مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۳، ۱۳۸۹ (۵۲۰-۵۱۳)

جداسازی و بررسی فیلوژنتیک بخشی از ژن گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau از یازده رقم گندم نان ایرانی

ساسان محسن‌زاده[1]*، بابک صفاری[2] و حسن محبت‌کار[3]
۱، ۲، ۳، استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بخش زیست شناسی دانشگاه شیراز
(تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۳ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۱/۱۱)

چکیده

گلوتاتیون ترانسفراز جزء خانواده آنزیم‌های سم‌زدای چندمنظوره است که اساساً سیتوپلاسمی می‌باشد و ترکیبات طبیعی و خارجی سمی را از طریق تری‌پپتید گلوتاتیون سمزدایی می‌کند. اتصالات گلوتاتیونی می‌تواند به واکوئل‌ها یا آپوپلاست انتقال یابد و اساساً سمیت بسیار کمتری نسبت به ترکیبات اولیه داشته باشد. ژن گلوتاتیون ترانسفرازها در بسیاری از موجودات زنده از جمله گونه‌های مختلف گیاهان شناسائی و جداسازی شده‌اند. در این مطالعه جداسازی و تعیین خصوصیات ژن گلوتاتیون ترانسفراز در یازده رقم گندم نان ایران برای اولین بار انجام شد. استخراج DNA، طراحی پرایمرهای اختصاصی، PCR، الکتروفورز، خالص‌سازی نمونه توسط ستون، تعیین توالی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک منجر به شناسایی توالی‌های جدیدی از ژن گلوتاتیون ترانسفراز شد. این توالی‌ها در بانک جهانی ژن با شماره‌های دسترسی FI131235، FI131236، FI131237، FI131238، FI131239، FI131242، FI131243، FI131244، FI131246، FI131247 و FI131248 به ترتیب برای گلوتاتیون ترانسفراز گندم نان الوند، بیات، بزوستایا، چمران، داراب۱، ماهوتی، امید، روشن، سرداری، شاهی و زرین به ثبت رسید. این توالی‌ها زمینه انتقال ژن گلوتاتیون ترانسفراز را به گیاهان حساس به تنش‌های اکسیداتیو و مواد سمی فراهم می سازد.

واژه های کلیدی: جداسازی ژن، گلوتاتیون ترانسفراز، گندم نان، گلوتاتیون، سم‌زدایی.

مقدمه

آنزیم گلوتاتیون ترانسفراز نقش کلیدی را در واکنش سم‌زدایی آنزیمی در درون سلول‌ها ایفا می‌نمایند. در گیاهان حیات سلول‌ها مستلزم مدیریت گونه‌های فعال اکسیژن انواع مختلف تنش‌های اکسیداتیو و پاتوژن‌های گیاهی و سموم برون‌زا یا گزنوبیوتیک‌هائی می‌شوند که توسط انسان وارد طبیعت شده‌اند. در این میان گلوتاتیون که تری‌پپتیدی متشکل از سه اسید آمینه گلوتامیک اسید، سیستئین و گلیسین است نقش مرکزی را در این فرآیندها عهده‌دار است (Noctor & Foyer, 1998; Edward & Dixon, 2005). آنزیم گلوتاتیون ترانسفراز برگ‌های ذرت مجموعاً یک درصد پروتئین‌های محلول آنرا تشکیل می‌دهد (Marrs, 1996). گلوتاتیون ترانسفرازها موجب کاتالیز واکنش اتصال فرم احیا گلوتاتیون به انواع گوناگون سوبستراهای هیدروفوبیک و الکتروفیلیک که اغلب موادی سمی

* نویسنده مسئول: ساسان محسن‌زاده تلفن: ۰۹۱۷-۳۰۶۷۳۲۲ E-mail: mohsenzadeh@susc.ac.ir

هستند می‌گردند. پس از انجام واکنش اتصال، محصول فرآیند یا به داخل واکوئل انتقال یافته تا در آنجا از دسترس سلول به دور باشد و یا به محیط بیرون سلولی ترشح می‌گردد (Dixon et al., 1998; Cho & Kong, 2007).

