

شناسایی *in silico* خانواده ژنی PLD و بررسی الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به تنش شوری در گیاه *Medicago truncatula*

In silico identification of the PLD gene family and analysis of their expression pattern in response to salt stress in *Medicago truncatula*

سمیه الهی^۱، محمد مهدی سوهانی^{۲*}، حسن حسنی کومله^۳

Somayeh Allahi¹, Mohammad Mehdi Sohani² and Hasan Hasani Kumleh³

۱ - دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، ۲ و ۳ - به ترتیب دانشیار و استادیار، گروه
بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

1- MSc. in Plant Biotechnology, 2- Associate Professor and 3- Assistant Professor
Plant Biotechnology Department, Faculty of Agricultural Sciences. University of
Guilan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: msohani@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۹)

چکیده

فسفولیپاز D (PLD) و اسید فسفاتیک حاصل از آن نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای سلولی از جمله رشد و نمو و پاسخ به تنش دارد. PLD ها یک خانواده ژنی مهم را در گیاهان عالی تشکیل می‌دهند. که در آراییدوپسیس، برنج و پنبه شناسایی شده‌اند. در این پژوهش ۱۶ ژن PLD در گیاه *Medicago truncatula* L. شناسایی شد که براساس دمین‌های پروتئینی، روابط فیلوژنی، ساختار ژن و شباهت توالی به ۶ گروه α (۴ ژن)، β (۲ ژن)، γ (۲ ژن)، δ (۳ ژن)، ϵ (۲ ژن)، ζ (۲ ژن) و ϕ (۱ ژن) تقسیم شد. الگوی بیان ژن‌های *MtPLD4* و *MtPLD9* در زیرگروه α و ژن‌های *MtPLD13* و *MtPLD15* در زیرگروه γ/β تحت تنش شوری NaCl با غلظت ۲۳ ds/m در گیاهچه‌های چهار هفته‌ای *M. truncatula* L. با استفاده از qRT-PCR بررسی شد. بیان *MtPLD4* در طی ۴۸ ساعت نسبت به گیاه شاهد به طور معنی‌داری افزایش داشت. الگوی بیان *MtPLD9* و *MtPLD15* در ساعات اولیه روند افزایشی و سپس نسبت به گیاه شاهد کاهش بیان داشت. بیان *MtPLD13* در طی ۴۸ ساعت کاملاً روند کاهشی داشته و سرکوب شد. این نتایج نشان داد که زیرگروه α ژن‌های *MtPLD* کاندیدای مهم و با ارزشی جهت آزمون‌های بعدی و مطالعات ژنومیکس کارکردی است.

واژه‌های کلیدی

اسید فسفاتیک،
تنش شوری،
فسفولیپاز،

Medicago truncatula
qRT-PCR

مقدمه

فسفولیپیدها منبع غنی برای تشکیل حد واسطه‌های پیام رسانی در تنظیم فعالیت‌های سلول هستند. فسفولیپاز D (PLD, EC 3.1.4.4) یک خانواده ژنی مهم از فسفولیپازها را تشکیل می‌دهد که پیوند فسفودی استر انتهایی فسفولیپیدها را هیدرولیز و منجر به تولید اسید فسفاتیک (PA) و یک گروه سر آزاد می‌شود. گروه سر آزاد می‌تواند شامل کولین، اتانول آمین، سرین و گلیسرول باشد. PA حاصل پیام رسان مهم در گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و جانوران است (Hong et al. 2010). در گیاهان، خانواده ژنی PLD شامل چندین عضو است که از نظر بیوشیمیایی، ساختاری و کاتالیکی از یکدیگر قابل تمایز هستند (Chen et al. 2011; Wang et al. 2006). آنزیم PLD در فرآیندهای فیزیولوژیکی زیادی از جمله رشد و نمو، تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری، یخ‌زدگی، زخم، حمله عوامل بیماری‌زا و کمبود مواد غذایی شرکت می‌کند (Hong et al. 2010).

PLD آنزیم درگیر در متابولیسم چربی و بازسازی غشا است که از اوایل دهه ۱۹۴۰ شناسایی شد، اما اولین cDNA کد کننده PLD در سال ۱۹۹۴ از گیاه لوبیا (*Ricinus communis* L.) جداسازی شد (Wang et al. 1994) و تاکنون ژن‌های PLD زیادی از گیاهان مختلف مانند آرابیدوپسیس (Qin and Wang, 2002)، برنج (Li et al. 2007) و ذرت (Qin et al. 1997) شناسایی و کلون شده است. استفاده از داده‌های ژنومی، شناسایی خانواده ژنی PLD را در چندین گونه گیاهی امکان‌پذیر کرده است. تاکنون خانواده ژنی PLD در گیاهان آرابیدوپسیس (Qin and Wang, 2002)، برنج (Li et al. 2007)، پنبه (Tang et al. 2016) شناسایی شده است، همه این گیاهان دارای بیشتر از ده ژن PLD هستند. براساس شباهت توالی و خصوصیات بیوشیمیایی ژن‌های خانواده PLD به شش یا هفت گروه شامل آلفا (α) PLD، بتا (β) PLD، گاما (γ) PLD، دلتا (δ) PLD، اپسیلون (ε) PLD، زتا (ζ) PLD و فی (φ) PLD تقسیم بندی می‌شوند (Li et al. 2007).

