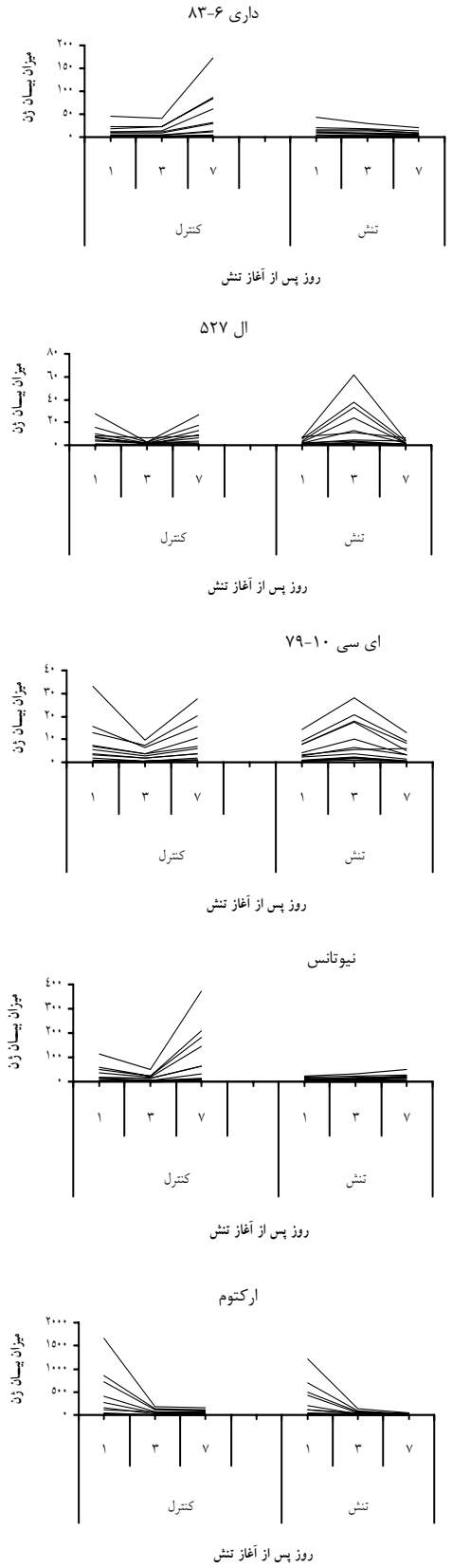
تنش در برخی ژنوتیپ‌ها نسبت به شرایط نرمال افزایش نشان می‌دهد حال آنکه در دیگر ژنوتیپ‌ها بیان آن در اثر تنش نسبت به نرمال تغییری نخواهد کرد. این روند را به اصطلاح اثر برهمکنش بین ژنوتیپ در شرایط برای آن ژن می‌نامند. بنابراین، این ۱۰۳ ژن، ژن‌هایی هستند که این روند را نشان می‌دهند. در این گروه ۷ ژن مربوط به متابولیسم اسید آمینه وجود داشت که بیان تمام آنها در شرایط تنش بیشتر از نرمال بود. نتایج آزمون دقیق فیشر برای ژن‌های انتخاب شده از این تجزیه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. با بررسی این نتایج مشخص می‌شود که در این گروه تعداد زیادی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش قرار دارند. ژن‌های دی‌هایدرین دوباره در این گروه ظاهر شدند. پاسخ این گروه ژنی به تنش در ژنوتیپ نیوتانس از بقیه ژنوتیپ‌ها شدیدتر است به طوری که در نیوتانس حدود ۳۱ برابر شرایط نرمال و در L.527 ۱۷ برابر شرایط نرمال تظاهر بیشتر نشان داد (شکل ۲). به همین دلیل اثر برهمکنش بین ژنوتیپ و شرایط برای آنها معنی‌دار بوده است و در این گروه قرار گرفته‌اند. نتایج مربوط به ماتریس اثر برهمکنش ژن × شرایط × زمان نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. در این تجزیه از سطح احتمال ۰/۰۰۱ استفاده شد. در این گروه ۹۱ ژن قرار دارند که بیان ۵۲ ژن در اثر تنش بیشتر و بیان ۳۹ ژن در اثر تنش کمتر شده است. به عنوان مثال ممکن است در شرایط نرمال بیان یک ژن در هر سه زمان (۱ و ۳ و ۷ روز) کم و بیش یکسان باشد و در شرایط تنش در طی زمان بیان آن کم یا زیاد شود. در این صورت در مورد این ژن اثر برهمکنش بین زمان و شرایط وجود خواهد داشت. یعنی روند تغییر بیان ژن در طی زمان در دو شرایط نرمال و تنش متفاوت است. ژن‌های قرار گرفته در این گروه این روند را نشان می‌دهند. بررسی فعالیت این ژن‌ها نشان می‌دهد که بیشتر آنها در گروه ژن‌های دی‌هایدرین و ژن‌های پاسخ‌دهنده به بیماری هستند. ژن‌های دی‌هایدرین به مرور زمان تظاهر بیشتر نسبت به شرایط نرمال نشان می‌دهند. به طوری که تظاهر آنها در شرایط تنش در روز اول تنها ۷ برابر، روز سوم ۱۹ برابر و روز هفتم ۳۹ برابرنسبت به شرایط نرمال بود (شکل۲). تعداد ۱۱ ژن در این گروه، پس از تجزیه گروه‌بندی در کنار هم قرار می‌گیرند که ۹ تای آنها مربوط به ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش هستند و دو ژن نیز هنوز در گروه بیوشیمیایی خاصی طبقه‌بندی نشده‌اند. تعداد ۸ ژن از این ژن‌ها رمزکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری هستند. فرض بر این است که این ژن‌ها فعالیت ضد قارچی دارند و ممکن است دارای نقش‌های متعدد دیگر در پاسخ گیاه به تنش‌ها داشته باشند، اگرچه فعالیت دقیق آنها هنوز ناشناخته است (Wang et al., 2007). این ۱۱ ژن در زمان‌های مختلف و در ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این آزمایش رفتار متنوعی نشان دادند. به طوری که در ژنوتیپ‌های مقاوم (داری۶-۸۳، ال۵۲۷ و ای‌سی۱۰-۷۹) در شرایط نرمال این روند به صورتی است که در روز سوم تظاهر آنها کمتر از روز اول و هفتم است و در شرایط تنش در روز سوم تظاهر بیشتر از روز اول و هفتم است. در حالی که در ژنوتیپ نیوتانس در شرایط کنترل روند مانند ژنوتیپ‌های مقاوم و در شرایط تنش تقریباً تظاهر ثابت دارند و در ژنوتیپ ارکتوم در هر دو شرایط تظاهر ژن در طی زمان به صورت کاهشی است (شکل۳). ژن‌های مربوط به متابولیسم قند در این گروه به مرور تظاهرشان نسبت به شرایط نرمال بیشتر می‌شد به طوری که در روز اول حدود ۲ برابر نسبت به شرایط نرمال بیشتر بود و در روز هفتم به ۱۴ برابر رسید. ژن‌های مرتبط با 1Δپیرولین-۵-کربوکسیلاز سنتتاز که برای ساخت پرولین فعال هستند به مرور زمان پاسخ شدیدتری به تنش می‌دادند. به طوری که روز اول این میزان ۷ برابر، روز سوم ۲۰ برابر و روز هفتم ۲۷ برابرنسبت به شرایط نرمال تظاهر بیشتر داشتند. بنابراین می‌توان گفت که با طولانی شدن تنش (یا شدیدتر شدن آن) این ژن‌ها بیشتر بیان می‌شوند زیرا سلول به حفاظت بیشتری نیاز دارد. بیشتر ژن‌هایی که در این ۳ گروه به عنوان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش جداسازی شدند در اثر تنش تظاهر بیشتری نسبت به شرایط نرمال نشان می‌داد. این روند در آزمایش Talame et al. (2007) نیز مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

