

## شناسایی و ارزیابی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای سیگنال دهی در آجیلوپس (*Aegilops tauschii*) تحت تنش شوری

مهدی منصوری<sup>۱</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۲\*</sup>، هوشنگ علیزاده<sup>۳</sup>، قاسم محمدی نژاد<sup>۴</sup>، احمد موسوی<sup>۵</sup>

و قاسم حسینی سالکده<sup>۶</sup>

۱. ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۴. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهید باهنر کرمان

۵. گروه سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران

۶. دانشیار، بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۲)

### چکیده

شور شدن زمین‌های کشاورزی یکی از مهم‌ترین عامل‌های محدودکننده تولیدات کشاورزی و تهدیدکننده امنیت غذایی در کشورهای جهان به‌شمار می‌آید. فعال شدن مسیرهای سیگنالی نخستین رخداد در شناسایی تنش‌های محیطی برای گیاهان به‌شمار می‌آید. شناسایی اجزای شبکه سیگنالی در پاسخ به تنش شوری با استفاده از روش RNA Seq در گیاه آجیلوپس به‌عنوان منشأ ژنگان (ژنوم) DD در گندم، اهمیت زیادی دارد. توالی‌یابی RNA به همراه استفاده از نرم‌افزار MapMan برای تفسیر عملکردی نتایج بیان ژن روش مناسب برای بررسی‌های ژن‌نامه شناسی (ژنومیکس) کارکردی در گیاهان به‌شمار می‌آید. لذا در این تحقیق با استفاده از کتابخانه تهیه‌شده از RNA استخراج‌شده از گیاهان کنترل و تحت تنش، اقدام به شناسایی و ارزیابی کمی ژن‌های دخیل در فرآیندهای سیگنالی شد. نتایج بیان ژن نشان داد که از بین ۴۵۰۶ رونوشت دارای تغییر بیان معنی‌دار، فرآیندهای سیگنالی با ۶۰۳ عدد BIN (۱۱/۵۹ درصد) بیشترین شمار را به خود اختصاص داد. همچنین مشخص شد که از بین اجزای شبکه سیگنالی، گیرنده (رسپتور) کینازها بیشترین شمار (۲۲۲ عدد BIN) از ژن‌های تغییربیان‌یافته را شامل می‌شوند که در واقع بیان‌کننده اهمیت آن‌ها است. این تحقیق به‌عنوان یک بررسی بنیادی به‌شمار می‌آید که زمینه برای انجام بررسی‌های انتقال ژن‌های مقاومت به شوری به گیاه گندم را فراهم می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** توالی‌یابی، شوری، فرآیندهای سیگنالی، RNA Seq.

### مقدمه

کاهش نمی‌یابد (Chinnusamy *et al.*, 2005). یکی از راهکارهای پایدار و اقتصادی برای رویارویی با تنش‌های غیر زیستی استفاده از به‌هنژادی و اصلاح مولکولی گیاهان برای تحمل بیشتر است (Ashraf *et al.*, 2009). بررسی تفاوت‌های گیاهان بسیار نزدیک از نظر خویشاوندی، عملی مطلوب برای بررسی سازوکارهای مختلف تحمل به

پدیده گرم شدن کره زمین همراه با کاهش منابع آب برای کشاورزی و افزایش شوری زمین‌های کشاورزی، تهدیدکننده امنیت غذایی است. بعضی از گیاهان تحمل بیشتری به شوری دارند و از نظر زراعی، عملکرد این گیاهان به‌اندازه دیگر گیاهان در تنش شوری یکسان

پيام‌رسان‌های دوم مسئول تنظيم سطح کلسيم درون‌ياخته‌ای هستند. تغييرهای سطح کلسيم با استفاده از حسگرهای ویژه‌ای که به‌عنوان پروتئين‌های متصل‌شونده به کلسيم شناخته می‌شوند اندازه‌گیری می‌شوند. حسگرهای کلسيم، آغازکننده واکنش‌های آبخاری فسفرزایی (فسفریلاسیون) هستند که پیامد آن فعال شدن ژن‌های دخيل در پاسخ به تنش و عامل‌های رونویسی است (Xiong et al., 2002). محصول ژن‌های فعال شده باعث افزایش سازگاری گیاه به تنش می‌شود. مسیر سیگنالی SOS (Salt Overly Sensitive) یکی از مسیرهای بیوشیمیایی اختصاصی در تنش شوری است که اجزای آن ژن‌های SOS1، SOS2 و SOS3 است که در واقع حسگرهای میزان کلسيم ياخته هستند (Mahajan et al., 2008). مسیر SOS در پاسخ به تنش یونی ناشی از شوری فعال می‌شود و مسیرهای پروتئين کینازی غير وابسته به SOS در پاسخ به تنش اسمزی ناشی از شوری فعال می‌شوند. تغيير در میزان کلسيم سيتوزولی باعث فعال شدن پروتئين SOS3 می‌شود که این پروتئين نیز از راه فسفرزایی باعث فعال شدن پروتئين‌های دیگر و در نتیجه تنظيم فعالیت پمپ‌های یونی برای تنظيم تعادل یونی می‌شود (Ahmad, 2012). شناسایی مسیرهای مولکولی و همچنین مولکول‌های واسط که در انتقال و پردازش تنش در گیاهان نقش دارند، بسیار مهم و پایه‌ای است. برهم‌کنش بین چندین شبکه پیچیده انتقال سیگنال در گیاهان، باعث ظهور مقاومت به تنش شوری می‌شود (Zhu, 2001). فرآیند (پروسه) سیگنال‌دهی در گیاهان به اجزا و روش‌های متفاوتی در گیاهان انجام می‌شود (Yang, 2008). بررسی مسیرهای سیگنال‌دهی برای تولید گیاهان مقاوم اهمیت بالایی دارد.

نسل جدید فناوری توالی‌یابی امکان بررسی‌های رونوشت‌برداری (ترانسکریپتومی) با دقت و کارایی بسیار بالا را فراهم کرده است. پلات فرم‌های مختلفی از شرکت‌های همچون Illumina, Applied Biosystems, Roche و Helicos Bioscience متعلق به نسل جدید دستگاه‌های توالی‌یاب معرفی شد که به لحاظ فنی تفاوت‌هایی با هم دارند (Metzker, 2010). در روش

تنش شوری بوده و امکان شناسایی عامل‌های مؤثر در ایجاد تحمل به شوری را فراهم می‌آورد (Xie & Nevo, 2008). گندم نان (*Triticum aestivum*) مهم‌ترین محصول غذایی در جهان به شمار می‌آید که غذای اصلی مردم ۴۳ کشور جهان بوده و نزدیک به ۲۰ درصد از کل کالری غذایی و پروتئين ۴/۵ میلیارد نفر را تشکیل می‌دهد (Peng et al., 2011). گندم شش‌گان یا گیاهی شش‌لاد (هگزاپلوئید AABBDD) است که ناشی از تلاقی بین *Aegilops tauschii* (DD) با گونه چهارلاد یا چهارگان (تتراپلوئید AABB) *Triticum turgidum* در حدود ۸۰۰۰ سال پیش است. ژنگان (ژنوم) DD نقش مهمی در انتقال صفات تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به گیاه گندم دارد (Jia et al., 2013; Monneveux et al., 2000).