همه پروتئین‌های PLD گیاهی شامل دو موتیف کاتالیکی بسیار حفاظت شده هستند، که دمین‌های HKD نامیده می‌شوند. این بخاطر حضور ثابت سه اسید آمینه هیستیدین (H)، لیزین (K) و

اسید آسپارتیک (D) در ساختار دو موتیف HxKxxxxD است. در ساختار اولیه پروتئین این دو دمین از یکدیگر فاصله دارند، اما به منظور تشکیل جایگاه فعال با یکدیگر میانکنش داده و باعث القاء فعالیت فسفولیپازی آنزیم‌های فسفولیپاز می‌شوند (Qin and Wang, 2002). بیشتر فسفولیپازهای گیاهی علاوه بر دو دمین HKD دارای یک دمین C2 نیز هستند که محل اتصال یون Ca^{2+} و دیگر عوامل مؤثر از جمله فسفولیپیدها، اینوزیتول فسفات‌ها و پروتئین‌ها است، همچنین این آنزیم‌ها برای فعالیت نیاز به یون Ca^{2+} دارند (Li et al. 2007). یکسری از پروتئین‌های PLD بجای دمین C2 دارای دمین PX و PH هستند این دمین‌ها می‌توانند به فسفوانیزوتیدها و G پروتئین‌ها متصل شوند، بر این اساس دمین‌های مذکور در پیام رسانی سلول، بازآرایی اسکلت سلولی و دیگر فرآیندهای سلولی نقش دارند (Qin and Wang, 2002). سومین زیرگروه SP-PLD است که فقط یک سیگنال پپتید در سمت N-ترمینال آن شناسایی شده است و موتیف دیگری به غیر از دمین‌های حفاظت شده HKD ندارند. احتمالاً این سیگنال پپتید منجر به مکان‌یابی سلولی اختصاصی مرتبط با عملکردهای فیزیولوژیکی این آنزیم‌ها در طی رشد و نمو و دفاع گیاهان می‌شود. با وجود این، هنوز گزارش دقیقی از عملکرد فیزیولوژیکی این سیگنال پپتید ارائه نشده است (Liu et al. 2010). در خصوص کارکرد آنزیم به طور مثال در گیاه آرابیدوپسیس مطالعات نشان داده است که AtPLD α1 در مقاومت به تنش اسمزی ناشی از شوری و خشکی، پیام رسانی اسید آبسزیک و پیری بذر دارای نقش مؤثری است (Li et al. 2009). آنزیم AtPLD α1 فرآیندهای سلولی را از طریق تولید PA کنترل می‌کند. برای مثال، PA نقش مهمی در بسته شدن سلول‌های محافظ روزنه از مسیر ABA با وساطت واکنش بین ABI1 (ABA insensitive) و G پروتئین ایفا می‌کند (Zhang et al. 2004). این پروتئین به زیر واحد α در G پروتئین متصل می‌شود به گونه‌ای که جهش در G پروتئین از فعالیت آنزیم AtPLD α1 جلوگیری می‌کند. PA تولید شده توسط AtPLD α1 به ABI1 متصل می‌شود که تنظیم کننده منفی در پاسخ ABA است. ABI1 یک پروتئین فسفاتاز 2C است، که اتصال PA فعالیت این آنزیم را کاهش می‌دهد و در نتیجه باعث فعال‌سازی

مواد و روش‌ها

جستجوی بانک‌های اطلاعاتی و شناسایی خانواده ژنی PLD در گیاه *M. truncatula*

در این مطالعه جهت شناسایی اعضاء خانواده PLD یونجه ابتدا فایل سید (Seed) Hidden Markov Model (HMM) (DM) حفاظت شده KHD (PF00614) از پایگاه داده خانواده پروتئینی Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) (Finn et al. 2014)، توالی پروتئین‌های PLD آرآبیدوپسیس (Qin and Wang, 2002) و برنج (Li et al. 2007) به ترتیب از پایگاه داده‌های TAIR10 (<https://www.arabidopsis.org>) و RGAP7 (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) دریافت شد. سپس توالی‌های دریافت شده از طریق روش blastp و tblastn در پایگاه داده پروتئوم یونجه یکساله در پایگاه داده Phytozome v.11 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) مورد استفاده قرار گرفت، در نهایت توالی تکراری حذف و تأیید نهایی حضور DM حفاظت شده KHD با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی Pfam و SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) انجام شد.

وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک تئوریتیکال پروتئین‌های PLD با استفاده از ابزار ProtParam سایت ExPASy (<http://cn.expasy.org/tools>) محاسبه شد. به منظور شناسایی جایگاه سلولی پروتئین‌ها از برنامه CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) جهت نامگذاری ژنهای PLD یونجه، ابتدا پسوند Mt از *Medicago truncatula* و سپس PLD و در نهایت شماره گذاری براساس مکان قرارگیری ژن-ها بر روی کروموزوم‌ها به ترتیب از *MtPLD1* تا *MtPLD16* انجام گرفت.

بررسی فیلوژنی

همردیف سازی توالی پروتئین‌های PLD آرآبیدوپسیس (Qin and Wang, 2002)، برنج (Li et al. 2007)، پنبه (Tang et al. 2016) و یونجه یکساله با استفاده از نرم افزار Clustal X 2.0.8 و درخت فیلوژنی نیز با استفاده از نرم افزار MEGA 6 انجام

مسیر پیام رسانی ABA در گیاه می‌شود (Zhang et al. 2004). مطالعات در گیاه برنج، گوجه فرنگی و آرآبیدوپسیس نشان داده است که در پاسخ به تنش شوری، PA تولید شده توسط PLD $\alpha 1$ از طریق مسیر پیام رسانی پروتئین کیناز فعال کننده میتوزن (MPPK) باعث فعال‌سازی آنتی‌پورتر SOS1 می‌شود (Yu et al. 2010).

آنزیم PLD δ نیز در اتصال میکروتوبول‌ها به غشای سلولی نقش ایفا می‌کند، جهش در ژن این آنزیم باعث حساسیت گیاهان به تنش‌های یخ‌زدگی و اکسیداتیو می‌شود (Zhao et al. 2012). همچنین مطالعات نشان داده است که میزان بیان ژن‌های PLD β در پاسخ به تنش‌های زخم و عوامل بیماری‌زا افزایش پیدا می‌کند (Li et al. 2009).

پروژه‌های توالی یابی کل ژنوم، مطالعه گسترده خانواده‌های ژنی در ارگانیسم‌های مختلف را فراهم کرده است. دسترسی به توالی کامل ژنوم یونجه مطالعه خانواده‌های پروتئینی مختلف را در این گیاه امکان پذیر ساخته است (Zhang et al. 2013). در سال‌های گذشته و با استفاده از تکنیک‌های نوین ژنتیکی، دانشمندان توانسته‌اند بسیاری از ویژگی‌های خانواده‌های ژنی را کشف کنند. تعداد تکرار این ژن‌ها در ژنوم بسیار زیاد است که این ویژگی به رفع نیازهای سلول و نیز بالا رفتن تنوع ژنتیکی موجود کمک می‌کند (Zhang et al. 2013).

اگرچه خصوصیات خانواده PLD در بعضی از گیاهان گزارش شده است اما، هنوز این ژن‌ها در گیاه یونجه یکساله (*M. truncatula* L.) به طور کامل شناسایی نشده‌اند. یونجه یکساله به خاطر ژنوم کوچک، دوره رشدی کوتاه، خودگشتی، توانایی تشکیل گره بر روی ریشه با باکتری رازیویوم به یک گیاه مدل در خانواده بقولات تبدیل شده است (Bell et al., 2001). بنابراین با توجه به مدل بودن در خانواده بقولات در مطالعه حاضر خانواده ژنی PLD از نظر فیلوژنی، مکان کروموزومی ژن‌ها، ساختار ژنی و عناصر تنظیمی مطالعه شد. در مجموع تعدادی ژن‌های PLD در گیاه *M. truncatula* شناسایی و همچنین الگو بیان چهار ژن *MtPLD4*، *MtPLD9*، *MtPLD13* و *MtPLD15* از این خانواده نیز تحت تنش شوری NaCl با غلظت ۲۳ ds/m بررسی شد.

(Tamura *et al.* 2013) و روش neighbor-joining (NJ) با آزمون Bootstrap (1000) رسم شد.