گلوتاتیون ترانسفراز در بسیاری از انواع موجودات زنده از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها، مخمرها، حشرات، پستانداران و گیاهان عالی دیده می‌شود (Droog, 1997). گلوتاتیون ترانسفراز در تمامی مراحل تکوینی گیاهان دیده شده و در همه بافت‌های گیاهی وجود دارد (McGonigle et al., 2000). ژن گلوتاتیون ترانسفراز گیاهی در رابطه با نقش‌شان در فرآیند سم‌زدایی علف‌کش‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در واکنش‌های سم‌زدایی علف‌کش‌ها این آنزیم همراه با گلایکوزیل ترانسفرازها آنزیم‌های اصلی سم‌زدایی را تشکیل می‌دهند. از آنجا که گلوتاتیون ترانسفرازها قابلیت شناسایی سوبستراهای گوناگونی را دارند، گیاهان نسبت به دامنه وسیعی از علف‌کش ها مقاومت نشان می‌دهند. علاوه بر این بسیاری از گلوتاتیون ترانسفرازها به هورمونهای گیاهی نظیر اکسین و سیتوکینین، و نیز به آلودگی‌های پاتوژن‌ها پاسخ می‌دهند. علاوه براین برخی از ایزوفرم‌های گلوتاتیون ترانسفراز قابلیت اتصال به برخی لیگاندها و در نتیجه انتقال داخل سلولی برخی ترکیبات را دارا هستند (Listowski et al., 1988). بعضی از گلوتاتیون ترانسفرازهای ویژه به آنتوسیانین‌ها متصل شده و موجب حبس این مواد در داخل واکوئل‌ها می‌گردند. این آنتوسیانین‌ها سوبستراهای غیرآنزیمی گلوتاتیون ترانسفراز بوده و با گلوتاتیون اتصالی برقرار نمی‌کنند. به چنین گلوتاتیون ترانسفرازهایی اصطلاحاً لیگاندین و به سوبستراهای آنها «لیگاندهای غیرسوبسترایی» اطلاق می‌شود (Mueller et al., 2000).

اکثر گونه‌های گیاهی ده‌ها ژن گلوتاتیون ترانسفراز در کلاس‌های مختلف دارند. با توجه به شباهت توالی آمینو اسیدها، سازماندهی ژنی، زیر واحدهای فعال در جایگاه فعال آنزیم و خصوصیات بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی تاکنون ۸ کلاس گلوتاتیون ترانسفراز در پستانداران شناسایی شده‌اند که عبارتند از: Alpha، Mu، Pi، Theta، Sigma، Zeta، Omega و نوع میتوکندریایی Kappa. گلوتاتیون ترانسفرازها در گیاهان پس از کشف و مشاهده این آنزیم‌ها در پستانداران یافت شدند. وجود چنین خانواده پروتئینی از آنزیم‌ها در گیاهان نخستین بار در سال ۱۹۷۰ قطعی شد یعنی زمانی که مشاهده شد گلوتاتیون ترانسفراز موجود در ذرت موجب اتصال کلرو- اس- تریازین آترازین به گلوتاتیون می‌شوند که این خود عاملی برای محافظت گیاه در برابر آسیب‌های ناشی از این علف‌کش بود (Frear & Swanson, 1970; Board et al., 1997). از آن زمان تا کنون عملکردهای متعددی برای این دسته از آنزیم‌ها در گیاهان معرفی شده است. مطالعات فیلوژنتیکی نشان داده‌اند که گلوتاتیون ترانسفرازهای محلول از یک ژن پیش‌ساز اولیه منشأ گرفته‌اند، با این وجود شباهت بین توالی آمینو اسیدهای کلاس‌های مختلف معمولاً کمتر از ۲۵ درصد است (Dixon et al., 2002). گلوتاتیون ترانسفرازها پروتئین‌هایی محلول عموماً با وزن ملکولی تقریبی ۵۰ کیلو دالتون هستند که از دو زیرواحد ۲۷-۲۵ کیلو دالتونی تشکیل شده‌اند. این آنزیم‌ها ممکن است به صورت همودایمر یا هترودایمر باشند که نوع هترودایمر آنها محدود به زیر واحدهای متعلق به یک کلاس می‌شود (Armstrong, 1997). کلاس‌های Tau و Phi اختصاصی گیاهان بوده و در مقایسه با سایر کلاسهای گلوتاتیون ترانسفراز از بیشترین فراوانی در ژنوم گیاهان برخوردارند. این دو کلاس از گلوتاتیون ترانسفرازها موجب اتصال طیف گسترده ای از مواد گزنوبیوتیک[1] به تری پپتید گلوتاتیون شده و از این رو تاثیر به سزایی در میزان و نوع اثر مواد گزنوبیوتیک بر انواع مختلف گیاهان زراعی و مرتعی اعمال می‌نمایند. کومینز و همکارانش در سال ۲۰۰۳ موفق شدند یک دسته از گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Phi گندم را که در پاسخ به ترکیب علف‌کش و علف‌کش-ایمن‌کننده بیان می‌شدند جدا نموده و کلون نمایند (Cummins et al., 2003). همچنین ژانگ و ریچرز در سال ۲۰۰۴ با استفاده از روش‌های پروتئومیک جهت شناسایی پروتئین‌های القا شده توسط علف‌کش فلوکسوفینم در کلئوپتیل گیاه *Triticum tauschii* موفق به شناسایی

1. Xenobiotic

۱۵ پروتئین گلوتاتیون ترانسفراز شدند که متعلق به سه کلاس Tau (۸ عدد)، Phi (۶ عدد) و Lambda (۱ عدد) بودند (Zhang & Riechers, 2004).

