

جداسازی ژن Phosphoglycerate Dehydrogenase از گیاه *Aeluropus littoralis* و بررسی عملکرد جهش یافته T-DNA آن در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana*

سید حمیدرضا هاشمی پطرودی^{۱*}، حمیدرضا قربانی^۲، مارکوس کولمن^۳

۱. استادیار گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۲. دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه گیلان، گیلان

۳. گروه ژنتیک مولکولی، موسسه ژنتیک گیاهی و تحقیقات گیاهان زراعی لیبینز (IPK)، آلمان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۱۳)

Isolation Phosphoglycerate Dehydrogenase gene from *Aeluropus littoralis* and functional analysis of T-DNA mutant in *Arabidopsis thaliana*

Seyyed Hamidreza Hashemi-Petroudi^{1*}, Hmidreza Ghorbani², Markus Kuhlmann³

1. Genetic Engineering and Biology Department, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran,

2. Ph.D. in Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran.

3. RG Abiotic Stress Genomics/ RG Heterosis, Department Molecular Genetics, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK). Germany.

(Received: Nov. 4, 2018 - Accepted: Apr. 21, 2108)

Abstract

Bioinformatic analysis plays an important role in the study of genes and the prediction of their function in response to stresses. Halophyte *Aeluropus littoralis*, a valuable genetic resource for identifying genes involved in plant tolerance to abiotic stresses study, Phosphoglycerate Dehydrogenase (*PGDH*) gene as the first important enzyme in the synthesis of serine, was isolated based on EST sequence from plant *Aeluropus littoralis* in salinity using by the RLM-RACE method. By overlapping the 3' and EST. RACE method sequences, a 1506 bp fragment including the ORF region (1268 nucleotides) and 3'UTR region (238 nucleotides) were obtained. The phylogenetic analysis of *AIPGDH* was done with other ortholog genes in different plants and its homologs were identified. Based on phylogram, the high degree of homology was observed between *AIPGDH* gene and other homologous genes from monocot cereals such as sorghum, foxtail millet and rice. The *AtPGDH* co-expression network analysis showed the important role of the *PGDH* gene in biosynthetic pathways, including amino acid synthesis, secondary metabolites synthesis and the pathway of glycine, serine and threonine that metabolism, and its expression analysis indicated the expression was increased in different stresses. The Phenotyping of the *Arabidopsis* knockout mutants for *PGDH* gene in NaCl and PEG stress condition indicated that the growth characteristics were significantly reduced in compared to the control plant, which could be confirmed the role of this gene in the response to salt and drought stress. The findings of this study reveal the functional characteristics of *AIPGDH* gene, phenotypic changes in *AtPGDH* mutant plants in exposure to salt and drought stress, and its possible role in increasing plant tolerance to stress.

Keywords: Abiotic Stress, Serine, *PGDH* Gene, T-DNA, Halophyte

چکیده

تحلیل داده‌های زیستی نقش مهمی در بررسی ژن‌ها در پاسخ به تنش‌ها دارد. هالوفیت *Aeluropus littoralis* منبع ژنتیکی ارزشمندی در شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل گیاه به تنش‌ها می‌باشد. در مطالعه حاضر، ژن فسفولیگسرات دهیدروژناز (*PGDH*) به عنوان اولین آنزیم مؤثر در تولید سرین، بر اساس توالی EST ثبت شده از گیاه آلوپوس در شرایط تنش شوری و با استفاده از روش RLM-RACE جداسازی شد. با همپوشانی توالی ناحیه 3' و EST، قطعه‌ای به طول ۱۵۰۶ bp شامل ناحیه ORF به طول ۱۲۶۸ و ناحیه 3'UTR به طول ۲۳۸ نوکلئوتید بدست آمد. بررسی فیلوژنتیکی *AIPGDH* با دیگر ژن‌های اورتولوگ در گیاهان مختلف انجام و همولوگ‌های ژن *PGDH* شناسایی شد. درخت فیلوژنتیکی بیانگر قرابت بالای ژن *AIPGDH* با گیاهان تک‌لپه و خانواده غلات مانند سورگوم، ارزن دم‌روبه‌ای و برنج بود. بررسی شبکه هم‌پیمانی ژن *AtPGDH* بیانگر نقش مؤثر ژن *PGDH* در مسیرهای بیوسنتزی از جمله تولید آمینو اسیدها، تولید متابولیت‌های ثانویه و مسیر متابولیسم گلايسین، سرین و ترئونین بوده و آنالیز بیانی این سیلیکو آن نیز حاکی از افزایش بیان ژن *AtPGDH* در تنش‌های مختلف می‌باشد. بررسی فنوتیپی جهش‌یافته خاموش شده (آرابیدوپسیس) این ژن در تنش‌های کلرید سدیم و PEG حاکی از کاهش شدید خصوصیات رشدی گیاهان جهش‌یافته نسبت به کنترل بود که می‌تواند تأییدی بر نقش ژن در تنظیمات پاسخ به تنش‌های شوری و خشکی باشد. یافته‌های این تحقیق، خصوصیات عملکردی ژن *PGDH*، تغییرات فنوتیپی گیاهان جهش‌یافته *pgdh* در مواجهه با تنش شوری و خشکی و نقش احتمالی آن را در افزایش تحمل گیاه به تنش‌ها ارائه می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: تنش غیرزیستی، سرین، ژن *PGDH*، T-DNA، هالوفیت.

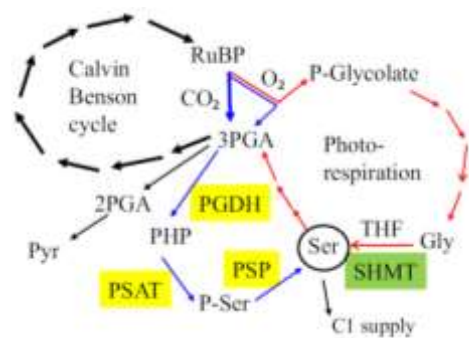
مقدمه

گیاهان در طول دوره رشد و نمو خود به کرات در برابر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند. تنش‌های غیرزیستی از مهمترین عوامل محدود کننده عملکرد گیاهان زراعی محسوب می‌شوند (Zhang *et al.*, 2010). گیاه شورپسند آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) بومی مناطق بیابانی، جلگه‌ای و مردابی ایران بوده و با توجه به خاستگاه اکولوژیک خود علاوه بر تحمل به تنش شوری (تا میزان ۱۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) به طیف وسیعی از شرایط سخت محیطی متحمل می‌باشد (Wei *et al.*, 2001; Hashemi *et al.*, 2014) و به‌علت دارا بودن طیف وسیعی از ژن‌های مقاومت به تنش‌های محیطی، می‌تواند به‌عنوان یک منبع ژنتیکی با ارزش حاوی ژن‌های تحمل به تنش شوری و خشکی در نظر گرفته شود.