شوری تأثیر فیزیولوژیک و بیوشیمیایی زیانباری روی گیاهان دارد. پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی در سطوح فیزیولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی ارزیابی شده است (Hasegawa et al., 2000). به دلیل اینکه گیاهان موجودهای ساکنی هستند، توانایی ویژه‌ای را در درک شرایط محیطی پیدا کرده‌اند و به تناسب شرایط محیط تغییرپذیری‌های فیزیولوژیکی برای بقاء را در کوتاه‌ترین زمان اعمال می‌کنند (Yang, 2008). گیاهان در پاسخ به تنش‌ها، برهم‌کنش‌های پیچیده، پویا (دینامیک) و چندگانه‌ای بین اسیدهای نوکلئوتیک، پروتئين‌ها و سوخت‌وسازگر (متابولیت)‌ها انجام می‌دهند (Pandey, 2015).

محرک‌های خارجی با اتصال به مولکول‌های گیرنده اختصاصی، آغازکننده شبکه سیگنال‌دهی پیچیده‌ای در پایین‌دست می‌شوند (Osakabe et al., 2013). بسیاری از اجزای مسیرهای سیگنالی در گیاهان با استفاده از روش‌های زیست‌شناختی (بیولوژی) مولکولی شناسایی شده است و ظهور روش‌های جدید و استفاده از فناوری‌های امیکس (Omics) متفاوت، عمق دانش در زمینه درک سازوکارهای گیاهان را افزایش داده است. به‌طور کلی یک مسیر سیگنالی با شناسایی و دریافت سیگنال به‌وسیله گیرنده‌های ياخته آغاز می‌شود و با تولید مولکول‌های پیام‌رسان دوم همچون ROS و فسفات اینوزیتول ادامه می‌یابد.

## مواد و روش‌ها

### آزمایش گلخانه‌ای و اعمال تنش شوری

در این آزمایش از یک نمونه بانک ژنی (اکسیشن) از گونه *Ae. tauschii* که بر پایه آزمایش‌های پیشین به‌عنوان گونه مقاوم به شوری شناسایی شده بود، استفاده شد. بدین منظور بذرها با استفاده از هیپوکلیت سدیم ۱ درصد ضدعفونی شد و درون پتری‌دیش در شرایط تاریک و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. سپس بذرها جوانه‌زده به گلدان‌های حاوی مخلوط ماسه به قطر ۱ سانتی‌متر منتقل شد. به‌منظور افزایش دقت در اعمال تنش از سامانه آبکشی (هایدروپونیک) استفاده شد تا به‌صورت دقیق روی عناصر کنترل انجام شود. گلدان‌ها درون ظرف‌های بزرگی به حجم ۳۰ لیتر قرار گرفت و با استفاده از یک سامانه آبکشی بسته همسان با آنچه در مقاله مونز و جیمز (Munns & James, 2003) استفاده شده بود طراحی شد. از محلول هوگلد بنا بر دستور کار مونز استفاده شد (Munns, 2013). گیاهان در مرحله رشد رویشی و در زمان شش‌برگی تحت تنش شوری قرار گرفتند. برای اعمال تنش از غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl به همراه ۱۲ میلی‌مولار CaCl<sub>2</sub> به‌عنوان مکمل استفاده شد. همچنین تنش به‌صورت تدریجی آغاز شد (از غلظت ۵۰ میلی‌مولار آغاز شد و در طول دو روز به تنش ۲۰۰ میلی‌مولار رسید) تا از تکانه (شوک) اسمزی به گیاه جلوگیری شود. برای ارزیابی پاسخ گیاه در مرحله تنش ناشی از تجمع یون سدیم، تنش به مدت هفت روز پس از رسیدن به سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار ادامه یافت و سپس نمونه‌برداری انجام شد. آزمایش در گلخانه تحقیقاتی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۳ به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد.

### اندازه‌گیری غلظت یون‌ها

برای تأیید اعمال تنش و اندازه‌گیری غلظت یون‌ها، با استفاده از نورسنج شعله‌ای (فلیم فوتومتر) میزان عناصر سدیم و پتاسیم در بافت‌های برگ و ریشه اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۵ گرم بافت خشک‌شده با استفاده از هاون پودر شد. سپس در کوره با دمای

RNA-Seq میلیون‌ها قطعه از توالی cDNA به‌دست می‌آید که این قطعه‌ها با استفاده از برنامه‌های یارانه‌ای روی یک ژنگان مرجع و یا روی یک رونوشت‌برداری که به‌صورت De novo assembly تهیه شده است منطبق می‌شود و ساختار رونوشت‌برداری و میزان بیان هر یک از ژن‌ها قابل ارزیابی می‌شود (Mortazavi *et al.*, 2008). استفاده از نسل جدید توالی‌یاب‌ها در بررسی‌های رونوشت‌برداری به‌رغم کاهش هزینه، اطلاعاتی کمی و کیفی همچون شناسایی همریخت (ایزوفرم)‌های مختلف از یک ژن و رویدادهای پیرایش (Splicing)، بررسی‌های کمی و ارزیابی شمار رونوشت‌های هر ژن، شناسایی ویرایش‌های پس از رونوشت برداری و همچنین امکان شناسایی تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی را فراهم می‌کند که همه این اطلاعات، شناخت عمیق‌تری از ژنگان و رونوشت ارائه می‌کنند (Wang *et al.*, 2009).

استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی و الگوریتم‌های محاسباتی برای تفسیر عملکردی (Annotation) اطلاعات ناشی از توالی‌یابی امکان شناسایی و بررسی سازوکارهای یاخته‌ای و زیستی موجود در یاخته را فراهم می‌کند. نرم‌افزار MapMan (Thimm, 2004) یکی از ابزارهای توانمند و اختصاصی گیاهان است که با داشتن اطلاعات بیش از ۴۸ گونه گیاهی، انتخاب مناسبی برای تفسیر نتایج حجیم پروژه‌های توالی‌یابی در گیاهان به شمار می‌آید (Lohse, 2013).

گیاه آجیلوپس به‌عنوان یکی از اجداد گندم نان به‌شمار می‌آید که منشأ ژنگان DD در گندم است (Petersen *et al.*, 2006). این گیاه در اصلاح نباتات متداول (کلاسیک) و پیشرفته اهمیت ویژه‌ای دارد و به‌عنوان یک منبع از صفات و ژن‌های مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی شناخته می‌شود (Jia *et al.*, 2013).

در این تحقیق با هدف شناسایی اجزای مسیر سیگنالی در گیاه آجیلوپس از یک ژنوتیپ که در آزمایش‌های گلخانه‌ای پیشین به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ به تنش شوری در بین ژنوتیپ‌های موجود در بانک ژن دانشگاه تهران بود استفاده شد که می‌تواند به‌عنوان یک بررسی پایه‌ای برای انتخاب ژن‌ها و راهبردها برای استفاده در اصلاح مولکولی گندم استفاده شود.