رواکس و همکارانش در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که گیاهچه‌های تنباکویی که گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau با بیان مضاعف دارند در مقایسه با گیاهچه‌های وحشی، در برابر تنش‌های سرما و اکسیداتیو مقاومت بیشتری از خود نشان دادند (Roxas et al., 1997). پنج گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau در گیاه گوجه‌فرنگی شناسایی شده‌اند که در صورت بیان شدن در مخمر موجب مقاومت مخمر در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌گردند (Kampranis et al., 2000). در پژوهشی دیگر که توسط مونز و همکارانش در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت نشان داده شد که دو گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau در پاسخ گیاه برنج در برابر تنش‌های اکسیداتیو دخالت دارند (Moons, 2003). در این پژوهش از یازده رقم گندم ایرانی یا کشت شونده در مناطق مختلف ایران برای اولین بار ژن گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau جداسازی و بررسی فیلوژنتیک گردید.

مواد و روش‌ها

گندم‌های نان الوند، بیات، بزوستایا، چمران، داراب۱، ماهوتی، امید، روشن، سرداری، شاهی و زرین به منظور دستیابی به ژرم پلاسم خالص از بانک ژن گیاهی ایران واقع در کرج تهیه شد. پس از قرار دادن بذرها در محلول ۵٪ هیپوکلرید سدیم به مدت ۱۰ دقیقه جهت ضد عفونی، هر نمونه گندم در گلدان‌های مجزا کشت داده شد. نمونه‌ها در اتاقک کشت با شرایط طول روز ۱۶ ساعت، طول شب ۸ ساعت، دمای روز ۲۲ درجه سانتیگراد، دمای شب ۱۵ درجه سانتیگراد، رطوبت ۶۰ درصد قرار داده شدند. گیاهچه‌های ۱۴ روزه توسط ازت مایع فریز و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA از ۲۰۰ میلیگرم نمونه با روش CTAB تغییر یافته انجام شد (۲۲). به منظور طراحی پرایمر سایر توالی‌های بدست آمده و ثبت شده در بانک ژن هم‌آرائی گردید و بر اساس توالی‌های مشترک توسط نرم افزار اولیگو، آغازگرهای زیر طراحی گردید: 5´-AAGGGCCTGAGCTACGAG-3´ به عنوان آغازگر پیشرو و 5´-TGCTGGCGGCTCACTTG -3´ به عنوان آغازگر برگشتی

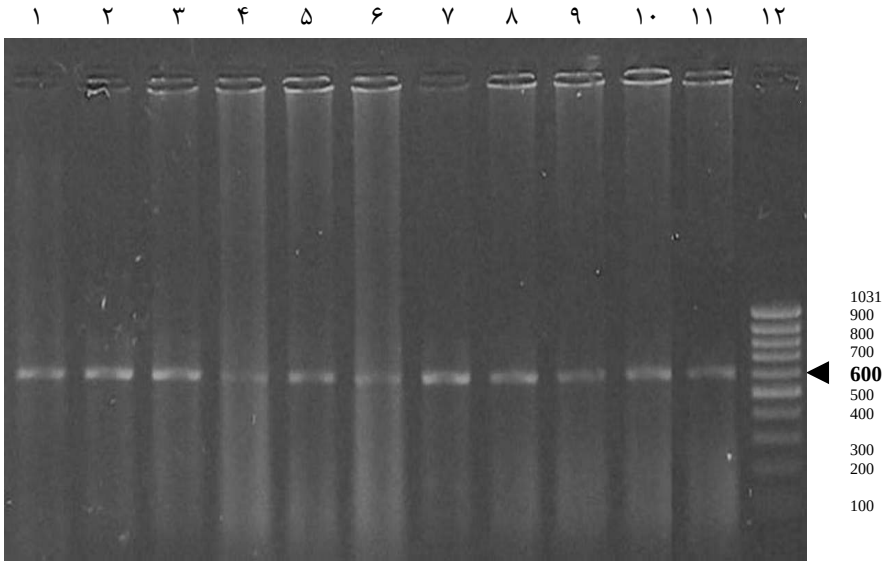
در هر واکنش PCR ۲۰ µl، بافر 10X PCR به میزان ۲ µl $MgCl_2$ به مقدار ۱/۵ میلی‌مولار، dNTP به میزان ۲۰۰ میلی‌مولار، آغازگر پیشرو و برگشتی هر کدام ۰/۶µl، آب دو بار تقطیربه میزان ۱۴/۶ µl، آنزیم دی‌ان‌آ پلی‌مراز به مقدار ۱ واحد آنزیمی و الگوی DNA به میزان ۵۰ نانوگرم مورد استفاده قرار گرفت. این مواد از شرکت سینا ژن تهیه گردید. واکنش PCR با یک مرحله آغازین واسرشت در دمای ۹۴ سانتیگراد و مدت ۵ دقیقه شروع شد. پس از آن ۳۵ چرخه تکثیری شامل سه مرحله متوالی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه انجام شد. در مرحله آخر یک مرحله ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه برای امتداد و اتمام همانندسازی تمام رشته‌ها در نظر گرفته شد. در پایان برای بررسی صحت کار، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. قابل ذکر است که در این پژوهش ژن گلوتاتیون ترانسفراز از منبع ژنومی استخراج شد. محصول PCR پس از خالص‌سازی توسط ستون کیت خالص‌سازی محصول PCR توسط شرکت MWG آلمان در جهت پیشرو تعیین توالی شد.