در مجموع تخمین زده می‌شود با در نظر گرفتن سیستم‌های زراعی مختلف تنش‌های غیرزیستی عملکرد را به کمتر از نصف آنچه در شرایط ایده‌آل به دست

می‌آید، می‌رسانند (Boyer, 1982). بیشتر نقاط ایران دارای شرایط آب و هوایی خشک و نیمه خشک است. جو یکی از محصولات زراعی اصلی است که در این نواحی کشت می‌شود زیرا با شرایط ذکر شده سازگاری یافته است. شناسایی ژن‌هایی که در پاسخ به تنش خشکی درگیر هستند در به‌نژادی گیاه برای مقاومت به خشکی اهمیت زیادی دارد. چرا که این ژن‌ها را می‌توان با روش‌های کلاسیک مثل تلاقی برگشتی و یا روش‌های جدید مانند انتقال ژن به ژنوتیپ‌های حساس منتقل کرد. مطالعه مسیرهای به هم متصل انتقال علائم که منجر به پاسخ‌های چندگانه به تنش‌های غیرزیستی می‌شوند با استفاده از روش‌های سنتی مشکل است زیرا مسیرهای ذکر شده پیچیده بوده و ژن‌های زیادی درگیر هستند. هم اینک ژنومیک کارکردی[1] ابزارهایی را برای فهم این مسیرها در اختیار قرار می‌دهند (Langridge et al., 2006). در این آزمایش تنش با شدت ثابت اعمال شد ولی زمان نمونه‌گیری از گیاه تا ۷ روز ادامه داشت. مهمترین ژن‌هایی که تظاهر آنها به مرور زمان شدیدتر شد گروه ژن‌های دی‌هایدرین بودند که نقش حفاظتی دارند (Zheng et al., 2004). با بررسی ژن‌های پاسخ‌دهنده مشخص می‌شود که بیشتر ژن‌ها نقش حفاظت از سلول را در برابر تنش به عهده دارند، اگرچه ژن‌های درگیر در متابولیسم قند عهده‌دار تنظیم پتانسیل اسمزی هستند. در این آزمایش تعداد زیادی ژن پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی شناسایی شدند. به علاوه نحوه بیان این ژن‌ها در ۵ ژنوتیپ مختلف و در ۳ زمان مختلف مشخص شده است. بررسی بیشتر این ژن‌ها با روش‌هایی مثل Real Time PCR ما را در رسیدن به مهمترین ژن‌ها از بین این تعداد ژن راهنمایی خواهد کرد. به علاوه طراحی نشانگرهای مولکولی بر اساس ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش در این آزمایش و استفاده از آنها برای بررسی QTLها روشی دیگر برای پیدا کردن مهمترین ژن‌ها است که می‌توان از آنها در به‌نژادی برای مقاومت به تنش خشکی استفاده کرد (Diab et al., 2004).

1. Functional Genomics



شکل۳- روند تظاهر ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی که در طی زمان در ژنوتیپ‌های مختلف و در دو شرایط تنش و کنترل متفاوت است. روند تغییرات تظاهر ژن برای ژنوتیپ‌های مقاوم کم و بیش یکسان است.

سپاسگزاری

نگارندگان از مهندس یوسفی (محقق موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش غلات) و مهندس انصاری (محقق موسسه تحقیقات دیم کشور، واحد مراغه) برای در اختیار قرار دادن نمونه‌های بذر جو قدردانی می‌کنند.