مشخصه این قالب وجود اطلاعات کیفیت توالی‌یابی برای هر نوکلئوتید توالی‌یابی شده است. داده‌های خام حاوی خوانش‌های (Read) نامطلوبی همچون سازگارکننده‌ها و خوانش‌هایی که نوکلئوتیدهای ناشناخته دارند با استفاده از نرم‌افزار Fastx Toolkit، پیش از آغاز تجزیه و تحلیل‌های اصلی در فرآیند ارزیابی و کنترل کیفیت حذف شد. خوانش‌های با شاخص کیفیت  $Q > 20$  در تجزیه و تحلیل‌های بعدی استفاده شد. از نرم‌افزار Trinity (Grabherr *et al.*, 2011) برای بازسازی رونوشت به صورت De novo استفاده شد. نرم‌افزار Trinity از روش همگذاری (Assembly) و هم‌ردیف کردن (Aligning) و اتصال توالی‌های کوتاه با استفاده از روش نگاره (گراف)‌های De Bruijn، بازسازی رونوشت و تشکیل کانتیگ‌ها را انجام می‌دهد. رونوشت بازسازی‌شده به‌عنوان مرجع برای بررسی‌های عملکردی و شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت استفاده می‌شود. برای شناسایی یونی ژن‌های با بیان متفاوت از بسته نرم‌افزاری RSEM (Li, 2011) و نرم‌افزار EdgeR (Robinson, 2010) استفاده شد. تفسیر عملکردی یونی ژن‌های با بیان متفاوت با استفاده از وب سرور <http://MapMan.gabipd.org/web/guest/app/> (Mercator) انجام شد. این برنامه اینترنتی به‌صورت برخط با استفاده از الگوریتم‌های BLAST، RPSBLAST و Interproscan اقدام به شناسایی پروتئین‌ها و دُمین‌های پروتئینی می‌کند و با استفاده از الگوریتم‌های تعریف‌شده بر پایه میزان همسانی توالی‌های درخواستی با پایگاه داده مرجع موجود در وب سرور، اقدام به تخصیص یک عدد BIN به هر توالی می‌کند. هر عدد BIN مخصوص به یک گروه عملکردی مشخص است و در مجموع ۳۵ عدد BIN اصلی و یا به عبارتی ۳۵ گروه عملکردی جداگانه از نظر زیستی وجود دارد که هر عدد BIN، زیرشاخه‌های جزئی‌تری را شامل می‌شود و در مجموع حدود ۱۹۰۶ عدد BIN مشخص شده وجود دارد. از نرم‌افزار MapMan برای تفسیر نتایج و رسم شکل‌های مربوط به مسیرهای زیست‌ساختی (بیوسنتزی) استفاده شد. چارچوب کاری استفاده شده برای تجزیه و تحلیل‌های رایانه‌ای به همراه نرم‌افزارهای استفاده شده در شکل ۱ آورده شده است.

۵۸۰ درجه سلسیوس به مدت چهار ساعت قرار گرفت. به نمونه‌های خاکستر به‌دست‌آمده ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۲ نرمال اضافه شد و با عبور از کاغذ صافی محلول نهایی به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از دستگاه نورسنج شعله‌ای شرکت زایس غلظت هر نمونه نسبت به منحنی استاندارد خوانده شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون  $t$  در سطح معنی‌داری  $P \leq 0.01$  انجام شد.

### استخراج RNA و ارزیابی‌های کمی و کیفی

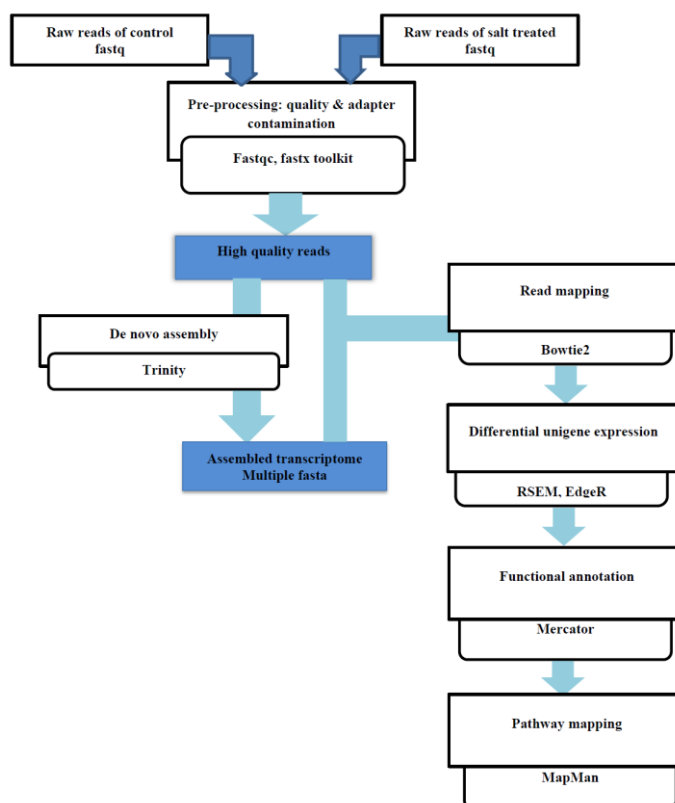
برگ انتهایی گیاهان کنترل و تحت تنش، پس از نمونه‌برداری درون نیتروژن مایع قرار گرفت و تا هنگام استخراج RNA به فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سلسیوس منتقل شد. استخراج RNA با استفاده از محلول TRIzol (Invitrogen) بنا بر دستور کار شرکت سازنده انجام شد و سپس RNA استخراج‌شده تحت تیمار آنزیم DNase I (Fermentas) قرار گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و دستگاه بیوآنالیزر ۲۱۰۰ (Agilent) ارزیابی شد.

### ساخت کتابخانه cDNA

ساخت کتابخانه cDNA و توالی‌یابی توسط انستیتو ژنومیکس پکن (BGI) و با استفاده از پلات‌فرم Illumina HiSeq2000 انجام شد. به‌طور خلاصه، RNA استخراج‌شده تحت تیمار DNase قرار گرفت و mRNAهای با دم پلی A با استفاده از دانه‌های متصل به Oligo dT جداسازی شد. پس از خرد کردن mRNAها به قطعه‌های کوچک‌تر، با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس به cDNA تبدیل شدند. پس از ساخت (سنتز) رشته دوم و اضافه کردن زنجیره پلی A، سازگارکننده (آداپتور) ویژه توالی‌یابی نیز اتصال داده شد و با استفاده از کیت Illumina بنا بر دستور کار شرکت سازنده توالی‌یابی انجام شد.

### تجزیه و تحلیل‌های رایانه‌ای نتایج توالی‌یابی

نتایج به‌دست‌آمده از توالی‌یابی به‌صورت فایل‌هایی در قالب (Format) fastq از شرکت BGI دریافت شد.