جستجو و آنالیز خصوصیات یک ژن، امروزه از طریق توالی در دسترس آن انجام می‌شود. نرم‌افزارهای مختلفی برای آنالیز ویژگی‌های متعددی از ژن‌ها و پروتئین‌ها در پایگاه‌های اطلاعاتی قابل استفاده هستند. در این پژوهش توالی‌های بدست آمده از DNA توسط نرم افزارهای ProDom، PROSITE، SMART، CDD، CDART، BLOCKS، Pfam وBLAST آنالیز گردید. از سوی دیگر، برای ترجمه توالی‌های مورد نظر از نرم‌افزار Transeq استفاده شد. به کمک نرم‌افزار CLC Sequence viewer نیز شجره نامه‌هایی به روش Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) و بر اساس شباهت‌ها و تفاوت‌های موجود در توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های یافت شده و توالی‌های گونه‌های مختلف گیاهی موجود در بانک جهانی ژن تهیه گردید. همچنین برای هم‌آرائی توالی‌ها از الگوریتم ClustalW، (Thompson et al., 1994) موجود در نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999)

استفاده شد.

نتایج و بحث

پس از انجام واکنش PCR باندهایی در حدود ۶۰۰bp برای نمونه‌های گندم در الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد به دست آمد که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد. نمونه‌های محصول PCR پس از تعیین توالی در بانک جهانی ژن NCBI با شماره‌های دسترسی مشخص به ثبت رسید که در جدول ۱ به همراه طول قطعات تعیین توالی شده آورده شده است.



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصول پی سی آر یازده رقم گندم. نمونه‌ها از شماره ۱ تا ۱۲ به ترتیب عبارتند از گندمهای زرین، الوند، بیات، داراب، شاهی، سرداری، امید، چمران، روشن، ماهوتی، بزوستایا و مارکر bp ۱۰۰.

جدول۱- شماره دسترسی در بانک جهانی ژن NCBI و طول توالی‌های بدست آمده از ژن گلوتاتیون ترنسفراز کلاس Tau ارقام گندم

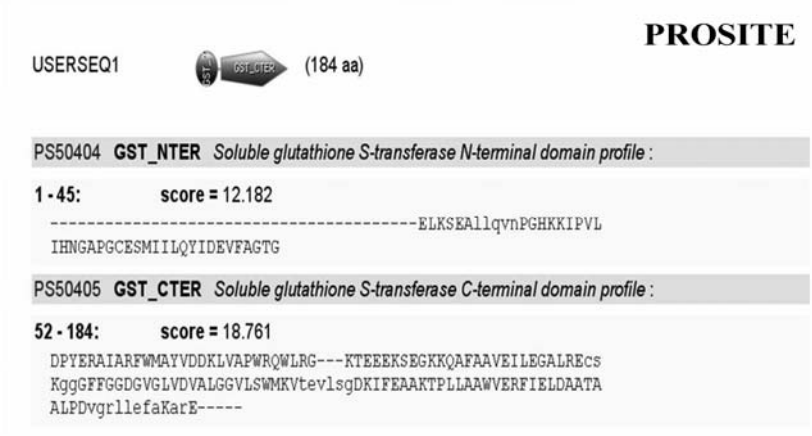
رقم گندم	طول قطعه	شماره دسترسی در بانک ژن
الوند	655	FI131235
امید	640	FI131243
بیات	640	FI131236
بزوستایا	456	FI131237
چمران	456	FI131238
روشن	550	FI131244
زرین	643	FI131248
داراب	636	FI131239
سرداری	628	FI131246
شاهی	592	FI131247
ماهوتی	645	FI131242

توالی‌های بدست آمده همان ژن گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau بود و برای تائید تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک در مورد آنها انجام شد. جدول ۲ و شکل ۲ تأیید نواحی انتهای N و انتهای C ترجمه توالی‌ها به پروتئین گلوتاتیون ترانسفراز گندم الوند را به عنوان نمونه، توسط برخی از بانک‌های اطلاعاتی نشان می‌دهند. بر این اساس نواحی انتهای N و انتهای C ترجمه توالی‌ها متعلق به پروتئین گلوتاتیون ترانسفراز است.