با ارائه توالی ژنومی گیاهان آراییدوپسیس (Cao *et al.*, 2011) و برنج (Goff *et al.*, 2002) بر مبنای تکنولوژی‌های توالی‌یابی ژنومی، فرایند شناسایی، جداسازی و مستندسازی^۱ ژن‌ها در دهه گذشته هموار گردید. از میان روش‌های کشف ژن، روش شناسایی ژن بر مبنای جداسازی قطعات EST^۲ به‌عنوان یک روش کارا و توانمند، امکان دسترسی به تمام ژن‌های فعال و بیان شده را فراهم می‌نماید (Emrich *et al.*, 2007). تهیه cDNA کامل از این ESTها با روش‌های مبتنی بر RACE (Chenchik *et al.*, 1998) بوده که به‌عنوان یکی از عناصر کلیدی در ژنومیکس عملکردی به‌منظور تجزیه و تحلیل کارکرد ژن‌ها استفاده می‌گردد. بررسی عملکردی بر اساس فنوتیپ نقض عملکرد^۳ (ژنتیک معکوس) و اعطای عملکرد^۴ روشی مناسب در جهت شناسایی و

مطالعه عملکرد ژن‌های پاسخگو به تنش‌های غیرزیستی می‌باشد. در ژنتیک معکوس کارکرد ژن موردنظر با الحاق TDNA یا ترانسپوزون در آن مختل شده، بدین ترتیب با مطالعه فنوتیپ جهش‌یافته، می‌توان به کارکرد ژن خاموش شده پی برد.

اسید آمینه ال-سیرین یک پیش ماده ضروری برای مولکول‌های زیستی مختلف از جمله گلايسين، دی-سیرین، تریپتوفان و سیستین (Deng *et al.*, 2015) در موجودات زنده می‌باشد. ۳-فسفوگلیسرات دهیدروژناز (*PGDH*) اولین آنزیم مؤثر در مسیر فسفریله تولید ال-سیرین بوده و مقادیر آن به واسطه بازخورد منفی وجود یا عدم حضور ال-سیرین در باکتری‌ها و گیاهان تنظیم می‌شود (Okamura and Hirai, 2017). این اسید آمینه برای تولید پورین‌ها^۵ و تیمیدین^۶ نیز مورد نیاز بوده و به‌طور مستقیم با تکثیر سلولی ارتباط دارد (Baek *et al.*, 2003). در شکل ۱، مسیرهای بیوسنتز سیرین در گیاهان و آنزیم‌های مؤثر در آن نشان داده شده است.



شکل ۱. نمودار شماتیک مسیرهای بیوتولید سیرین در گیاهان

تحقیقات بسیار اندکی در ارتباط با جداسازی و مطالعه خصوصیات ژن *PGDH* در موجودات مختلف تاکنون صورت گرفته است (Achouri *et al.*, 1997; Toujani *et al.*, 2013a; Toujani *et al.*, 2013b; Kawabata *et al.*, 2000; Deng

5. Purines
6. Thymidine

1. Annotation
2. Expressed sequence tag
3. Loss of function
4. Gain of function

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تنش در آلوروپوس لیتورالیس
 بذور آلوروپوس لیتورالیس از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد. بعد از شستشو و استریل کردن، بذور در محیط جامد MS کشت و بعد از ۳۰ روز، تیمار شوری به میزان ۶۰۰ mM به صورت پاساژدهی (با اضافه کردن NaCl به میزان ۱۰۰ mM در هر ۴۸ ساعت) در سیستم کشت هیدروپونیک حاوی محلول هوگلند اعمال شد (Hashemi *et al.*, 2014). اندام هوایی گیاهان تنش دیده برداشت و در ازت مایع فریز و سپس در فریزر نگهداری شدند.

آنالیز RACE جهت جداسازی cDNA ژن PGDH
 EST کدکننده ژن *AIPGDH* به طول ۷۰۶ نوکلئوتید با کد دسترسی (EST 40) JK671248 جهت مطالعات بیشتر در این تحقیق انتخاب گردید. استخراج RNA از اندام هوایی گیاه کنترل و تنش داده شده، به روش RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) صورت گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌ها با محاسبه مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ و با استفاده از دستگاه نانودراپ (Peqlab, Germany) اندازه‌گیری شد. خلوص و سلامت RNA استخراجی با استفاده از بیوآنالایزر RNA (Agilent 2100 Bioanalyzer) و کیت RNA 6000 Nano assay (Agilent Technologies) صورت گرفت. طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن PGDH جهت جداسازی cDNA کامل با نرم‌افزار Beacon designer 8.02 و تولید آن در Metabion GmbH صورت گرفت. بدین ترتیب که دو پرایمر جهت 5'RLM-RACE، دو پرایمر برای 3'RLM-RACE و یک پرایمر نیز جهت کنترل مثبت طراحی شد. جداسازی cDNA کامل با تکنولوژی RLM-RACE با استفاده از کیت FirstChoice RLM-RACE kit (Ambion,

et al., 2015; Okamura and Hirai, 2017). تجزیه و تحلیل متابولیسی گیاهان جهش‌یافته و دارای بیان بیش از حد ژن *PGDH* در آرآبیدوپسیس نشان داد که هر سه ژن از خانواده *AtPGDH* در این گیاه می‌توانند پایداری بیان سرین را تنظیم و بیشترین اهمیت را در فرآیند بیوتولید سرین در گیاه دارند (Toujani *et al.*, 2013a). طبق نتایج تحقیق Cascales-Miñana (۲۰۱۳)، آنزیم‌های خانواده PPSB (plastidial phosphorylated) (pathway of serine biosynthesis) نقش مهم و معنی‌داری در تولید سرین و مراحل رشد گیاهان اعم از تکامل جنین، دانه‌گرده و نیز رشد و توسعه ریشه دارند. تغییر بیان خانواده ژنی *AtPGDH* در شرایط نوری نسبت به تاریکی در ریشه‌ها و برگ‌ها به طور قابل توجهی متابولیسم اولیه رشد در آرآبیدوپسیس را تغییر داده و نقش مهمی در رشد سلول‌های فعال غیرتولیدی مانند جنین و دانه‌گرده دارند (Toujani *et al.*, 2013b). بررسی ایزوفرم‌های ژن *PGDH* در گیاه آرآبیدوپسیس نشان داد که فعالیت تمام ایزوفرم‌های این ژن به‌واسطه افزایش غلظت کلرید سدیم و کلرید پتاسیم افزایش معنی‌داری یافتند (Okamura and Hiari, 2017). افزایش فعالیت ژن *PGDH* تحت تیمار کلریدهای مختلف در باکتری *M. tuberculosis* (*MtPGDH*) و سیانوباکتری *A. halophytica* (*AhPGDH*) نیز گزارش شده است (Dey *et al.*, 2005; Waditee *et al.*, 2007; Boland *et al.*, 1983).

هدف این تحقیق، جداسازی ژن فسفوگلیسرات دهیدروژناز از گیاه آلوروپوس لیتورالیس و مطالعه عملکردی جهش‌یافته T-DNA این ژن در گیاه آرآبیدوپسیس تالیانا از طریق مطالعه جهش‌یافته‌های آن (گیاه‌های با T-DNA ورودی در ناحیه کدکننده ژن) نسبت به گیاهان وحشی در مراحل رشدی در شرایط تنش شوری و خشکی می‌باشد.

ATTED-II با استفاده از نرم‌افزار *AIPGDH* (http://atted.jp) انجام شد.