REFERENCES

1. Abraham, E. M., Huang, B., Bonos, S. A. & Meyer, W. A. (2004). Evaluation of Drought Resistance for Texas Bluegrass, Kentucky Bluegrass, and Their Hybrids. *Crop Science*, 44, 1746–1753.
2. Andjelkovic, V. & Thompson, R. (2006). Changes in gene expression in maize kernel in response to water and salt stress. *Plant Cell Reports*, 25, 71-79.
3. Babu, R. C., Zhang, J. X., Blum, A., Ho, T. H. D., Wu, R. & Nguyen, H. T. (2004). HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science*, 166, 855-862.
4. Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218, 443–448.
5. Cameron, K. D., Teece, M. A. & Smart, L. B. (2006). Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiology*, 140, 176–183.
6. De Haan, J. R., Wehrens, R., Bauerschmidt, S., Piek, E., van Schaik, R. C. & Buydens, L. M. C. (2007). Interpretation of ANOVA models for microarray data using PCA. *Bioinformatics*, 23, 184-190.
7. Diab, A. A., Teulat-Merah, B., This, D., Ozturk, N. Z., Benscher, D. & Sorrells, M. E. (2004). Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. *Theor Appl Genet*, 109, 1417-1425.
8. Dunn, M., MA, H., L, Z., RS, P., AS, Q. & PL, J. (1991). Nucleotide sequence and molecular analysis of the low temperature induced cereal gene, BLT4. *Mol Gen Genet*, 229, 389–394.
9. Durbin, B. & Rocke, D. M. (2003). Estimation of transformation parameters for microarray data. *Bioinformatics*, 19, 1360-1367.
10. Forster, B. P., Ellis, R. P., Thomas, W. T., Newton, A. C., Tuberosa, R., This, D., el-Enein, R. A., Bahri, M. H. & Ben Salem, M. (2000). The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. *Journal of Experimental Botany*, 51, 19-27.
11. Hoekstra, F., Golovina, E. & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci*, 6, 431–438.
12. Kawakami, A. & Yoshida, M. (2005). Fructan: fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta*, 223, 90–104.
13. Knudsen, S. (2002). *A biologist's guide to analysis of dna microarray data*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
14. Langridge, P., Paltridge, N. & Fincher, G. (2006). Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Bieffings in Functional Genomics and Proteomics*, 4, 343-354.
15. Lu, Y., Liu, P-Y., Xiao, P. & Deng, H-W. (2005). Hotelling's T 2 multivariate profiling for detecting differential expression in microarrays. *Bioinformatics*, 21, 3105-3113.
16. Ozturk, Z. N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C. B., Galbraith, D. W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. & Bohnert, H. J. (2002). Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol Biol*, 48, 551-573.
17. Palmiter, R. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci*, USA, 95, 8428–8430.
18. Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol*, 133, 1755-1767.
19. Ramshini, H., Peighambari, A., Shahnejat Bushehri, A., Omidi, M., Neumann, K. & Schweizer, P. (2009). Study on gene expression of barley in response to osmotic stress using macroarray. *Iranian Journal of Crop Researches*, 7, 431-442. (In Farsi).
20. Rivals, I., Personnaz, L., Taing, L. & Potier, M-C. (2007). Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? *Bioinformatics*, 23, 401-407.
21. Rocke, D. M. & Durbin, B. (2001). A model for measurement error for for gene expression arrays. *Journal of Computational Biology*, 8, 557–569.
22. Saeed, A., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V. & Quackenbush, J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34, 374-378.

23. Sreenivasulu, N., Radchuk, V., Strickert, M., Miersch, O., Weschke, W. & Wobus, U. (2006). Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling networks controlling programmed cell death and ABAregulated maturation in developing barley seeds. *The Plant Journal*, 47, 310–327.
24. Talame, V., Ozturk, N. Z., Bohnert, H. J. & Tuberosa, R. (2007). Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany*, 58, 229-240.
25. Tama´s, L., Huttova, J., Mistrı´k, I., Sˇimonovicˇova, M. & Sˇiroka, Bt. (2006). Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. *Journal of Plant Physiology*, 163, 781-784.
26. Tommasini, L., Svensson, J. T., Rodriguez, E. M., Wahid, A., Malatrasi, M., Kato, K., Wanamaker, S., Resnik, J. & Close, T. J. (2008). Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare L.*). *Functional & Integrative Genomics*, 8, 387-405.
27. Wang, H., Zhang, H., Gao, F., Li, J. & Li, Z. (2007). Comparison of gene expression between upland and lowland rice cultivars under water stress using cDNA microarray. *Theor Appl Genet*, 115, 1109-1126.
28. Wrobel, G., Chalmel, F. & Primig, M. (2005). goCluster integrates statistical analysis and functional interpretation of microarray expression data. *Bioinformatics*, (Oxford, England), 21, 3575-3577.
29. Xue, G. P., McIntyre, C. L., Glassop, D. & Shorter, R. (2008). Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Mol Biol*, 67, 197-214.
30. Zeng, F., Zhang, X., Zhu, L., Tu, L., Guo, X. & Nie, Y. (2006). Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. *Plant Molecular Biology*, 60, 167–183.
31. Zheng, J., Zhaol, J. F., Tao, Y. Z., Wang, J. H., Liu, Y. J., Fu, J. J., Jin, Y., Gao, P., Zhang, J. P., Bai, Y. F. & Wang, G. Y. (2004). Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. *Plant Molecular Biology*, 55, 807-823.