جایگاه کروموزومی، ساختار ژنی و شناسایی موتیف‌های حفاظت شده

جایگاه ژن‌ها بر روی DNA ژنومی با استفاده بانک اطلاعات اختصاصی یونجه Phytozome v.11 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) مشخص شد. ساختار آگزون-اینترون ژن‌های PLD با استفاده از الگوریتم برنامه GSDB (Gene Structure Display Server) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) از طریق مقایسه توالی Coding DNA sequence ژنهای PLD با توالی ژنومیک مربوطه آنها دریافت شده از سایت Phytozome v.11 استفاده از شماره دسترسی هر ژن رسم شد (Hu *et al.* 2014). توالی پروتئین‌های PLD به منظور شناسایی موتیف‌های حفاظت شده با استفاده از برنامه Multiple Expectation maximization (for Motif Elicitation (MEME) (<http://meme-suite.org>) بررسی شد (Bailey *et al.* 2006).

بررسی ناحیه پروموتوری

به منظور شناسایی ناحیه پروموتوری اعضای خانواده PLD یونجه یکساله ۱۵۰۰ bp بالادست کدون آغاز (ATG) ژن‌ها از سایت Phytozome v.11 دریافت و با استفاده از برنامه plantCARE جهت شناسایی عناصر تنظیمی بررسی انجام شد (Lescot *et al.* 2002). شناسایی عناصر تنظیمی در توالی پروموتور می‌تواند به پیش بینی عملکرد ژن‌ها کمک کند.

تنش شوری و بررسی الگوی بیان ژن‌های PLD

در این تحقیق از گیاه یونجه یکساله *M. truncatula*, cultivar Jemalong ژنوتیپ A17 استفاده شد. بذور ژنوتیپ A17 ابتدا در محلول اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۲۰ دقیقه خراش دهی شدند، سپس به مدت ۳ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد

قرار داده شدند. سپس بذور جوانه‌زده در گلدان‌های ۱۵ سانتی‌متری حاوی خاک و پرلایت با نسبت ۳:۱ کشت شده و در شرایط رشدی ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه نگهداری شدند. سپس گیاهچه‌ها تحت تنش شوری NaCl با غلظت ds/m ۲۳ قرار گرفتند. گیاهان شاهد با آب مقطر آبیاری شدند و نمونه-گیری از گیاهچه کامل در ساعات ۰، ۵، ۱۰، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت پس از تیمار انجام شد (Castroluna *et al.* 2014).

استخراج RNA از نمونه‌های گیاهچه کامل با استفاده از کیت RNX-Plus (سینا کلون) و دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. حذف آلودگی DNA ژنومی نمونه‌های استخراج شده با آنزیم DNase I (Thermo Fisher) انجام شد. یک میکرو گرم از RNA جهت سنتز cDNA و با استفاده از Oligo dT براساس دستورالعمل شرکت سازنده (Thermo Fisher) استفاده شد. به منظور انجام واکنش Real Time-PCR پرایمر برای توالی Coding DNA sequence ژن‌های *MtPLD13*، *MtPLD9*، *MtPLD4*، *MtPLD15* که شماره دستیابی و دیگر مشخصات آن‌ها در جدول شماره ۲ ذکر شده و ژن مرجع *Actin-2* به شماره دسترسی XM_003602497.2 با استفاده از نرم افزار Primer3 طراحی شد. پس از طراحی پرایمر Blast primer در سایت NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) انجام شد که بطور اختصاصی فقط ژن‌های مذکور را تکثیر می‌کنند. دمای اتصال و طول قطعه تکثیر شده مطابق جدول ۱ می‌باشد. هر واکنش Real Time-PCR شامل ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۳ میکرولیتر از هر آغازگر، ۶/۲۵ Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher)، ۴/۶۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل بود. برای انجام واکنش Real Time-PCR از دستگاه CFX96 (Bio-Rad) استفاده شد. فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای بررسی داده‌ها استفاده گردید (Livak and Schmittgen, 2001).

جدول ۱- ویژگی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real Time-PCR

Table 1- Features of primers used in Real Time-PCR reactions

Primer name	Sequence	دمای اتصال °C	طول قطعه bp
MtPLD4-For	CGCATGTCTGTTGTGGTATGA	54.4	170
MtPLD4-Rev	ATGGGATAGCGGAGAAGGTG		
MtPLD9-For	AGCCCATGCTCTCTCCCTAA	57.8	123
MtPLD9-Rev	GGCGTTGAGAACCATCAGA		
MtPLD13-For	GTGACAGAGATGAGAGGGCA	57.8	105
MtPLD13-Rev	TCCTCCGACATCAGGGAAC		
MtPLD15-For	ACACAGCGTATGTAAAGGCCA	58.8	225
MtPLD15-Rev	CACCTGTTGGAACACCCTCT		
Actine2-For	CAAATGTTCTGTGGCAGCCC	57.8	202