شکل ۱. ترتیب و نام نرم‌افزارهای استفاده شده برای تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی به دست آمده از کتابخانه cDNA تهیه شده از گیاهان کنترل و تحت تنش شوری

Figure 1. RNA-seq analysis workflow of *Aegilops tauschii* under control and salt treated samples.

تیمار شوری نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد که این نتایج بیانگر اعمال تنش در گیاه مورد آزمایش بود. در غلات میزان کم سدیم/پتاسیم ( $K^+/Na^+$ ) به عنوان یک شاخص مهم در انتخاب گیاهان متحمل نسبت به گیاهان حساس به شوری به شمار می‌آید. افزایش میزان یون سدیم و کاهش نسبت  $K^+/Na^+$  در گیاه گندم در معرض تنش شوری در منابع گزارش شده است (Schachtman & Munns, 1992).

## نتایج و بحث

### اندازه‌گیری غلظت یون‌ها در بافت‌ها

نتایج تجزیه واریانس گویای تفاوت معنی‌دار غلظت سدیم و پتاسیم و همچنین نسبت پتاسیم به سدیم در بافت‌های ریشه و برگ‌های انتهایی در حضور شوری در مقایسه با تیمار بدون شوری در سطح احتمال ۱ درصد بود. اعمال شوری سبب افزایش غلظت یون سدیم در بافت ریشه و برگ شد، درعین حال غلظت یون پتاسیم در این دو بافت و همچنین نسبت یون پتاسیم به سدیم در

جدول ۱. تجزیه واریانس غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم و نسبت  $K^+/Na^+$  در بافت برگ و ریشه گیاه آجیلوپس نمونه کنترل و تحت تنش شوری

Table 1. Analysis of variance of  $[Na^+]$ ,  $[K^+]$  and  $[K^+]/[Na^+]$  ratio in leaf and root tissues in *Aegilops tauschii* during salinity stress

Source of variation	df	Mean square		
		$[Na^+]$	$[K^+]$	$[K^+]/[Na^+]$
Salinity	1	932.45**	48.12**	202.15**
Tissue	1	415.59**	3945.45**	302.67**
Salinity × Tissue	1	260.96**	8.15**	122.18**
Error	8	0.1351	0.3215	0.0854
CV (%)		2.9	2.06	4.72

\*\* : Significant at  $\alpha \leq 0.01$ .

\*\* : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد ( $\alpha \leq 0.01$ ).

**استخراج RNA و ارزیابی های کمی و کیفی**

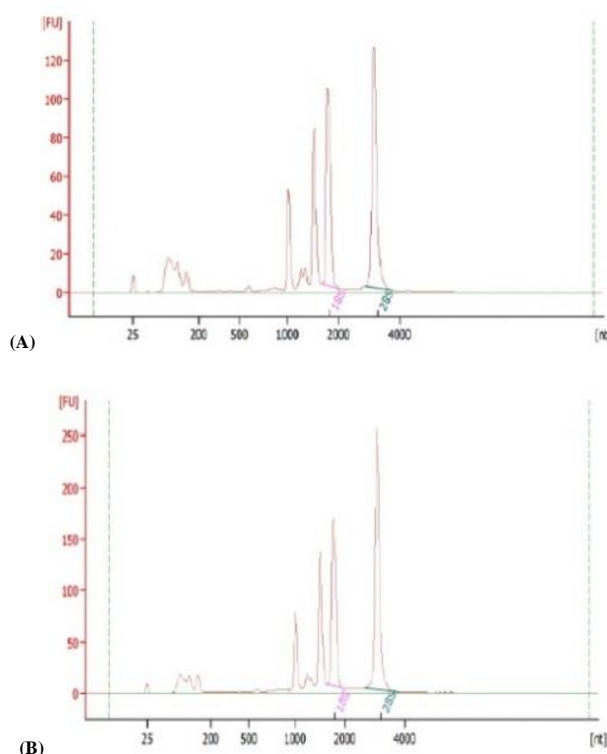
شاخص های کمی و کیفیت RNA استخراج شده به همراه نمودارهای به دست آمده از دستگاه بیوانالیزر در جدول ۲ و شکل ۲ آورده شده است. نتایج کنترل کیفیت RNA، نشان دهنده مطلوب بودن RNA استخراج شده برای ساخت کتابخانه برای

توالی یابی است. یکی از شاخص های مهم در ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده عدد RIN است که با استفاده از دستگاه بیوانالیزر تعیین می شود و به عنوان مؤلفه ای برای میزان تجزیه شدن RNA است و دامنه اعداد آن بین یک تا ده است که اعداد بالای هفت نشان دهنده کیفیت مطلوب برای توالی یابی خواهد بود.

جدول ۲. شاخص های کمی و کیفیت RNA استخراج شده از برگ های گیاه آجیلوپس نمونه کنترل و تحت تنش شوری

Table 2. Quantity and quality of extracted RNA in control and salt treated leaf tissue in *Aegilops tauschii*

Sample	Concentration (ng/μl)	OD	OD	RIN
		260/280	260/230	
Control	2435	2.14	2.18	7.8
Salt treated	1465	2.15	2.18	7.4



شکل ۲. تصاویر تهیه شده با دستگاه بیوانالیزر مربوط به کیفیت RNA استخراج شده از بافت برگ گیاه آجیلوپس

(A) گیاه کنترل (B) گیاه تحت تنش شوری

Figure 2. Electropherograms of extracted RNA from control (A) and salt treated (B) leaf tissue in *Aegilops tauschii* using Bioanalyzer 2100.

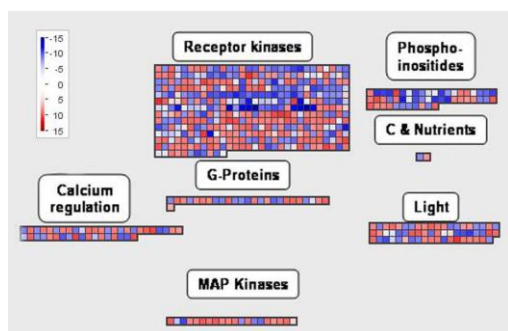
**توالی یابی، ارزیابی کیفیت و بازسازی رونوشت**

نتایج به دست آمده از توالی یابی شامل ۴۵۱۵۶۰۱۲ خوانش برای گیاه کنترل و ۵۳۴۰۶۶۱۴ خوانش با طول ۹۰ تایی برای گیاه تحت تنش شوری بوده است. نتایج توالی یابی نشان داد که حجم اطلاعات تولیدی و همچنین کیفیت توالی یابی بسیار خوب بوده است.