انتخاب گیاه T-DNA و ژنوتایپینگ جهش‌یافته‌های *AtPGDH*

اطلاعات مربوط به ژن همولوگ 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase آرآیدوپسیس (*AIPGDH*) از پایگاه اطلاعاتی TAIR (www.Arabidopsis.org) به دست آمد. گیاهان T-DNA برای ژن مورد نظر در آرآیدوپسیس تالیانا با بررسی پایگاه‌های اطلاعاتی SIGNAL^۱ و TAIR با کد دسترسی AT1G17745 انتخاب گردید. انتخاب گیاهان جهش‌یافته به‌نحوی بوده که T-DNA در منطقه دومین (و یا سومین اگزون با توجه به وجود ۲ ایزوفرم مختلف) و در جهت مخالف جهت ژن وارد شده، تا امکان بررسی اختلال در عملکرد ژن را فراهم نماید. گیاه T3 مورد نظر که به‌وسیله مؤسسه SALK^۲ با کد SALK_069543 ایجاد شده بود، از NASC با کد N569543 از اکوتایپ کلمبیا دریافت شد. بذرها در مخلوط خاک‌های کمپوست غنی شده با نیتروژن و فسفر، پرلیت و ورمیکولیت به نسبت به ترتیب ۳:۱:۱ در سه تکرار کاشته شدند. از آنجایی که گیاهان T-DNA هموزیگوت در این پژوهش مدنظر می‌باشند، آزمایش PCR جهت بررسی هموزیگوسیتی یا هتروزیگوسیتی گیاه‌های جهش‌یافته آرآیدوپسیس صورت گرفت. DNA ژنومی به روش استاندارد (Dellaporta et al., 1983) استخراج گردید. طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن و T-DNA، در پایگاه اطلاعاتی SIGNAL^۳ صورت گرفته (جدول ۲) و ژنوتایپینگ در دو واکنش PCR مجزا اجرا گردید.

(Austin, TX) صورت گرفت. در جدول ۱ لیست پرایمرهای اختصاصی ارائه شده است. مراحل انجام PCR اولیه و nested به‌صورت زیر بود: مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه و به‌مدت ۳ دقیقه، مرحله تکثیر شامل ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه در ۳۵ تکرار و در نهایت مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه و مدت ۷ دقیقه. قطعات جدا شده از 3'RLM-RACE و 5'RLM-RACE پس از خالص‌سازی در ناقل TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) همسانه‌سازی و توالی‌یابی شدند. در ادامه با استفاده از طراحی پرایمر (PIPR و PIPF) از دو انتهای ژن PGDH، قطعه cDNA کامل جداسازی و پس از خالص‌سازی در ناقل TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) همسانه‌سازی و در دو جهت توالی‌یابی شد.

آنالیز بیوانفورماتیکی و بررسی روابط فیلوژنتیکی

توالی ژن *AIPGDH* جدا شده از گیاه آلورپوس با استفاده از الگوریتم‌های BLASTx، BLASTn و tBLASTx موجود در NCBI آنالیز گردید (Zhang et al., 2000). جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی، توالی پروتئینی موجود در گیاهان حاوی PGDH از گونه‌های مختلف مانند *AtPGDH* (*Arabidopsis thaliana*) برنج *ZmPGDH* (*Oryza sativa*) و ذرت *OsPGDH* (*Zea mays*) و... از پایگاه UniProt (Consortium, 2014) اخذ و آنالیز هم‌ردیفی با نرم‌افزار ClustalX 2.1 صورت پذیرفت. درخت فیلوژنتیکی توالی‌های پروتئینی با استفاده از امکانات سایت ebi.ac.uk (https://www.ebi.ac.uk/Tools/services) رسم گردید. آنالیز بیان ژن همولوگ *PGDH* در آرآیدوپسیس با استفاده از داده‌های موجود در سایت Arabidopsis eFP Browser (http://bar.utoronto.ca) و در شرایط تنشی مختلف و همچنین آنالیز هم‌بیانی ژن

1. http://www.signal.salk.edu

2. Syngenta Arabidopsis Insertion Library (SAIL)

3. T-DNA primer design tool

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت جداسازی cDNA ژن PGDH

توالی	کد پرایمر
5'GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	5' RACE Outer
5'CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG	5' RACE Inner
5'GCGAGCACAGAATTAATACGACT	3' RACE Outer
CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG	3'RACE Inner
CCTGCCACATCACAAAACCTC	PGDH-5' RACE-Outer
ATACGCTGCCGCTCATCTGTCT	PGDH-5' RACE Inner
CAACTGCTGTCCTTGTCGGTGA	PGDH-3' RACE Outer
GGGCTATAATATGCAGGGGAGGAA	PGDH-3' RACE Inner

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده جهت ژنوتایپینگ جهش یافته PGDH

اندازه قطعه مورد انتظار		توالی	آغازگر
BP+RP	LP+RP		
562-862	1131	TGAGATCGGTTCAATGATTCC	SALK_069543 LP
		GGAATTGTCGTCAAGTCAAAGC	SALK_069543 RP
		ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	LBb1.3

و خشکی، گیاهان ۴ هفته‌ای کشت شده در خاک، به ترتیب تحت تیمار NaCl به غلظت ۳۰۰ میلی مولار و PEG به غلظت ۲۰ درصد قرار گرفتند (Xu et al., 2010).

نتایج و بحث

بر مبنای مطالعات بیوانفورماتیکی، بررسی الگوی بیان ژن‌های کاندید تحت تنش شوری و شرایط بازیابی و در نهایت مقایسه با نتایج آنالیز میکروآرایه (جهت شناسایی ژن‌های مشترک)، EST کدکننده ژن *AlPGDH* به طول ۷۰۶ با کد دسترسی JK671248 جهت مطالعات بیشتر انتخاب گردید. نظر به اینکه هیچ گونه اطلاعاتی از این ژن در گیاه آلروپوس در دسترس نمی‌باشد، از اطلاعات موجود در پایگاه NCBI جهت برآورد اندازه ژن *AlPGDH* استفاده شد. نتایج هم‌ردیفی در BlastX نشان داد که این EST دارای شباهت بیش از ۹۰ درصدی با ژن *PGDH* در گیاهان *Sorghum bicolor* (XP_002445584.1)، *Setaria italica* (XP_004973582.1)، *Oryza brachyantha* (XP_015695621.1) و *Brachypodium* (XP_015695621.1) است.

واکنش اول، شامل یک پرایمر مخصوص ژن و یک پرایمر مخصوص T-DNA، به منظور تأیید حضور T-DNA بود. واکنش دوم حاوی دو پرایمر مخصوص ژن بود، که به منظور تأیید هموزیگوسیتی و یا هتروزیگوسیتی تداخل انجام پذیرفت. مراحل انجام PCR به صورت زیر بود: مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ دقیقه، مرحله تکثیر شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه در ۳۶ تکرار و در نهایت مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت ۵ دقیقه.