نتایج و بحث

شناسایی خانواده ژنی PLD در گیاه *M. truncatula*

به منظور شناسایی اعضای خانواده ژنی *PLD*، پروفایل HMM دمین حفاظت شده (PF00614) KHD (Finn et al. 2014) و توالی پروتئین‌های *PLD* در آرکیدوپسیس (Qin and Wang, 2002) و برنج (Li et al. 2007) جهت بررسی پایگاه‌های داده موجود برای گیاه *M. truncatula* از طریق روش blastp و tblastn استفاده شد. حضور دو دمین حفاظت شده KHD در توالی‌های شناسایی شده و تأیید آن‌ها به عنوان ژن *PLD* با برنامه‌های Pfam و SMART انجام شد و در مجموع ۱۶ توالی کد کننده *PLD* به عنوان اعضای خانواده *PLD* در گیاه *M. truncatula* شناسایی شدند (جدول ۲). تعداد ژن‌های *PLD* در آرکیدوپسیس، برنج و انگور به ترتیب ۱۲، ۱۷ و ۱۱ می‌باشد (Qin and Wang, 2002; Li et al. 2007; Liu et al. 2010). نامگذاری ژن‌های *PLD* در آرکیدوپسیس و برنج با استفاده از حروف یونانی و در انگور بر اساس مکان قرارگیری ژن‌ها بر روی کروموزوم‌ها انجام می‌شود (Qin and Wang, 2002; Li et al. 2007; Liu et al. 2010). در این پژوهش براساس ترتیب قرارگیری ژن‌ها از *MtPLD1* تا *MtPLD16* نامگذاری انجام شد (جدول ۲).

طول پروتئین‌های این خانواده از ۴۵۴ تا ۱۱۲۰ اسید آمینه، وزن مولکولی آن‌ها از ۸۵/۴۹ تا ۱۲۷ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک آن‌ها از ۵/۵ تا ۷/۵۷ متغیر است (جدول ۲). همچنین، ۱۲ پروتئین از ۱۶ پروتئین *PLD* شناسایی شده در سیتوپلاسم، ۳ پروتئین در هسته قرار داشته و پروتئین *MtPLD5* خارج سلولی است (جدول ۲).

براساس حضور دمین‌های C2، PX/PH در سمت N-ترمینال اعضای خانواده *PLD*، آن‌ها به دو زیرگروه C2-*PLD* و *PLD* PX/PH تقسیم می‌شوند، علاوه براین، *MtPLD5* دارای یک سیگنال پپتید در سمت N-ترمینال است که در گروه SP-*PLD* قرار می‌گیرد. گروه SP-*PLD* در دیگر گیاهان از جمله آرکیدوپسیس، برنج و پنبه نیز مشاهده شده است (Qin and Wang, 2002; Li et al. 2007; Tang et al. 2016).

جایگاه کروموزومی ژن‌های *PLD*

بررسی جایگاه کروموزومی نشان داد که بیشترین تعداد ژن‌های *PLD* به تعداد ۴ عدد بر روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارد. کروموزوم‌های شماره ۲، ۵، ۸ هر کدام شامل سه ژن *PLD* بوده و کروموزوم‌های شماره ۱، ۴، ۷ دارای یک ژن *PLD* هستند (جدول ۲).

جدول ۲- ژنهای PLD شناسایی شده در گیاه *M. truncatula*: وزن مولکولی (MW) و نقطه ایزوالکتریک (PI) تئوریتیکال به وسیله سایت ExPASy (<http://cn.expasy.org/tools>) محاسبه شد. جایگاه درون سلولی با استفاده از نرم افزار CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) بررسی شد: سیتوپلاسمی (C)، هسته‌ای (N) و خارج سلولی (E).