جدول ۲- تأیید نواحی ژنهای GST توسط بانک اطلاعاتی ProDom

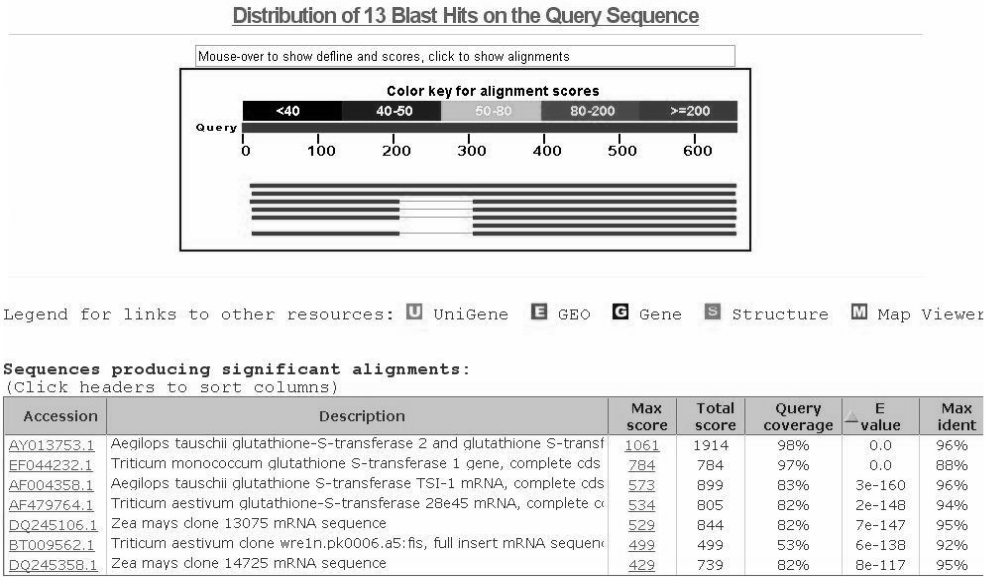
Position	ProDom Domain	Gene [a]	Score	E value
19-70	PDA0K044	Bronze-2	129	4e-07
20-60	PD002744	GstT1	206	4e-16
20-60	PD085544	Bronze-2	138	3e-08
61-109	PD599945	Gst TSI-1	177	1e-12
137-184	PD337149	Bronze-2	219	2e-17

a- ژنهای Bronze-2 و Gst TSI-1 هر دو GST کلاس Tau و به ترتیب متعلق به گیاهان *Zea mays* و *Aegilops tauschii* می باشند.



شکل ۲- تأیید نواحی انتهای N و انتهای C توسط بانک اطلاعاتی PROSITE

مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد که توالی‌های به دست آمده شباهت ۹۰ درصدی را با سایر گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاس Tau دارد. از آنجا که ژن های گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau دارای یک اینترون در نواحی کاملاً حفظ شده می باشند می‌توان با استفاده از نتایج حاصل از Blast قسمت اینترونی مورد نظر را که برای قطعات یافت شده ۹۹ نوکلئوتید بود، شناسایی نمود و با حذف قسمت مذکور به توالی cDNA ژن مربوطه دست یافت (شکل ۳ و ۴). مقایسه توالی‌های به دست آمده با انواع کلاس‌های مختلف گلوتاتیون ترانسفراز در گیاهان نشان می‌دهد که تمامی توالی‌ها از گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau می‌باشند. گیاه گندم دارای ۸ نوع گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau است که توالی‌های به دست آمده شباهت زیادی را به توالی cDNA مربوط به TaGstU4 با شماره دسترسی AF004358 و توالی cDNA مربوط به TaGst28E4 با شماره دسترسی AF479764 نشان می‌دهند که در نتیجه جستجوی BLAST شکل ۳ و درخت فیلوژنتیکی شکل ۵ دیده می‌شود. به علاوه توالی‌های یازده رقم گندم شباهت زیادی با توالی گلوتاتیون ترانسفراز به دست آمده برای گیاه خارشتر دارد (شکل ۵).