ارزیابی کیفیت و حذف توالی های سازگاری و خوانش های Fastx Toolkit نامطلوب با استفاده از نرم افزار انجام شد. برای استفاده از نرم افزار Trinity از خوانش های با شاخص کیفیت  $Q > 20$  استفاده شد. همگذاری De novo برای گیاهانی که ژنگان آنها توالی یابی نشده و یا موجودهایی که ژنگان توالی یابی شده

کنترل و تنش با استفاده از نرم‌افزار EdgeR محاسبه شد. نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد که در مجموع ۴۵۰۶ یونی ژن به صورت معنی‌دار ( $FDR \leq 0.05$ ) تغییر بیان یافته بودند که ۲۲۳۷ یونی ژن افزایش بیان و ۲۲۶۹ یونی ژن کاهش بیان نشان دادند. نتایج آنتولوژی با استفاده از وب سرور Mercator نشان داد که ۶۰۳ عدد BIN (۱۱/۵۹ درصد) اختصاص داده شده به یونی ژن‌های با بیان متفاوت در فرآیندهای سیگنال‌دهی نقش دارند. در واقع فرآیند سیگنال‌دهی بیشترین شمار یونی ژن را به خود اختصاص داد و پس از BIN مربوط به فرآیند سیگنال‌دهی BIN‌های مربوط به پروتئین (۵۹۶ عدد)، RNA (۴۶۴ عدد) و استرس (۳۰۲ عدد) در مرتبه‌های بعدی به لحاظ شمار را شامل می‌شدند.

برای مشاهده آنتولوژی ژن‌های دخیل در فرآیند سیگنال‌دهی به صورت نگاره‌ای نتایج مربوط به تغییرپذیری میزان بیان ژن‌های مربوط به فرآیند سیگنال‌دهی در نرم‌افزار MapMan وارد شد. شکل ۳ به صورت نگاره‌ای شمار و میزان بیان ژن‌های دخیل در هر کلاسه (گروه) را نشان می‌دهد.



شکل ۳. شمار و میزان بیان یونی ژن‌های با بیان متفاوت متأثر از تنش شوری در گیاه آجیلوپس به هفت گروه از مسیرهای سیگنال‌دهی در نرم‌افزار MapMan. هر یونی ژن به صورت یک مربع نمایش داده شده است و میزان افزایش و کاهش بیان آن‌ها به صورت شدت رنگ در مقیاس ۱۵ برابر افزایش بیان تا ۱۵- برابر کاهش بیان به صورت قرمز و آبی نشان داده شده است.

Figure 3. Regulation overview of differentially expressed unigenes during salt stress generated by MapMan. Log<sub>2</sub> fold changes are indicated by the colour scale; blue squares represent up-regulated genes and red squares represent down-regulated genes.

آن‌ها به‌طور کلی تفسیر نشده، مناسب است (Grabherr *et al.*, 2011). در این تحقیق استفاده از روش‌های مبتنی بر ژنگان مرجع نتایج شایان پذیرشی را تولید نکرد لذا از روش De novo استفاده شد. نرم‌افزار Trinity یکی از رایج‌ترین و بهترین نرم‌افزارها برای بازسازی رونوشت و همگذاری اطلاعات RNA-Seq است (Li, 2014). شاخصه‌های ارزیابی رونوشت بازسازی‌شده در جدول ۳ نشان‌دهنده کیفیت مناسب رونوشت بازسازی شده است. شاخصه‌هایی همچون شمار یونی ژن تولید شده و N50 و میانگین طول یونی ژن‌های تولیدی از جمله رایج‌ترین شاخصه‌ها برای ارزیابی کیفیت رونوشت بازسازی‌شده به شمار می‌آید (Amin *et al.*, 2014; Cardoso-Silva *et al.*, 2014; Moreton *et al.*, 2014). بدیهی است که هر چه طول یونی ژن‌ها و شمار آن‌ها بیشتر باشد در جستجوی BLAST شمار رکوردهای بیشتری در پایگاه‌های اطلاعاتی به دست می‌آید و در نتیجه تفسیر عملکردی دقیق‌تری از نتایج به دست می‌آید.

جدول ۳. شاخصه‌های مربوط به رونوشت بازسازی‌شده از مجموع خوانش‌های به دست آمده از کتابخانه گیاه آجیلوپس نمونه کنترل و تحت تنش شوری، توسط نرم‌افزار Trinity

Table 3. Statistics of transcriptome in *Aegilops tauschii* assembled using Trinity.

Unigenes generated	255,446
Total unigene length	357,329,262
N50	2269
Unigenes $\geq 1$ Kb	133,012
Average unigene length	1,398
Median unigene length	973
Maximum unigene length	16,180
Minimum unigene length	201
GC content	47.37

شناسایی و تفسیر عملکردی ژن‌های تغییر بیان یافته برای شناسایی رونوشت‌هایی که به صورت معنی‌دار تحت تنش شوری قرار گرفته‌اند و میزان بیان آن‌ها تغییر کرده است در آغاز خوانش‌های مربوط به کتابخانه گیاه کنترل و تحت تنش به صورت جداگانه با استفاده از نرم‌افزار Bowtie (Langmead *et al.*, 2009) روی رونوشت بازسازی‌شده منطبق و شمار خوانش به ازای میلیون (Transcript per million) توسط RSEM محاسبه شد. سپس تفاوت بیان هر یونی ژن با مقایسه TPM یونی ژن بین شرایط

نقش دارند. Serra *et al.* (2013) ژن osRMC را که در تنش شوری در گیاه برنج نقش دارد را شناسایی کردند که در واقع به عنوان یک گیرنده شبه کینازی است. همچنین در یک بررسی که نزدیک به ۱۵۰۰ ژن را با استفاده از فناوری ریزآرایه بررسی کردند نقش گیرنده‌های شبه کینازی به طور کلی برجسته بود (Ma *et al.*, 2006).

در این تحقیق ۴۳ یونی ژن متعلق به گروه‌های مختلف از پروتئین‌های دخیل در فرآیند سیگنال‌دهی با واسطه یون کلسیم به صورت معنی‌داری تغییر بیان یافت که بیست عدد از یونی ژن‌ها کاهش بیان و ۲۳ عدد از آن‌ها افزایش بیان نشان دادند. مشخص شده است که کلسیم ( $Ca^{2+}$ ) یکی از مهم‌ترین عامل‌های تنظیمی و سیگنال‌دهی درون‌یاخته به شمار می‌آید که در طیف گسترده‌ای از عملکردهای یاخته نقش دارد و به صورت خیلی دقیقی تنظیم می‌شود (Yang, 2008). غلظت کلسیم ( $Ca^{2+}$ ) سیتوزولی در سطح میکرومولار قرار دارد و پس از اعمال تنش مقدار کلسیم ( $Ca^{2+}$ ) موجود در سیتوپلاسم به صورت موقتی و به کل مشخصی افزایش می‌یابد. این افزایش از راه مسیرهای موجود در غشا سیتوپلاسمی و غشاهای اندامک‌هایی همچون واکوئل، شبکه اندوپلاسمی و میتوکندری‌ها انجام می‌شود (Hetherington & Brownlee, 2004; Dodd *et al.*, 2010). خانواده بزرگ ژنی از پروتئین‌های حسگر یون کلسیم ( $Ca^{2+}$ ) در گیاهان وجود دارد که مسئول کنترل سطح کلسیم ( $Ca^{2+}$ ) یاخته را بر عهده دارند که در مقاله مروری Defalco *et al.* (2010) تشریح شده است.