اعمال تنش شوری و خشکی

بذرها با استفاده از محلول ۱ میلی لیتر از اتانول ۷۰٪ حاوی ۱٪ Triton X-100 استریل سطحی و بر روی محیط کشت MS طبق دستورالعمل گانتلت (<http://www.gantlet.org>) کشت شدند. پس از گذشت ۷ روز طول ریشه مورد بررسی قرار گرفته و در ادامه گیاهچه‌ها به محیط پیت ماس منتقل شدند. به منظور بررسی پاسخ جهش یافته‌ها به تنش شوری

با توالی EST، در مجموع قطعه‌ای به طول ۱۵۰۶bp به دست آمد که شامل ناحیه ORF به طول ۱۲۶۸ نوکلئوتید و ناحیه 3UTR به طول ۲۳۸ نوکلئوتید بود. توالی ژن *AIPGDH* به کمک الگوریتم‌های BLASTx و BLASTn با توالی ژنوم آرایی‌دوپسیس تالیانا هم‌ردیف گردید، که همولوژی بالای آن با ژن *Atlg17745* مشاهده گشت، به طوری که میزان همپوشانی و همسانی آن به ترتیب ۹۹ و ۷۶ درصد با *Atlg17745* بود. *Atlg17745* درخت فیلوژنتیکی رسم شده بیانگر قرابت بالای ژن *AIPGDH* با گیاهان تک لپه و خانواده غلات بود، بطوریکه بیشترین شباهت و نزدیکی را با گیاهانی مانند سورگوم، ارزن دم روباهی و برنج داشته و در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۳). آنالیز هم‌ردیفی توالی ژن *PGDH* در گیاهان ذرت، برنج، سورگوم، ارزن و جاروی جنگلی با آلورپوس لیتورالیس نیز نشان‌دهنده شباهت بالای این توالی‌ها با یکدیگر می‌باشد (شکل ۴).

بررسی عملکردی جهش‌یافته *PGDH* در گیاه آرایی‌دوپسیس

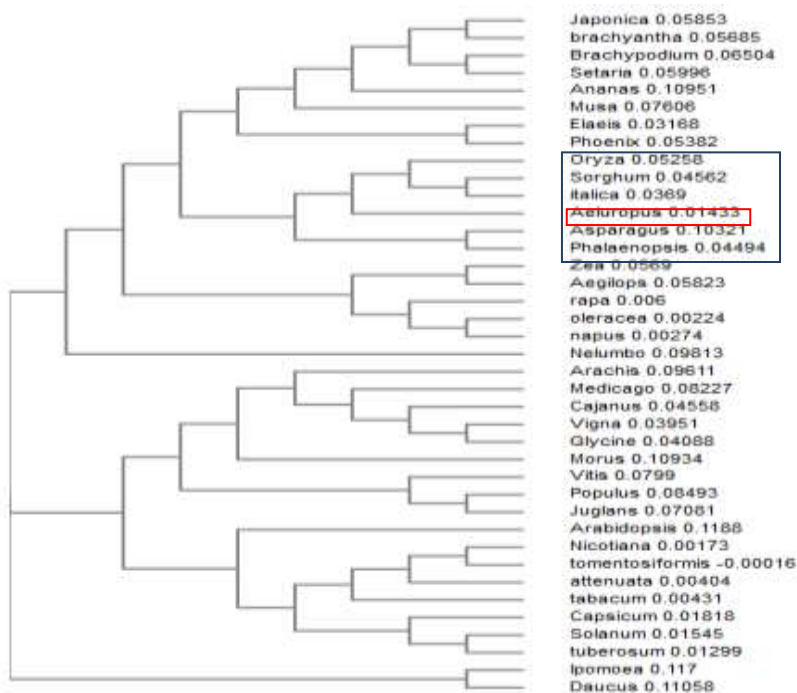
اطلاعات مربوط به ژن همولوگ *PGDH* در آرایی‌دوپسیس، شامل بیان در بافت و مرحله خاصی از نمو و همچنین دخالت در فرایندهای مربوطه، با استفاده از پایگاه اطلاعاتی TAIR به دست آمد. این ژن به صورت Forward بر روی کروموزوم ۱ قرار گرفته است که دارای دو نوع ساختار اسپلاسی می‌باشد که ایزوفرم اول آن شامل ۳ اگزون، ۲ اینترون، ۲ UTR و ایزوفرم دوم آن دارای ۴ اگزون، ۳ اینترون، ۲ UTR می‌باشد. پروتئین آن پپتیدی به طول ۶۵۱ آمینواسید را کد می‌نماید. در شکل ۵-الف نمای شماتیکی از جهش‌یافته T-DNA مورد استفاده نشان داده شده است. از آنجاییکه در این پژوهش گیاه‌های T-DNA هموزیگوت مدنظر می‌باشند، آزمایش PCR جهت بررسی هموزیگوسیتی یا هتروزیگوسیتی در دو واکنش PCR مجزا صورت پذیرفت (شکل ۵-ب).

Oryza distachyon (XP_003574563.1) و *sativa Japonica* (XP_015650533.1) بالاترین میزان همپوشانی و همسانی این ژن با ژن متناظر از گیاه سورگوم، به ترتیب ۸۱ و ۹۳ درصد با *Atlg17745* بود. *Atlg17745* درخت فیلوژنتیکی رسم شده بیانگر قرابت بالای ژن *AIPGDH* با گیاهان تک لپه و خانواده غلات بود، بطوریکه بیشترین شباهت و نزدیکی را با گیاهانی مانند سورگوم، ارزن دم روباهی و برنج داشته و در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۳). آنالیز هم‌ردیفی توالی ژن *PGDH* در گیاهان ذرت، برنج، سورگوم، ارزن و جاروی جنگلی با آلورپوس لیتورالیس نیز نشان‌دهنده شباهت بالای این توالی‌ها با یکدیگر می‌باشد (شکل ۴).