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY013753.1	Aegilops tauschii glutathione-S-transferase 2 and glutathione S-transf	1061	1914	98%	0.0	96%
EF044232.1	Triticum monococcum glutathione S-transferase 1 gene, complete cds	784	784	97%	0.0	88%
AF004358.1	Aegilops tauschii glutathione S-transferase TSI-1 mRNA, complete cds	573	899	83%	3e-160	96%
AF479764.1	Triticum aestivum glutathione-S-transferase 28e45 mRNA, complete c	534	805	82%	2e-148	94%
DQ245106.1	Zea mays clone 13075 mRNA sequence	529	844	82%	7e-147	95%
BT009562.1	Triticum aestivum clone wre1n.pk0006.a5:fis, full insert mRNA sequen	499	499	53%	6e-138	92%
DQ245358.1	Zea mays clone 14725 mRNA sequence	429	739	82%	8e-117	95%

شکل ۳- نتیجه Blast توالی ژن گلوتاتیون ترانسفراز گندم الوند به عنوان نمونه در بانک ژن NCBI. همچنان که در شکل مشخص است دو توالی نخست مربوط به توالی‌های ژنومی و توالیهای بعدی مربوط به توالی cDNA ژن گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau در گیاهان مختلف است.

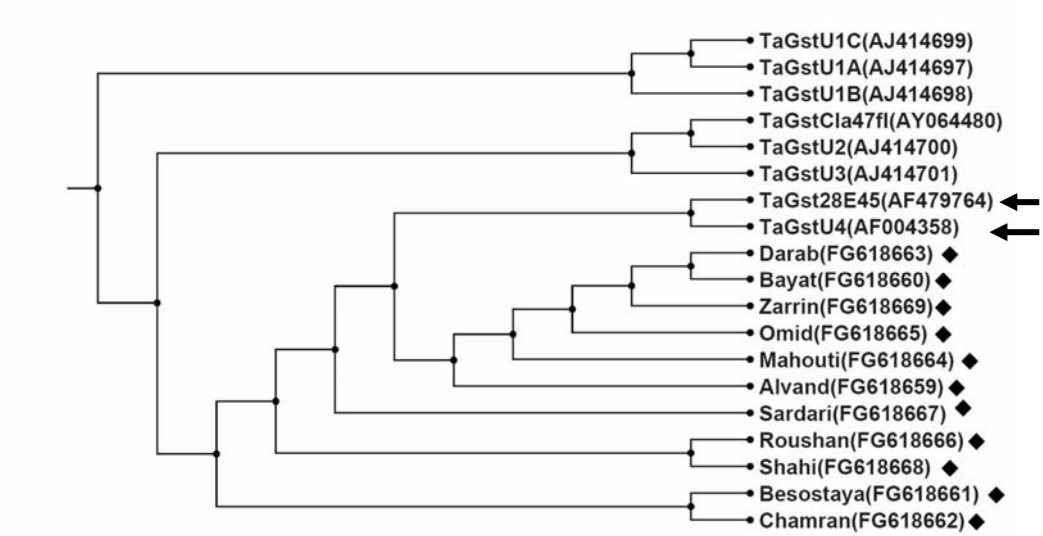
```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         10        20        30        40        50        60        70        80        90
Omid             ---------- ---GGGAGCC TCTCCTCA-G TCCACC-CGG GGCACAAGAA GATACCCGTG CTCATCCACA ACGGAGCCCC GGGCTGCGAG
Alvand           CGGAGCTAAA AAAGTGAGCT CCTCCTCAAG TCCACC-CGG GGCACAAGAA GATACCCGTG CTCATCCACA ACGGAGCCCC GGGCTGCGAG
Zarrin           ---------A AAAGTGAGCT TCTCCTCA-G TCCACC-CGG TGCACAAGAA GATACCCGTG CTCATCCACA ACGGAGCCCC GGGCTGCGAG
Bayat            ---------- ---GTGAGCT TCTCCTCA-G TCCACC-CGG TGCACAAGAA GATACCCGTG CTCATCCACA ACGGAGCCCC GGGCTGCGAG
Besostaya        ---------G ATAGTGAGGT AGCCCTCAAG TTTAACGCGG GGCACAAGAA AATACCCGTG CTCATCCACA ACGAAGCCCC GGGCTGCGAG
Roushan          ---------- ---------- ---------- --------GG GGCACAAGAA GATACCCGTG CTCATCCACA ACGGAGCCCC GGGCTGCGAG
Mahouti          ---------- AAAGTGAGCC TCTCGTAA-G TTCACG-CGG GGCCCAAGAA TATACCCGTG CTCACCCACA -CGGAGCCCC GGGCTGCGAG
Chamran          ---------- --AGTGAGCC TCTCGTCAGT T--GACCCGG GGCACAAGAA TATACCCGTG CTCATCCACA ACGGAGCCCC GGGCTGCGAG
Darab            ---------- -----GAGCT TCTCCTCA-G TCCACC-CGG TGCACAAGAA GATACCCGTG CTCATCCACA ACGGAGCCCC GGGCTGCGAG
Shahi            ---------- ---------- ---------- --------GG GGCACAAGAA TATACCCGTG CTC-CCCACA ACGGAGCCCC GGGCTGCGAG
Sardari          ---------- ---GAGAGCC TCCAGTAAGT TCTGAGGGGG GCCACAAAAA TATATCGGTG CTCATCCACA ATGGCGCCGC GGGCTGCGAG
Alhagi           ---------- AGAGTGAGCT TCTCCTCA-G TCCACC-CGG TGCA-AAGAA GATACCCGTG CTCATCCACA ACGGCGCCCC GGGCTGCGAG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        100       110       120       130       140       150       160       170       180
Omid             TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCG GCACCGGCCC GTCCCTTCTT CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Alvand           TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCG GCACCGGCCC GTCCCTTCTT CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Zarrin           TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCG GCACCGGCCC GTCCCTTCTT CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Bayat            TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCG GCACCGGCCC GTCCCTTCTT CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Besostaya        TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCG GCACCGGCCC GTCCCTTCTT CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Roushan          TCCATGATCA ATCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCG GCACCGGCCC GTCCCTTCTA CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Mahouti          TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCG GCACCGGCCC GTCCCTTCTC CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Chamran          TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCG GCACCGGCCC GTCCCTTCTG CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Darab            TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCG GCACCGGCCC GTCCCTTCTC CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Shahi            TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCA GCACCGGCCC GTCCCTTCTT CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Sardari          TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCA GCACCGGCCC GTCCCTTCTC CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT
Alhagi           TCCATGATCA TTCTGCAGTA CATCGACGAA GTGTTCGCCA GCACCGGCCC GTCCCTTCTA CCAGCGGACC CCTACGAGCG CGCCATTGCT

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        190       200       210       220       230       240       250       260       270
Omid             CGCTTCTGGA TGGCCTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTAATT TTAGATATCC
Alvand           CGCTTCTGGA TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Zarrin           CGCTTCTGGA TGGCCTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Bayat            CGCTTCTGGA TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Besostaya        CGCTTCTGGA TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Roushan          CGCTTCTGGA TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Mahouti          CGCTTCTGGA TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Chamran          CGCTTCTGGA TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Darab            CGCTTCTGGA TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Shahi            CGCTTCTGGA TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Sardari          CGCTTCTGGA TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCACTTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC
Alhagi           CGCTTCTGGG TGGCTTACGT TGACGACAAG GTTTAAATTA TCTTCAATTA CTTGAACTAC TTGTCTCCGT TCCTTTATTT TTAGATATCC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        280       290       300       310       320       330       340       350       360
Omid             AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Alvand           AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Zarrin           AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Bayat            AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Besostaya        AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Roushan          AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Mahouti          AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Chamran          AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Darab            AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Shahi            AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
Sardari          AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCA-GACAGA GGAGGAGAAA
Alhagi           AGCGAGCATC TTTGACCATT ATTTTTCTCT GTGTTTCAGC TGGTAGCCCC ATGGAGGCAG TGGTTGAGGG GCAAGACAGA GGAGGAGAAA
```