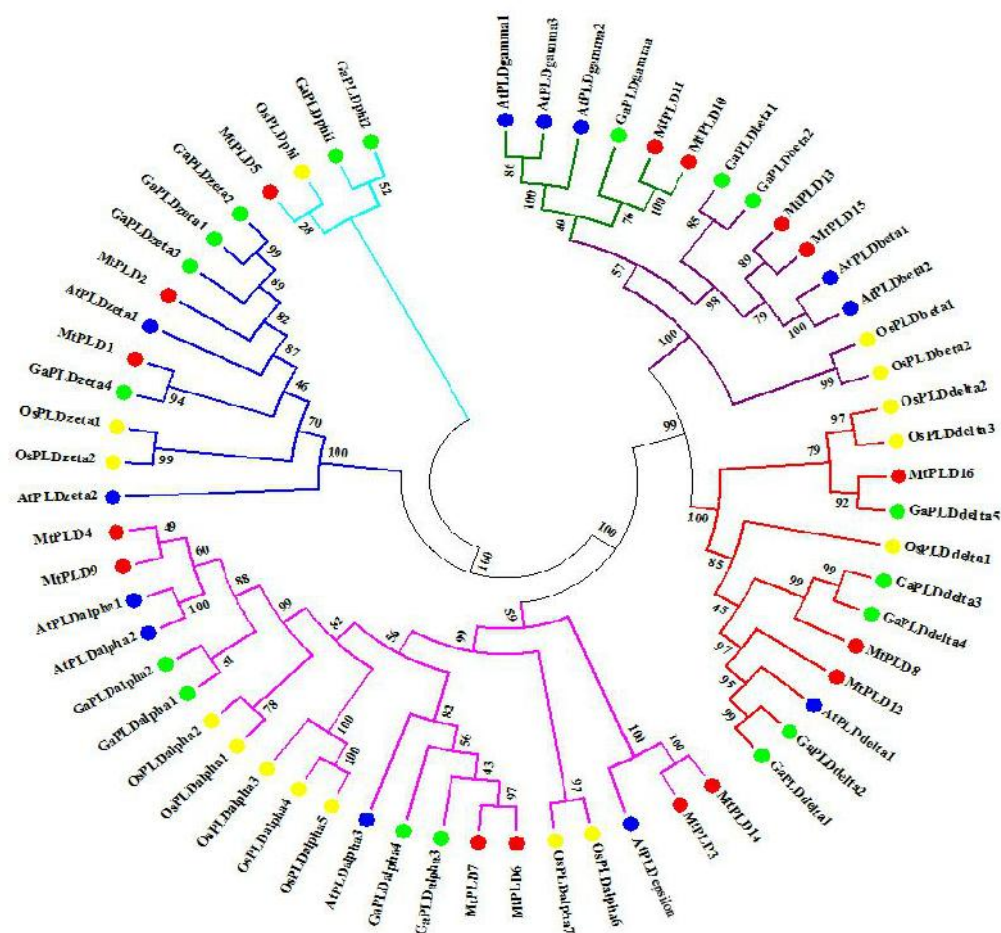
Table 2- PLD genes identified in *M. truncatula*: The theoretical molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) were calculated by ExPASy (<http://cn.expasy.org/tools>). Subcellular localization was analyzed using the CELLO v2.5 server (<http://cello.life.nctu.edu.tw>): Cytoplasmic (C), Nuclear (N), and Extracellular (E).

Gene accession	Gene name	Chromosomal location	protein length	Subcellular localization	PI	(kD) MW	Gene family
Medtr1g083620	MtPLD1	Chr1:49508623-4912180	1076	C	6.08	93.44	PX/PH
Medtr2g435560	MtPLD2	Chr2:49519858-49523035	1120	N	6.34	93.51	PX/PH
Medtr2g100250	MtPLD3	Chr2:53616531-53625621	756	C	6.4	96.7	C2
Medtr2g103730	MtPLD4	Chr2:44659285-44664355	809	C	5.5	92.01	C2
Medtr3g105980	MtPLD5	Chr3:36839079-36842813	454	E	7.16	95.15	SP
Medtr3g107320	MtPLD6	Chr3:12689232-1296809	826	C	6.26	117.38	C2
Medtr3g107360	MtPLD7	Chr3:28529456-28536289	822	C	5.94	124.68	C2
Medtr3g114840	MtPLD8	Chr3:9150832-9158708	851	C	7.42	98.63	C2
Medtr4g010650	MtPLD9	Chr4:3117305-3121525	808	C	5.61	95.56	C2
Medtr5g011050	MtPLD10	Chr5:5398602-5403013	854	C	7.39	85.49	C2
Medtr5g011060	MtPLD11	Chr5:43050907-43054891	848	C	6.77	86.8	C2
Medtr5g023050	MtPLD12	Chr5:3110569-3115901	872	C	6.5	95.97	C2
Medtr7g075910	MtPLD13	Chr7:2414519-2419452	1114	N	7.57	91.43	C2
Medtr8g016160	MtPLD14	Chr8:13741632-13760157	745	C	6.38	127	C2
Medtr8g033080	MtPLD15	Chr8:37204933-37213116	1049	N	6.59	122.8	C2
Medtr8g088690	MtPLD16	Chr8:48870681-48875085	842	C	7.08	51.47	C2