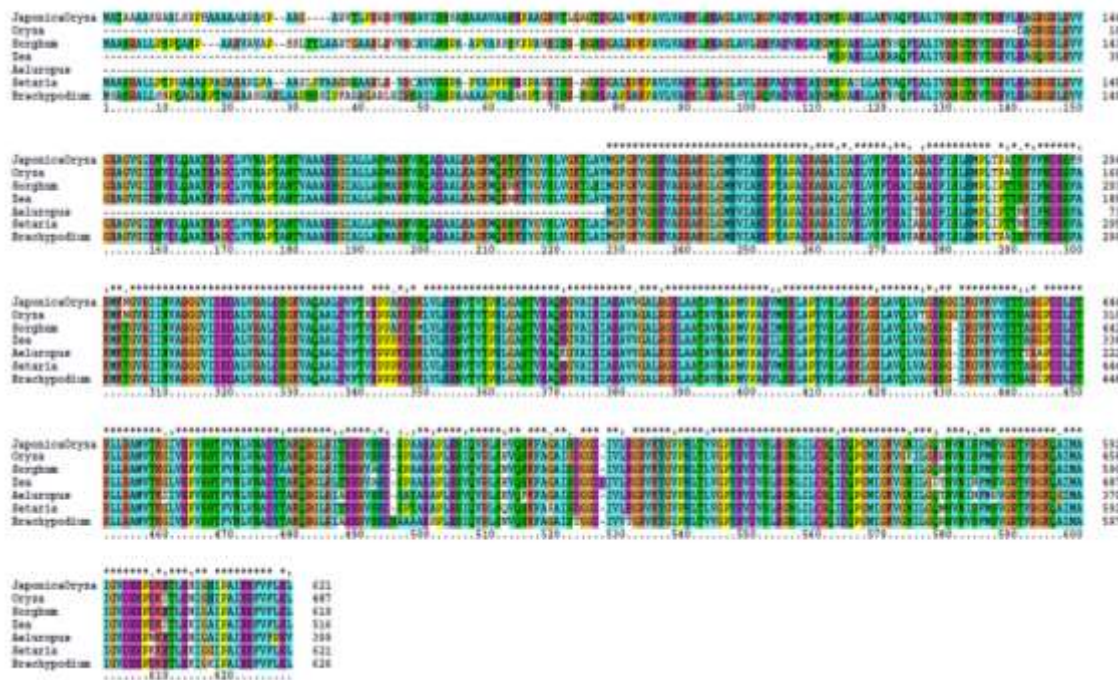


شکل ۲. تصویر ژل تکثیر قطعه ۳ ژن *AIPGDH* به روش RLM-RACE

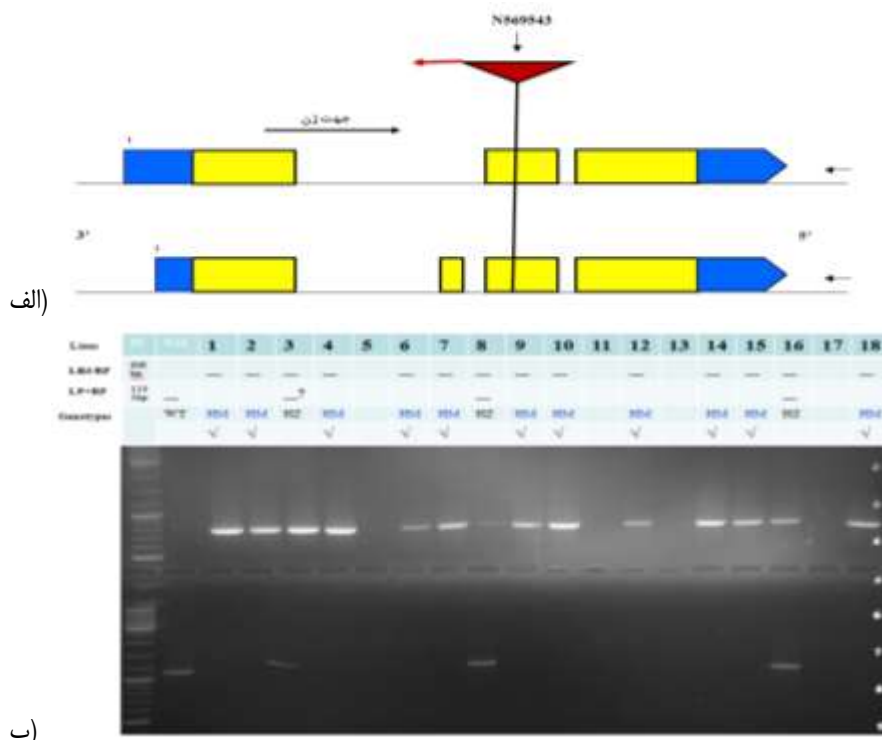
بعد از توالی‌یابی قطعه جدا شده، با همپوشانی آن



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های PGDH در گونه‌های مختلف گیاهی. رسم درخت به روش نزدیک‌ترین همسایه با آزمون بوت‌استرپ^۱ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.



شکل ۴. هم‌مدیف‌سازی توالی‌های پروتئین PGDH در گیاهان مختلف.



شکل ۵. الف) نمای شماتیکی از جهش یافته T-DNA مورد استفاده؛ ب) پروفایل ژل ژنوتایپینگ جهش یافته *PGDH*

مدل آرایه‌وپسیس استفاده شد. به منظور بررسی پاسخ جهش‌یافته‌ها به تنش یونی و اسمزی، گیاهان به ترتیب تحت تیمار کلریدسدیم به غلظت ۳۰۰ میلی مولار و PEG به غلظت ۲۰ درصد قرار گرفتند. گیاهان جهش‌یافته *AtPGDH* در مرحله رشد زایشی، تحت تنش شوری و خشکی در مقایسه با گیاهان کنترل، به میزان بیشتری تحت تأثیر تنش قرار گرفتند. گیاهان جهش‌یافته در شرایط بدون تنش، کاهش رشد چشمگیری را نسبت به گیاهان تیپ وحشی در شرایط کنترل و تنش شوری و خشکی داشتند به گونه‌ای که فنوتیپ گیاهان مشابه با فنوتیپ گیاهان جهش‌یافته تنش دیده شد (شکل ۶-الف). بررسی تغییرات فنوتایپینگ در مرحله روزت (شکل ۶-ب) نشان داد که گیاهان جهش‌یافته در تنش خشکی تحمل بیشتری نسبت به تنش شوری و همچنین نسبت به گیاهان تیپ وحشی خود دارند. تنش شوری و خشکی در گیاهان تیپ وحشی باعث کاهش تعداد برگ‌های گیاه و پیری زود هنگام آن‌ها

واکنش یک، شامل پرایمر مخصوص ژن به‌همراه پرایمر مخصوص T-DNA به‌منظور تأیید حضور T-DNA بود، که در ژنوتایپینگ قطعه‌ای بطول تقریبی ۸۰۰ نوکلئوتید تکثیر نمود. در حالی که واکنش دوم حاوی دو پرایمر مخصوص ژن برای تأیید هموزیگوسیتی یا هتروزیگوسیتی تداخل بود، که طی آن قطعه‌ای به طول ۱۱۳۱ تکثیر گردید. در مجموع از ۵۰ گیاه T3 مورد بررسی، ۲۳ گیاه هموزیگوت جهش‌یافته، ۶ گیاه هتروزیگوت و مابقی هموزیگوت وحشی (Wildtype) بودند.

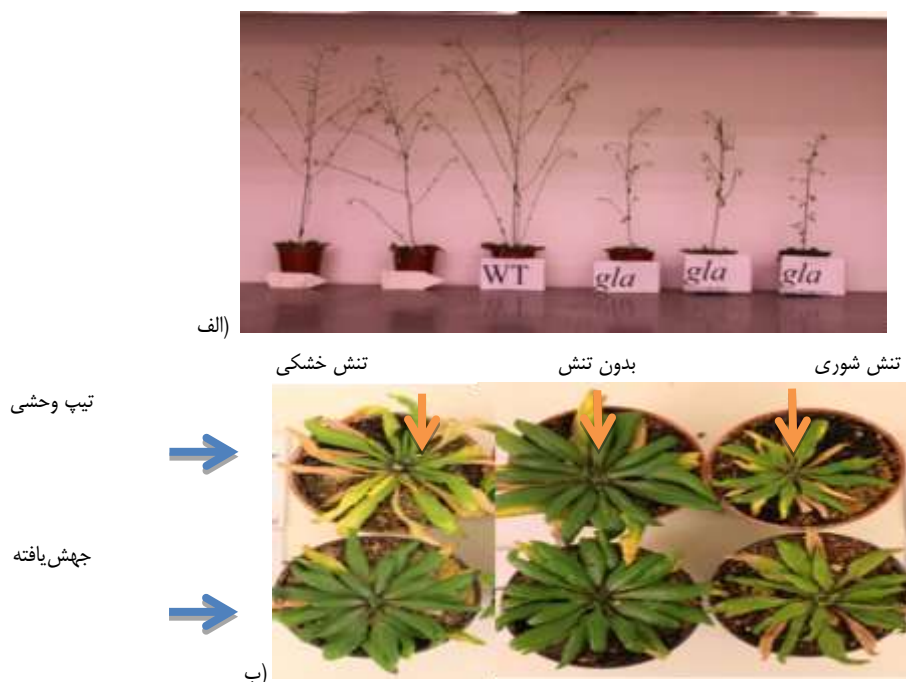
فنوتایپینگ و تنش شوری و خشکی

در تنش شوری دو مرحله مختلف یونی و اسمزی حادث می‌شود، از این‌رو جهت بررسی کارکرد ژن *AIPGDH* تحت این تنش‌ها، روش ژنتیک معکوس مورد توجه قرار گرفت. با توجه به عدم وجود گیاه جهش‌یافته برای این ژن در گیاه آلوروپوس لیتورالیس، از گیاه جهش‌یافته ژن *AtPGDH* در گیاه