شکل ۴- همردیفی توالی‌های ژن گلوتاتیون ترانسفراز یازده رقم گندم و خارشتر.
ناحیه اینترونی ۹۹ نوکلئوتیدی در داخل کادر نشان داده شده است.



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی انواع گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau گندم‌های خارجی در بانک اطلاعاتی با توالی‌های به دست آمده از یازده رقم گندم در این پژوهش که با علامت مربع مشخص شده‌اند به روش Neighbor Joining. شماره دسترسی هر ژن در برابر آن و در داخل پرانتز آمده است. پیکان ها توالی گندم های مشابه با توالی‌های یافت شده در این پژوهش را نشان می دهد.

همردیفی توالی آمینواسیدی بدست آمده از قطعات cDNA گندم نان با نزدیک‌ترین پروتئین حاصل از جستجوی BLAST یعنی توالی TaGstU4 و تطابق با عناصر ثانویه ساختاری پروتئین مذکور، که ساختار کریستالوگرافی آن به دست آمده است، نشان داد که توالی پیدا شده برای گیاهان گندم حاوی ۲ صفحه بتا و ۸ مارپیچ آلفا در ساختار ثانویه خود است. همچنین سایر قسمت‌های آن به لوپ‌های بینابینی مربوط می‌شوند.