بررسی روابط فیلوژنی ژنهای PLD

به منظور دسته‌بندی ژنهای PLD شناسایی شده و بررسی روابط تکاملی، توالی پروتئینی ژنهای مربوطه و توالی پروتئینی PLD گیاهان آرابیدوپسیس، برنج و پنبه بررسی فیلوژنی شد. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA 6 و روش اتصال همسایه ((Neighbor-Joining (NJ) با آزمون Bootstrap (1000) رسم شد. درخت فیلوژنی رسم شده نشان می‌دهد پروتئین‌های PLD از چهار گیاه موردنظر به ۶ دسته تقسیم می‌شوند. در میان این دسته‌ها، ایزوفورم‌های β و γ در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند و بطور کامل از یکدیگر جدا نیستند، پروتئین‌های MtPLD13 و MtPLD15 در زیرگروه β و پروتئین‌های MtPLD10 و MtPLD11 در زیرگروه γ قرار گرفته‌اند. این دسته بندی در گیاهان آرابیدوپسیس (Qin and Wang, 2002)، برنج (Li et al. 2007)، پنبه (Tang et al. 2016) و انگور (Liu et al. 2010) نیز مشاهده شده است. در بین این دسته‌ها، زیر گروه α بزرگترین دسته را

تشکیل می‌دهد و شامل ۱۸ عضو است. پروتئین‌های MtPLD4، MtPLD6، MtPLD7 و MtPLD9 در زیرگروه α قرار می‌گیرند. زیرگروه‌های γ/β و δ نیز یک دسته بزرگ را تشکیل می‌دهند، پروتئین‌های MtPLD8، MtPLD12 و MtPLD16 در زیر گروه δ قرار می‌گیرند. این دو زیرگروه احتمالاً از یک جد مشترک بوسیله مضاعف شدن ژن‌ها منشأ گرفته باشند. در میان این زیرگروه‌ها، زیرگروه‌های α ، γ/β ، δ ، ϵ دسته C2-PLDs را تشکیل می‌دهند در حالیکه زیرگروه ζ شامل پروتئین‌های MtPLD1 و MtPLD2 و زیرگروه ϕ شامل پروتئین MtPLD5 به ترتیب PX/PH-PLDs و SP-PLDs را تشکیل می‌دهند. علاوه براین، زیرگروه‌های ζ و ϕ جدا از یکدیگر قرار گرفته‌اند و به نظر می‌رسد مسیر تکاملی متفاوتی را طی کرده باشند. در هر دسته پروتئین‌های PLD گیاهان دولپه (آرابیدوپسیس، پنبه و یونجه) رابطه تکاملی نزدیکتری نسبت به پروتئین‌های PLD گیاه تک لپه برنج دارند.



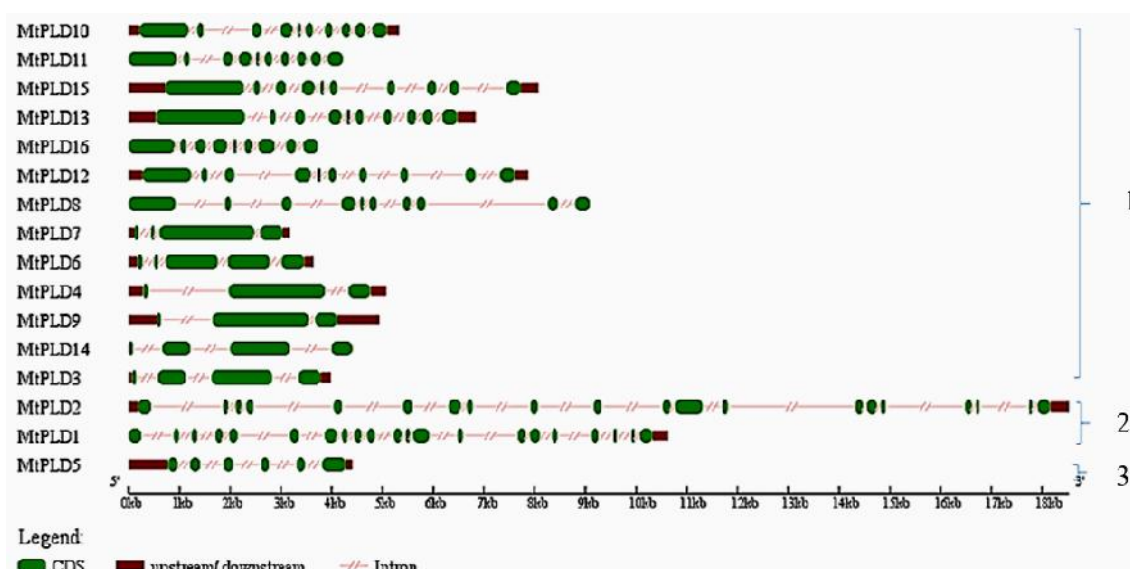
شکل ۱- بررسی درخت فیلوژنی پروتئین‌های PLD در آرابیدوسیس (AtPLD)، برنج (OsPLD)، پنبه (GaPLD) و یونجه یکساله (MtPLD): درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA 6 و روش (NJ) با آزمون Bootstrap (1000) رسم شده است.