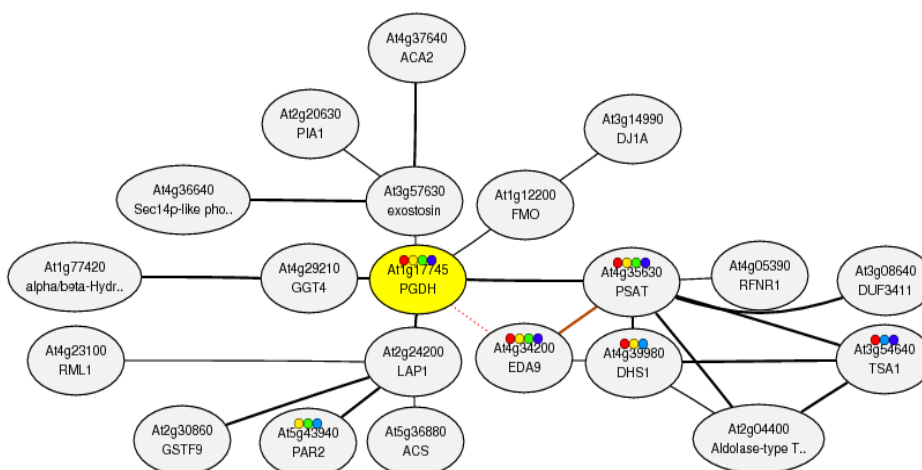
PGDH2 در بافت‌های آوندی برگ و ریشه و نیز در آوندهای گلبرگ‌ها، به طور همزمان افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است، اگرچه بیان این ژن‌ها در بافت‌های رویشی بالا می‌باشد ولی هیچ فعالیتی در مراحل اولیه رشد گیاهچه‌ای نداشتند. با این حال، در طول رشد جنین، *PGDH1* در نوک کوتیلدون‌ها بیان قابل توجهی داشت در حالی که *PGDH2* در این مرحله بیان نشده است. ایجاد جهش یافته در ژن *PGDH1* منجر به مرگ گیاهچه‌ها شده و از رشد آنها جلوگیری کرد. در این جهش یافته‌ها، غلظت اکسین و گلوکوزینولات‌های مشتق شده از تریپتوفان نیز کاهش یافته بود (Benstein et al., 2013). آنالیز تغییرات سطوح رونوشتی ژن *AtPGDH* با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه داده‌های e-FP Browser نشان داد که در شرایط تنش شوری، خشکی و اسمزی، میزان بیان ژن تا ۴ برابر افزایش یافته این موضوع دلیلی بر نقش این ژن در افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌ها می‌باشد (شکل ۸).

شد، درحالی که در گیاهان جهش یافته این کاهش رشد، بسیار کمتر بوده و در تنش خشکی هیچ اختلافی مورفولوژیکی میان گیاه جهش یافته شاهد و تحت تنش مشاهده نشد.

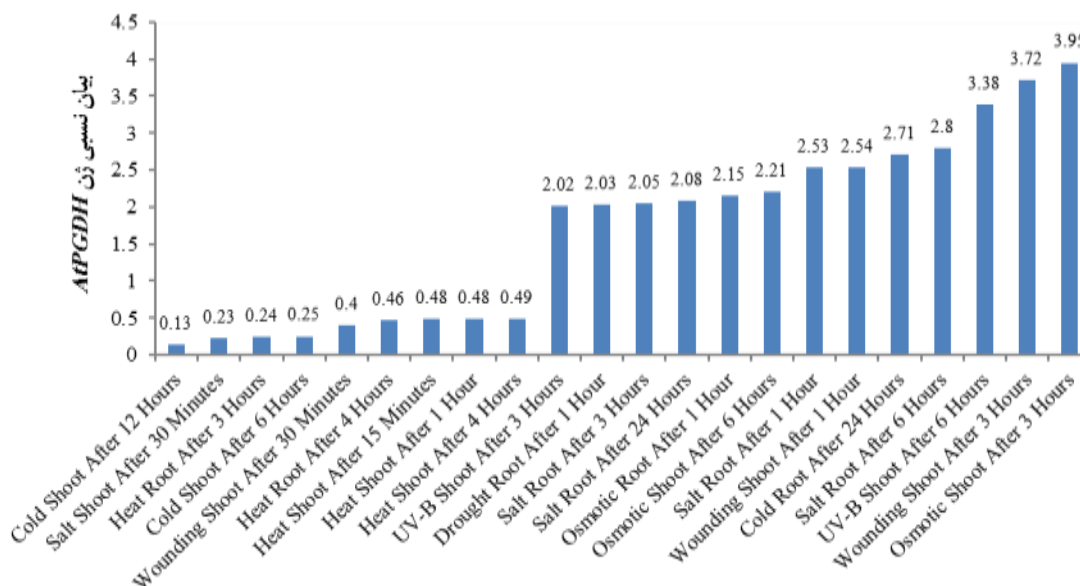
آنالیز شبکه هم‌بیانی ژن *PGDH* در آرکیدوپسیس نتایج بررسی شبکه هم‌بیانی ژن *AtPGDH* در سایت <http://atted.jp>، نشان‌دهنده ژن‌های مؤثر و مرتبط در مسیرهای عملکردی ژن *PGDH* می‌باشد (شکل ۷). این مسیرها شامل مسیر تولید آمینو اسیدها، مسیر تولید آنتی بیوتیک‌ها، مسیر متابولیسم کربن، مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه و مسیر متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین می‌باشد. در مسیر تولید سرین، ژن‌های *At4g34200* (EDA9) و *At4g35630* (PSAT1) (*PGDH1*) و *At3g54640* (TSA1) (*At1g17745*) به همراه ژن *At3g54640* (TSA1) (*PGDH2*) فعالیت می‌نمایند. در گیاهان آرکیدوپسیس بالغ، میزان بیان ژن‌های *PGDH1* و



شکل ۶ الف) به ترتیب از راست به چپ: جهش یافته در تنش شوری، جهش یافته در تنش خشکی، جهش یافته بدون تنش، تیپ وحشی بدون تنش، تیپ وحشی در تنش خشکی و تیپ وحشی در تنش شوری، ب) اعمال تنش در مرحله رشدی روزت.