ارزیابی آنولوژی ژن‌های تغییر بیان یافته در اثر تنش شوری نشان داد که فرآیند سیگنال‌دهی بیشترین شمار (در مجموع ۶۰۳ BIN) از یونی ژن‌ها را به خود اختصاص داده است. در این سامانه سلسله مراتبی فرآیند سیگنال‌دهی به زیرشاخه‌هایی همچون سیگنال‌دهی با گیرنده (رسپتور) کینازها، کلسیم، پروتئین G، میتوزن اکتیو کیناز (MAP Kinase) و دیگر، تقسیم می‌شود که شمار BIN مربوط به هر زیرشاخه در جدول ۴ آورده شده است.

نتایج نشان داد که سیگنال‌دهی با استفاده از پروتئین‌های گیرنده کینازی بیشترین شمار یونی ژن را به خود اختصاص داد. مشخص شد که از بین ۲۲۲ یونی ژن مرتبط با گیرنده کینازها ۱۲۳ عدد از آن‌ها کاهش بیان و ۹۹ عدد از آن‌ها افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند. بررسی‌های انجام شده نشان داده است که گیرنده کینازها از بزرگ‌ترین خانواده‌های ژنی در بین گیرنده‌های سطحی یاخته‌ها در گیاهان به شمار می‌آیند که تنظیم‌کننده فرآیندهای سیگنال‌دهی بین یاخته‌ای است. به لحاظ ساختاری دُمین‌های کینازی و گیرندگی دارند که گیرنده کینازهای با دُمین غنی از لوسین (LRR) بزرگ‌ترین گروه را شامل می‌شوند. دُمین کینازی مسئول اضافه کردن گروه فسفات، در فرآیند فسفورزایی به پروتئین‌ها بوده که این فرآیند باعث فعال شدن آبشارهای سیگنال‌دهی است. دُمین‌های غنی از لوسین شامل توالی تکراری از ۲۴-۲۹ اسید آمینه لوسین است (Yang, 2008). این خانواده ژنی در بسیاری از فرآیندهای تنظیمی یاخته همچون رشد، تمایز اندام‌ها، تنش‌های زیستی و غیرزیستی

جدول ۴. شمار یونی ژن‌ها و شمار BIN‌های اختصاص یافته بر پایه زیرشاخه‌های دخیل در سیگنال‌دهی در گیاه آجیلوپس

تحت تنش شوری

Table 4. Categorization of differentially expressed unigenes of *Aegilops tauschii* in response to salinity stress into signaling process; BIN code 30.

Code BIN	CLASS	No. BIN	No. Unigene
30.1	signalling.in sugar and nutrient physiology'	2	2
30.2	signalling.receptor kinases	401	222
30.3	signalling.calcium	43	43
30.4	signalling.phosphoinositides	51	51
30.5	signalling.G-proteins	26	26
30.6	signalling.MAP kinases	20	14
30.8	signalling.mis	1	1
30.11	signalling.light	59	53



طبقه‌بندی می‌شوند. به محض اینکه گیرنده‌های غشایی باعث فعال شدن MAP3K شد یک آبشار کینازی در سیتوپلاسم تا فعال کردن ژن‌های هدف که شامل آنزیم‌ها و یا عامل‌های رونوشت برداری می‌شود فعال می‌شود (, Khokhlatchev *et al.*, 1998; Sinha *et al.*, 2011; Wurzinger *et al.*, 2011). نقش چندین MAPK در تنش شوری توسط محققان مختلف گزارش شده است (, Sanan-Mishra *et al.*, 2006; Matsuoka *et al.*, 2002).

نور یکی از محرک‌های محیطی است که در فرآیندهای مختلف اعم از جوانه‌زنی بذر و رشد نقش دارد. گیاهان دارای یک‌چند از گیرنده‌های نوری، گیافام (فیتوکروم) و سامانه سیگنال‌دهی برای انتقال پیام به مسیرهای پایین‌دستی هستند (Chory, 2010). تنظیم‌کننده‌های میانی در مسیر سیگنال‌دهی شامل FAR1 و FHY3 هستند (Hudson *et al.*, 1999; Wang & Deng 2002). بررسی‌های زیادی نشان داده است که این دو ژن در فرآیندهایی همچون ساعت زیست‌شناختی (بیولوژیکی)، گل‌دهی، مرگ کنترل‌شده یاخته‌ای، تنظیم و تعادل ROS، سیگنال‌دهی باواسطه آبسزیک اسید، تقسیم کلروپلاست‌ها و زیست‌ساخت سبزینه (کلروفیل)ها نقش دارد و پیش‌بینی می‌شود که دامنه فعالیت این ژن‌ها گسترده‌تر از آنچه تاکنون شناخته شده، هستند (Lin & Wang, 2004; Allen *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013). ارتباط بین FAR1 با تنش‌های غیرزیستی از راه برهم‌کنش با مسیر سیگنال‌دهی آبسزیک اسید مشخص شده است (Wang & Wang 2015). در بررسی که روی ژن‌های FAR1 و FHY3 در علف تال انجام شد، مشخص شد که میزان بیان این دو ژن در شرایط تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار) ۴-۵ برابر افزایش می‌یابد (Tang *et al.*, 2013). نتایج نشان داد که از بین ۵۳ ژن متعلق به گروه‌های مختلف از پروتئین‌های دخیل در فرآیند سیگنال‌دهی نوری، ۲۳ عدد از ژن‌ها کاهش بیان و سی عدد از آن‌ها افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که مهم‌ترین سازوکار یاخته

نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد که ۵۱ یونی ژن متعلق به گروه‌های مختلف از پروتئین‌های دخیل در فرآیند سیگنال‌دهی باواسطه فسفات اینوزیتول، به صورت معنی‌داری تغییر بیان می‌یابد که ۳۲ عدد از یونی ژن‌ها کاهش بیان و ۱۹ عدد از آن‌ها افزایش بیان نشان دادند. فسفات اینوزیتول یک فسفولیپید غشایی است که در سیگنال‌دهی، تنظیم عملکرد آنزیم‌های غشایی و مسیرهای یونی و تنظیم ترافیک غشاهای یاخته‌ای نقش دارد (, Suh *et al.*, 2010; Falkenburger *et al.*, 2006). در گیاه برنج سطح فسفاتیدیل اینوزیتول بیس فسفات (PIP2) پس از تنش شوری افزایش می‌یابد (, Darwish *et al.*, 2009). عملکرد فسفولیپاز C در ارتباط با مسیر سیگنال‌دهی باواسطه ABA و تنظیم باز و بسته شدن روزنه‌ها است (, Hunt *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2004).