شناسائی و جداسازی ژن‌ها در مهندسی ژنتیک و بررسی فیلوژنتیک آنها کاربرد دارد. انتقال ژن آنزیم‌های گلوتاتیون ترانسفراز به خصوص کلاس Tau به دلیل اینکه در کاهش اثرات خطرناک مواد سمی، شرایط نامساعد محیطی و نیز اثر سوء پاتوژن‌ها موثرند (Kilili, 2004)، می‌توانند اثرات چندگانه‌ای را در تحمل تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی برای گیاه در پی داشته باشند. لذا مطالعات بیشتری برای تکمیل سایر قسمت‌های این توالی‌ها می‌تواند منجر به جداسازی کامل ژن‌های مربوطه گردد که برای انتقال ژن مفید است. بررسی‌های فیلوژنتیک آنزیم گلوتاتیون ترانسفراز نشان داده است که کلاس‌های مختلف این پروتئین از یک جد مشترک طی فرآیند تفرق و یا همگرائی در پاسخ به تنش‌ها بوجود آمده‌اند (Dixon et al., 2002). مضاعف شدن ژن، جابجا شدن نواحی اگزونی، کراسینگ آور و اسپلیسینگ نواحی انتهای C پروتئین CST از جمله مکانیسم‌هائی بوده‌اند که اعضاء مختلف خانواده این پروتئین را بوجود آورده‌اند (Armstrong, 1998; Wongsantichon & Ketterman, 2005). هنوز سوالاتی در مورد آنزیم گلوتاتیون ترانسفراز مطرح است، از جمله آنکه چرا کلاس‌های Tau و Phi جزء فراوان‌ترین کلاس‌های CST هستند و اینکه بیان ژن‌های این پروتئین چگونه تنظیم می‌گردد و آیا به غیر از کلاس‌های شناخته شده فعلی کلاس‌های دیگری از گلوتاتیون ترانسفراز در گیاهان وجود دارد.

REFERENCES

1. Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10, 2-18.
2. Armstrong, R. N. (1998). Mechanistic imperatives for the evolution of glutathione transferases. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(5), 618-623.
3. Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagam, G. & Jermin, L. S. (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochemical Journal*, 328, 929-935.
4. Cho, H. Y. & Kong, K. H. (2007). Study on the biochemical characterization of herbicide detoxification enzyme, glutathione S-transferase. *Biofactors*, 30, 281-287.
5. Cummins, I., O'Hagan, D., Jablonkai, I., Cole, D. J., Hehn, A., Werck-Reichhart, D. & Edwards, R. (2003). Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferase from wheat. *Plant Molecular Biology*, 52, 591–603.
6. Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J. & Edwards, R. (1998). Glutathione mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 258-266.
7. Dixon, D. P., Lapthorn, A. & Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, 3, 3004.1-3004.10.
8. Droog, F. (1997). Plant glutathione S-transferases, a tale of Theta and Tau. *Journal of Plant Growth Regulation*, 16, 95–107.
9. Edwards, R. & Dixon, D. P. (2005). Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401, 169–186.
10. Frear, D. S. & Swanson, H. R. (1970). Biosynthesis of S-(4 ethylamino 6-isopropylamino 2-s-triazino) glutathione; Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry*, 9, 2123–2132.
11. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41, 95–98.
12. Kampranis, S. C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsichlis, P. N. & Makris, A. M. (2000). A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses bax lethality in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 29207–29216.
13. Kilili, K. G., Atanassova, N., Vardanyan, A., Clatot, N., Al-Sabarna,K., Kanellopoulos, P. N., Makris, A. M. & Kampranis, S. C. (2004). Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 24540–24551.
14. Listowski, L., Abramovitz, M., Homma, H. & Niitsu, Y. (1988). Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferases. *Drug Metabolism Review*, 19, 305–318.

15. Marrs, K. A. (1996). The functions regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 127–158.
16. McGonigle, B., Keeler, S. J., Lau, S. M. C., Koeppe, M. K. & O'Keefe, D. P. (2000). A genomics approach to the comprehensive analysis of glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiology*, 124, 1105–1120.
17. Moons, A. (2003). Osgstu3 and osgstu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Letters*, 553, 427–432.
18. Mueller, L. A., Goodman, C. D., Silady, R. A. & Walbot, V. (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology*, 123, 1561-1570.
19. Noctor, G. & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
20. Roxas, V. P., Smith, R. K., Allen, E. R. & Allen, R. D. (1997). Over expression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology*, 15, 988-991.
21. Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
22. Sumer, A., Ahmet, D. & Gulay, Y. (2003). Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis* L. Specimens. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21, 461a-461f.
23. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
24. Wongsantichon, J. & Ketterman, A. (2005). Alternative splicing of glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401, 100-116.
25. Zhang, Q. & Riechers, D. E. (2004). Proteomic characterization of herbicide safener-induced proteins in the coleoptile of *Triticum tauschii* seedlings. *Proteomics*, 4, 2058–2071.