شکل ۷. آنالیز شبکه هم‌بینی ژن *AtPGDH*



شکل ۸. تغییرات بیان رونوشت ژن *AtPGDH* در تنش‌های مختلف

با تحقیقات صورت گرفته در خلال دهه گذشته، استفاده از گیاهان هالوفیت در کشاورزی جهت مصارف علوفه‌ای، دارویی و به‌عنوان گیاه معطر، در حال گسترش بوده (Flowers *et al.*, 2010) و ژرم‌پلاسما گیاهان هالوفیت می‌تواند ژن‌های مقاوم به شرایط محیطی را جهت برنامه‌های به‌نژادی گیاهان عرضه نماید (Jaradat, 2010). در این تحقیق، توالی ژن *PGDH* از گیاه آلوروپوس در شرایط تنش ۶۰۰ mM شوری جداسازی شد. در تحقیقات گذشته به جداسازی سه ژن *PGDH* از گیاه آراییدوپسیس

(Toujani *et al.*, 2013a) و سه ژن از گیاه برنج (Kito *et al.*, 2017) اشاره شده بود. نتایج همدردی بلاست نشان داد که توالی *AtPGDH* دارای بیشترین شباهت با ژن *SbPGDH* بوده و آنالیز بیوانفورماتیکی ژن همولوگ آن در آراییدوپسیس نشان داد که این ژن در مسیر تولید سرین نقش ایفا می‌کند. در آراییدوپسیس، *PGDH1* (*At1g17745*) مهمترین نقش را در مسیر بیوسنتزی سرین در تمام پیکره گیاه ایفا می‌کند در حالی‌که *PGDH2* (*EDA9, At4g34200*) صرفاً برای رشد

با تحقیقات صورت گرفته در خلال دهه گذشته، استفاده از گیاهان هالوفیت در کشاورزی جهت مصارف علوفه‌ای، دارویی و به‌عنوان گیاه معطر، در حال گسترش بوده (Flowers *et al.*, 2010) و ژرم‌پلاسما گیاهان هالوفیت می‌تواند ژن‌های مقاوم به شرایط محیطی را جهت برنامه‌های به‌نژادی گیاهان عرضه نماید (Jaradat, 2010). در این تحقیق، توالی ژن *PGDH* از گیاه آلوروپوس در شرایط تنش ۶۰۰ mM شوری جداسازی شد. در تحقیقات گذشته به جداسازی سه ژن *PGDH* از گیاه آراییدوپسیس

بیان آن در شرایط تنش شوری و خشکی می‌باشد. از جمله روش‌های بررسی ارتباطات بین ژن‌ها، شبکه‌های هم‌بیان ژنی می‌باشد که با استفاده از محاسبه همبستگی پیرسون محاسبه می‌شوند (Serin *et al.*, 2016). ژن‌ها در صورتی با هم در ارتباط هستند که پروفایل بیانی آنها در پاسخ به شرایط بیرونی و درونی سلول به صورت همزمان تغییر کند (Zhang and Horvath, 2005). در گیاهان از روش شبکه‌های هم‌بیان ژنی در بررسی ارتباطات بین ژن‌ها در شرایط مختلف استفاده شده است (Silva *et al.*, 2016; Omranian *et al.*, 2015; Takehisa *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Tantong *et al.*, 2016). شبکه‌های هم‌بیان وزن‌دار در بررسی ارتباط بین ژن‌های درگیر در تنش شوری در آرآیدوپسیس (Kobayashi *et al.*, 2016)، پیری برگ‌ها در آفتابگردان (Moschen *et al.*, 2016)، خشکی در انگور (Hopper *et al.*, 2016) و تجزیه و تحلیل شبکه ژن‌های متأثر از هورمون‌های گیاهی مانند جاسمونیک اسید (مرتضایی فر و همکاران ۱۳۹۵) به کار رفته و به نقش آنها در پاسخ به تنش‌های محیطی اشاره شده است. نتایج بیان نشان داد که بیان ژن *PGDH* تنها محدود به تنش شوری نشده و در پاسخ به دیگر تنش‌ها نیز نقش دارد. افزایش سطح رونوشتی ژن *PGDH* در آرآیدوپسیس (*AtPGDH*) (Ho and Saito, 2001) و نیز نقش مهم این ژن در بافت‌های مختلف گیاه چغندر قند (*BvPGDHa*) در شرایط تنش شوری (Kito *et al.*, 2017) گزارش شده بود. مطالعه الگوی بیان ژن‌های *PSAT (At4g35630)*، *PGDH (At1g17745)* و *PSP1* در آرآیدوپسیس نشان داد که در ریشه‌ها در شرایط نوری نسبت به تاریکی، بیان بیشتری داشتند. همچنین در برگ‌ها، بیان *PSAT* و *PSP1* در بافت‌های رشد یافته در نور در مقایسه با بافت‌های رشد یافته در تاریکی، افزایش یافته است. خانواده ژنی

دانه گرده و جنین بیان شده و برای ژن *PGDH3 (3-PGDH, At3g19480)* نیز تأثیر فنوتیپی خاصی گزارش نشده است (Benstein *et al.*, 2013; Toujani *et al.*, 2013b). از این رو می‌توان یکی از نقش‌های ژن جداسازی شده از گیاه آلوروپوس را مشارکت در تولید سرین عنوان کرد. اهمیت آمینواسید سرین در فرآیندهای ضروری گیاهان شامل تولید پروتئین، آمینواسیدها، پورین‌ها و پریمیدین‌ها، لیپیدها، متیل‌شدن نوکلئیک اسید و نیز مسیرهای پیام‌رسانی گزارش شده است. افزایش تولید سرین در مسیر فسفوریله شدن در کلروپلاست به‌عنوان یک روش عمومی در پاسخ گیاهان به شرایط شوری بالا می‌باشد. در این شرایط نرخ تولید سرین به‌عنوان واسطه متابولیسم تنفس نوری نیز افزایش می‌یابد. نتایج تحقیق بر روی ژن *PGDH* نشان داد که عملکرد فیزیولوژیکی این ژن بین چغندر قند و آرآیدوپسیس در شرایط تنش یکسان می‌باشد (Kito *et al.*, 2017). در تمام گیاه‌هایی که فعالیت ژن *PGDH* در آنها کاهش یافته بود، تجمع هورمون اکسین نیز به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. در این گیاه‌ها، رشد گیاهان، سطح برگ و طول ریشه در مقایسه با گیاهان شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود (Benstein *et al.*, 2013). آنالیز فنوتایپینگ در شرایط تنش شوری و خشکی نشان داد که در جهش‌یافته‌های *AtPGDH* اختلال در بیان ژن باعث کاهش کارایی گیاه در شرایط تنش شد. الحاق T-DNA به ناحیه کدکننده ژن، می‌تواند منجر به غیرفعال شدن ژن و نیز تغییر کارکردهای آن شود (Nath Radhamony *et al.*, 2005). همچنین در صورت الحاق به منطقه پرموتری منجر به غیرفعال ساختن کامل ژن، کاهش بیان و یا افزایش آن می‌شود. تحقیقات انجام شده، نقش مهم این ژن را در شرایط تنش غیر زیستی تایید نموده و آنالیز بیانی این ژن نیز نشان‌دهنده افزایش سطح

این ژن در آراییدوپسیس و نیز جدا شدن این ژن در شرایط تنش شوری از یک گیاه شورپسند، می‌توان به نقش احتمالی ژن *ALPGDH* در افزایش تحمل گیاه به تنش شوری اشاره نمود.

سپاسگزاری

این مطالعه با استفاده از امکانات آزمایشگاهی و پشتیبانی مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان به انجام رسیده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مساعدت بخش‌های مختلف، به‌ویژه ریاست محترم پژوهشکده قدردانی نمایند.