پروتئین‌های متصل‌شونده به GTP که به پروتئین‌های G شناخته می‌شوند عضو خانواده پروتئینی هستند که دُمین آبکافت (هیدرولیز)کننده GTP دارند. نقش پروتئین‌های G در فرآیندهای مسیرهای یونی، سیگنال‌دهی به واسطه آبسزیک اسید و تنظیم تقسیم یاخته در علف تال (آرابیدوپسیس) بررسی شده است. بررسی‌های الکتروفیزیولوژیکی نقش پروتئین‌های G در تنظیم مسیرهای یونی پتاسیم را نشان داده است (, Li & Assmann, 1993; Wu & Assmann, 1994; Saalbach *et al.*, 1999). در این تحقیق ۲۶ یونی ژن متعلق به گروه‌های مختلف از پروتئین‌های دخیل در فرآیند سیگنال‌دهی باواسطه پروتئین‌های G به صورت معنی‌داری تغییر بیان یافت که دوازده عدد از یونی ژن‌ها کاهش بیان و چهارده عدد از آن‌ها افزایش بیان نشان دادند.

نتایج این تحقیق نشان داد که بیشتر (ده عدد از مجموع چهارده عدد) یونی ژن‌های مرتبط با MAP کینازهای دخیل در سیگنال‌دهی، افزایش بیان معنی‌داری در پاسخ به تنش شوری می‌یابد. انواع مختلف از پروتئین کینازها نقش مهمی در تنظیم سیگنال‌دهی در شرایط تنش را بر عهده دارند. MAP کینازها در خانواده بزرگ سرین-ترئونین کینازها

گیاهان گرامینه برای تولید رقم‌های مقاوم قابل استفاده هستند.

### سیاسگزاری

هزینه‌های این تحقیق با استفاده از طرح شماره ۹۰۰۰۳۹۸۴ مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران نهاد ریاست جمهوری تأمین شده است. از مسئولان مربوط، تشکر و قدردانی می‌گردد.

در پاسخ گیاه به تنش شوری فرآیند سیگنال دهی است و این فرآیند با ابزارهای مختلفی در یاخته اعمال می‌شود. همچنین مشخص شد که گیرنده کینازها از راه تغییرپذیری پس از ترجمه مهم‌ترین نقش را در انتقال سیگنال و تنظیم پاسخ گیاه بر عهده دارند. از آنجاکه گونه انتخاب شده یک گونه مقاوم بوده توالی‌های به دست آمده در این تحقیق که ناشی از رونوشت برداری در یاخته است به عنوان یک منبع مهم برای انتخاب و انتقال به

### REFERENCES

- Ahmad, P. & Prasad, M. N. V. (2012). Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change. Springer New York Dordrecht Heidelberg London
- Allen, T., Koustenis, A., Theodorou, G., Somers, D. E., Kay, S. A., Whitelam, G. C. & Devlin, P. F. (2006). Arabidopsis FHY3 specifically gates phytochrome signaling to the circadian clock. *Plant Cell*, 18, 2506-2516.
- Amin, S., Prentis, P. J., Gilding, E. K. & Pavasovic, A. (2014). Assembly and annotation of a non-model gastropod (*Nerita melanotragus*) transcriptome: a comparison of *De novo* assemblers. *BMC Research Notes*, 7, 488.
- Ashraf, M., Ozturk, M. & Athar H. R. (2009). Salinity and Water Stress: Improving Crop Efficiency. Springer-Verlag, Berlin.
- Cardoso-Silva, C. B., Costa, E. A., Mancini, M. C., Balsalobre, T. W. A., Canesin, L. E. C., Pinto, L. R., Carneiro, M. S., Garcia, A. A., de Souza, A. P. & Vicentini, R. (2014). *De Novo* Assembly and Transcriptome Analysis of Contrasting Sugarcane Varieties. *PLoS ONE* 9(2), e88462.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. & Zhu, J-K. (2005). Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Science*, 45, 437-448.
- Chory, J. (2010). Light signal transduction: an infinite spectrum of possibilities. *Plant Journal*, 61, 982-991.
- Darwish, E., Testerink, C., Khalil, M., El-Shihy, O. & Munnik, T. (2009). Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves. *Plant Cell Physiology*, 50, 986-997.
- DeFalco, T. A., Bender, K. W. & Snedden, W. A. (2010). Breaking the code: Ca<sup>2+</sup> sensors in plant signalling. *Biochemical Journal*, 425, 27-40.
- Dodd, A. N., Kudla, J. & Sanders, D. (2010). The language of calcium signalling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 593-620.
- Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., Dickson, E. J., Suh, B. C. & Hille, B. (2010). Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *Journal of Physiology*, 588, 3179-3185.
- Gao, Y., Liu, H., An, C., Shi, Y., Liu, X., Yuan, W., Zhang, B., Yang, J., Yu, C. & Gao, H. (2013). Arabidopsis FRS4/CPD25 and FHY3/CPD45 work cooperatively to promote the expression of the chloroplast division gene ARC5 and chloroplast division. *Plant Journal*, 75, 795-807.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. & Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29, 644e652.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. & Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 463-499.
- Hetherington, A. M. & Brownlee, C. (2004). The generation of Ca<sup>2+</sup> signals in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 401-427.
- Hudson, M., Ringli, C., Boylan, M. T. & Quail, P. H. (1999). The FAR1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Genes and Development*, 13, 2017-2027.
- Hunt, L., Mills, L. N., Pical, C., Leckie, C.P., Aitken, F. L., Kopka, J., Mueller-Roeber, B., McAinsh, M. R., Hetherington, A. M. & Gray, J. E. (2003). Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *Plant Journal*, 34, 47-55.
- Jia, J., Zhao, S., Kong, X., Li, Y., Zhao, G., He, W., Appels, R., Pfeifer, M., Tao, Y., Zhang, X., Jing, R., Zhang, C., Ma, Y., Gao, L., Gao, C., Spannagl, M., Mayer, K. F., Li, D., Pan, S., Zheng, F., Hu, Q., Xia, X., Li, J., Liang, Q., Chen, J., Wicker, T., Gou, C., Kuang, H., He, G., Luo, Y., Keller, B., Xia, Q., Lu, P., Wang, J., Zou, H., Zhang, R., Xu, J., Gao, J., Middleton, C., Quan, Z., Liu, G., Wang, J.; International Wheat Genome Sequencing Consortium, Yang, H., Liu, X., He, Z., Mao, L. & Wang, J. (2013). *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature*, 496, 91-95.

19. Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M. Goldsmith, E. & Cobb, M. H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, 93, 605-615.
20. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* 10:R25.
21. Li, B. & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12, 323.
22. Li, B., Fillmore, N., Bai, Y., Collins, M., Thomson, J.A., Stewart, R. & Dewey, C.N. (2014). Evaluation of de novo transcriptome assemblies from RNA-Seq data. *Genome Biology*, 15, 553.
23. Li, W. & Assmann, S. M. (1993). Characterization of a G-protein-regulated outward K<sup>+</sup> current in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 90, 262-266.
24. Lin, R. & Wang, H. (2004). Arabidopsis FHY3/FAR1 gene family and distinct roles of its members in light control of Arabidopsis development. *Plant Physiology*, 136, 4010-4022.
25. Lohse, M., Nagel, A., Herter, T., May, P., Schroda, M., Zrenner, R., Tohge, T., Fernie, A.R., Stitt, M. & Usadel, A. (2013). Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant, Cell and Environment*, 37(5), 1250-8.
26. Mahajan, S., Pandey, G.K. & Tuteja, N. (2008). Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 471, 146-158.
27. Matsuoka, D., Nanmori, T., Sato, K., Fukami, Y., Kikkawa, U. & Yasuda, T. (2002). Activation of AtMEK1, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant Journal*, 29, 637-647.
28. Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11, 31-46.
29. Mills, L.N., Hunt, L., Leckie, C.P., Aitken, F.L., Wentworth, M., McAinsh, M.R., Gray, J.E. & Hetherington, A.M. (2004). The effects of manipulating phospholipase C on guard cell ABA-signalling. *Journal of Experimental Botany*, 55, 199-204.
30. Monneveux, P., Zaharieva, M. & Rekika, D. (2000). The utilisation of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat. In: Royo C. (ed.), Nachit M. (ed.), Di Fonzo N. (ed.), Araus J.L. (ed.). *Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges*. Zaragoza: CIHEAM, 2 000. p. 71-81.
31. Moreton, J., Dunham, S.P. & Emes, R.D. (2014). A consensus approach to vertebrate *de novo* transcriptome assembly from RNA-seq data: assembly of the duck (*Anas platyrhynchos*) transcriptome. *Frontiers in Genetics*, 5, 190.
32. Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nature Methods*, 5, 621-8.
33. Munns, R. (2013). Hoagland's nutrient solution. Available at: <http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-index.php?page=Hoagland%27s+nutrient+solution>.
34. Munns, R. & James, R.A. (2003). Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant Soil*, 253, 201-18.
35. Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. & Tran, L.S. (2013). Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 445-458.
36. Pandey, G.K. (2015). *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants Functional Genomics Perspectives*, Volume 1. Springer Science, New York, USA.
37. Peng, J.H.H., Sun, D.F. & Nevo, E. (2011). Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Molecular Breeding*, 28(3), 281-301.
38. Petersen, G., Seberg, O., Yde, M. & Berthelsen, K. (2006). Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39, 70-82.
39. Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26, 139-140.
40. Saalbach, G., Natura, G., Lein, W., Buschmann, P., Dahse, I., Rohrbeck, M. & Nagy, F. (1999). The subunit of a heterotrimeric G-protein from tobacco, NtGP\_1, functions in K<sup>+</sup> channel regulation in mesophyll cells. *Journal of Experimental Botany*, 50, 53-61.
41. Sanan-Mishra, N., Tuteja, R. & Tuteja, N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys*, 452, 55-68.
42. Schachtman, D.P. & Munns, R. (1992). Sodium accumulation in leaves of *Triticum* species that differ in salt tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 19(3), 331-340.

43. Serra, T., Figueiredo, D.D., Cordeiro, A.M., Almeida, D.M., Lourenço, T., Abreu, I.A., Sebastián, A., Fernandes, L., Contreras-Moreira, B., Oliveira, M.M. & Saibo, N.J. (2013). "OsRMC, a negative regulator of salt stress response in rice, is regulated by two AP2/ERF transcription factors". *Plant Molecular Biology*, 82, 439-455.
44. Sinha, A.K., Jaggi, M., Raghuram, B. & Tuteja, N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior*, 6(2), 196-203
45. Suh, B.C., Inoue, T., Meyer, T. & Hille, B. (2006). Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5) P2 gate KCNQ ion channels. *Science*, 314, 1454-1457.
46. Tang, W., Ji, Q., Huang, Y., Jiang, Z., Bao, M., Wang, H. & Lin, R. (2013). FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 and FAR-RED IMPAIRED RESPONSE1 Transcription Factors Integrate Light and Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 163, 857-866.
47. Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y. & Stitt, M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 37, 914-939.
48. Wang, H. & Deng, X.W. (2002). Arabidopsis FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. *EMBO Journal*, 21, 1339-1349.
49. Wang, H. & Wang, H. (2015). Multifaceted roles of FHY3 and FAR1 in light signaling and beyond. *Trends in Plant Science*, 20(7), 453-61.
50. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews Genetics*, 10(1), 57-63.
51. Wu, W-H. & Assmann, S. M. (1994). A membrane-delimited pathway of G-protein regulation of the guard-cell inward K<sup>+</sup> channel. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 6310-6314.
52. Wurzinger, B., Mair, A., Pfister, B. & Teige, M. (2011). Crosstalk of calcium-dependent protein kinase and MAP kinase signalling. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 1-5.
53. Xie, W. & Nevo, E. (2008). Wild emmer: genetic resources, gene mapping and transfer for wheat improvement. *Euphytica*, 164, 603-614.
54. Xiong, L., Schumaker, K.S. & Zhu, J-K. (2002). Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell*, S165-S183.
55. Yang, Z. (2008). *Intracellular Signaling in Plants*. Annual Plant Reviews Volume33. Blackwell Publishing Ltd.
56. Zhu, J.K. (2001). Cell signaling under salt stress, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 401-406.

## Expression profiling of genes involved in signaling process in *Aegilops tauschii* under salinity stress

Mehdi Mansouri<sup>1</sup>, MohamadReza Naghavi<sup>2\*</sup>, Houshang Alizadeh<sup>3</sup>, Ghasem Mohammadinejad<sup>4</sup>,  
Seyed Ahmad Mousavi<sup>5</sup> and Ghasem Hosseini Salekdeh<sup>6</sup>

1, 2, 3. Ph.D. Student, Professor and Assistant Professor University College of Agriculture and Natural Resources,  
University of Tehran, Karaj, Iran

4. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Kerman,  
Kerman, Iran

5. Department of Molecular Systems Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology  
and Technology, ACECR, Tehran, Iran

6. Associate Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

(Received: Sep. 15, 2015 - Acceted: Nov. 23, 2015)

### ABSTRACT

Salinization of crop lands is one of the most important reasons for reduction in productivity and threats food security. Activation of signaling process in plants is the first step during sense environmental cues and stress signals. Identification of the components of plant intracellular signaling mechanisms, pathways, and networks in response to salt stress in *Aegilops tauschii* (the D genome donor of bread wheat) by transcriptome analysis tools such as RNA Seq method is very worthwhile. RNA Seq method and functional annotation of data by MapMan suite is an efficient strategy to functional genomics analyses. In order to identify and evaluate some genes involved in signaling process, we performed library construction for two cDNA libraries from leaves of seedlings treated with 200 mM NaCl and control. Results of differential expression showed that out of 4506 differentially expressed genes, 603 (11/59%) BINs assigned to signaling process. It also became clear that receptor kinases are the largest number (222 transcripts) of differentially expressed genes in signaling process components. This study is a fundamental research that provide worthwhile functional sequences for gene transferring study to improve salinity tolerant in bread wheat.

**Keywords:** Salinity, signaling process, sequencing, RNA Seq.