REFERENCES

- Achouri Y, Rider MH, Schaftingen EV, Robbi M (1997) Cloning, sequencing and expression of rat liver 3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Biochem. J.* 323: 365-370.
- Baek JY, Jun DY, Taub D, Kim YH (2003) Characterization of human phosphoserine aminotransferase involved in the phosphorylated pathway of L-serine biosynthesis. *Biochem. J.* 373: 191-200.
- Benstein RM, Ludewig K, Wulfert S, Witteck S, Gigolashvili T, Frerigmann F, Gierth M, Flügge U, Krueger S (2013) Arabidopsis phosphoglycerate dehydrogenase1 of the phosphoserine pathway is essential for development and required for ammonium assimilation and tryptophan biosynthesis. *Plant Cell.* 25: 5011-5029.
- Boland MJ, Schubert KR (1983) Phosphoglycerate dehydrogenase from soybean nodules: partial purification and some kinetic properties. *Plant Physiol.* 71: 658-661.
- Cao J, K. Schneeberger S, Ossowski T, Gunther S, Bender J, Fitz D, Koenig C, Lanz OS, Lippert C (2011) Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nature genetics.* 43: 956-963.
- Cascales-Miñana B, Muñoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Anoman AD, Pertusa J, Alaiz M, Osorio S, Fernie AR, Segura J, Ros R (2013) The phosphorylated pathway of serine biosynthesis is essential both for male gametophyte and embryo development and for root growth in Arabidopsis. *Plant Cell.* 25: 2084-2101.
- Chenchik A, Zhu Y, Diatchenko L, Li, R, Hill J, Siebert P (1998) Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*, Eds. Siebert, P. & Larrick, J. (Bio-Techniques Books, MA). pp. 305-319.
- Deng Y, Wu D, Tachibana H, Cheng X (2015) Molecular cloning and expression of phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase in the serine biosynthetic pathway from *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res.* 114: 1387-1395.
- Dey S, Hu Z, Xu XL, Sacchettini JC, Grant GA (2005) D-3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* is a link between the *Escherichia coli* and mammalian enzymes. *J. Biol. Chem.* 280: 14884-14891.
- Emrich S, Barbazuk WB, Li L, Schnable

PGDH بر متابولیسم اولیه رشد در آراییدوپسیس اثر گذاشته و نقش مهمی در رشد جنین‌ها و دانه‌گرده دارند (Toujani *et al.*, 2013b). از آنجایی‌که گیاهان برای رشد و سازگاری بیشتر در شرایط مواجهه با تنش‌های محیطی نیازمند هماهنگی بالایی میان فرآیندهای متابولیسمی و رشدی خود هستند، متابولیسم سرین می‌تواند به عنوان یک عامل ارتباطی اولیه در کنترل برخی فرآیندهای زیستی و رشدی در گیاهان ایفای نقش نموده (Toujani *et al.*, 2013b) و با توجه به نتایج این تحقیق، تغییرات فنوتیپی ایجاد شده در گیاهان جهش‌یافته

- PS (2007) Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome res.* 17: 69-73.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Sci.* 296: 92-100.
- Hashemi SH, Nematzadeh G, Askari H, Ghahary S (2014) Involvement of Cytosine DNA methylation in different developmental stages of *Aeluropus littoralis*. *J. Plant Mol. Breed.* 2: 56-67.
- Ho CL, Saito K (2001) Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids.* 20: 243-259.
- Hopper DW, Ghan R, Schlauch KA, Cramer GR (2016) Transcriptomic network analyses of leaf dehydration responses identify highly connected ABA and ethylene signaling hubs in three grapevine species differing in drought tolerance. *BMC Plant Biol.* doi:10.1186/s12870-016-0804-6.
- Kawabata S, Terao Y, Hamada S. (2000) Molecular cloning, sequence and characterization of a novel streptococcal phosphoglycerate dehydrogenase gene. *Oral Microbiol. Immunol.* 15: 58-62.
- Kito K, Tsutsumi k, Rai V, Theerawitaya C, Cha-um S, Yamada-Kato N, Sakakibara S, Tanaka Y, Takabe T (2017) Isolation and functional characterization of 3-phosphoglycerate dehydrogenase involved in salt responses in sugar beet. *Protoplasma.* 254: 2305-2313.
- Kobayashi Y, Sadhukhan A, Tazib T, Nakano Y, Kusunoki K, Kamara M, Chaffai R, Iuchi S, Sahoo L, Kobayashi M, Hoekenga OA, Koyama H (2016) Joint genetic and network analyses identify loci associated with root growth under NaCl stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 39(4): 918-934.
- Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lu F, Marchler GH2, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Geer LY, Bryant SH (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 4(45): 200-203.
- Moschen S, Higgins J, Di Rienzo JA, Heinz RA, Paniego N, Fernandez P (2016) Network and biosignature analysis for the integration of transcriptomic and metabolomic data to characterize leaf senescence process in sunflower. *BMC Bioinformatics.* doi:10.1186/s12859-016-1045-2.
- Nath Radhamony R, Mohan Prasad A, Srinivasan R (2005) T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology.* 8(1): 82-106.
- Okamura E, Hirai MY (2017) Novel regulatory mechanism of serine biosynthesis associated with 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports.* 7: 3533. DOI: 10.1038/s41598-017-03807-5.

- Omranian N, Kleessen S, Tohge T, Klie S, Basler G, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Nikoloski Z (2015) Differential metabolic and coexpression networks of plant metabolism. *Trends Plant Sci.* 20(5): 266-268.
- Serin EAR, Nijveen H, Hilhorst HWM, Ligterink W (2016) Learning from Coexpression Networks: Possibilities and Challenges. *Front. Plant Sci.* doi:10.3389/fpls.2016.00444.
- Takehisa H, Sato Y, Antonio B, Nagamura Y (2015) Coexpression network analysis of macronutrient deficiency response genes in rice. *Rice.* doi:10.1186/s12284-015-0059-0.
- Tantong S, Pringsulaka O, Weerawanich K, Meeprasert A, Rungrotmongkol T, Sarnthima R, Roytrakul S, Sirikantaramas S (2016) Two novel antimicrobial defensins from rice identified by gene coexpression network analyses. *Peptides.* 84: 7-16.
- Toujani W, Muñoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Rosa-Téllez S, Anoman AD, Alseekh S, Fernie AR, Ros R (2013a) Functional Characterization of the Plastidial 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Family in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 163: 1164-1178.
- Toujani W, Muñoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Rosa-Téllez S, Anoman AD, Ros R (2013b) Identification of the phosphoglycerate dehydrogenase isoform EDA9 as the essential gene for embryo and male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* 8:11. e27207, DOI: 10.4161/psb.27207.
- Waditee R, Bhuiyan NH, Hirata E, Hibino T, Tanaka Y, Shikata M, Takabe T (2007) Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants. *J. Biol. Chem.* 282: 34185-34193.
- Wei Y, Guangmin X, Daying Z, Huimin Ch (2001) Transfer of salt tolerance from *Aeluropus littoralis sinensis* to wheat (*Triticum aestivum* L.) via asymmetric somatic hybridization. *Plant Sci.* 161: 259-266.
- Xu J, Tian YS, Peng RH, Xiong AS, Zhu B, Jin XF, Gao F, Fu XY, Hou XL, Yao QH (2010) AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. *Planta.* 231: 1251-1260.
- Zhang B, Horvath S (2005) A general framework for weighted gene coexpression network analysis. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* doi: 10.2202/1544-6115.1128.
- Zhang H, Mao X, Wang C, Jing R (2010) Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2.8 enhances tolerance to drought, salt and low temperature in Arabidopsis. *PLoS One.* 5(12): e16041.
- Zhang JC, Zheng HY, Li YW, Li HJ, Liu X, Qin HJ, Dong LL, Wang DW (2016) Coexpression network analysis of the genes regulated by two types of resistance responses to powdery mildew in wheat. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep23805.
- Zhang Z, Schwartz S, Wanger L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7: 203-214.