Fig 1- Phylogenetic analyses of PLD proteins in Arabidopsis (AtPLD), rice (OsPLD), cotton (GaPLD) and *M. truncatula* (MtPLD): phylogenetic tree was constructed using the NJ method with bootstrapping analysis (1000 replicates).

دارد. بطور مشابه اعضای زیرگروه‌های α و ϵ نیز دارای ۳-۵ اگزون می‌باشند که احتمالاً این دو زیرگروه هم از یک جد مشترک ناشی شده‌اند. اعضای زیرگروه ζ که شامل PX/PH-PLDs هستند و در دسته متفاوتی از دسته C2-PLDs قرار گرفته‌اند و بین ۲۰-۲۱ اگزون داشته و زیرگروه ϕ شامل *MtPLD5* نیز دارای ۶ اگزون است. این نتایج پیشنهاد می‌کند که این دو زیرگروه مسیر تکاملی جدا از C2-PLDs منشأ گرفته باشند. این نتایج با ساختار اگزون-اینترون پروتئین‌های PLD دیگر گیاهان نیز مانند آرابیدوسیس، برنج، پنبه و انگور مطابقت دارد (Qin and Wang, 2002; Li et al. 2007; Liu et al. 2010; Tang et al. 2016).

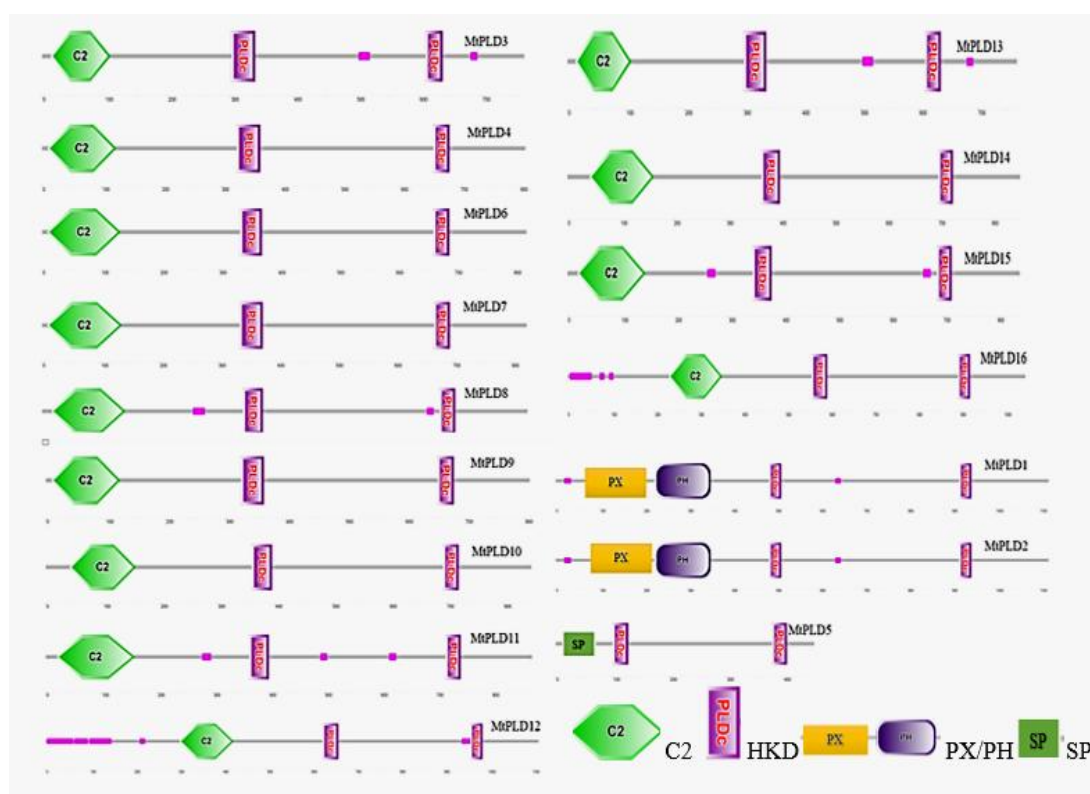
سازمان‌دهی اگزون-اینترون و ساختار دمین ژن‌های PLD

بررسی ساختار ژنی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با روابط تکاملی درون خانواده‌های ژنی و پدیده‌های مضاعف شدگی فراهم کند. بر این اساس ساختار اگزون-اینترون هر یک از اعضای PLD با استفاده از نرم افزار MEME بررسی شد (شکل ۲). تعداد اگزون‌های پیش بینی شده برای اعضای خانواده PLD از ۳ اگزون در *MtPLD4* تا ۲۱ اگزون در *MtPLD1* متغیر بود. بیشتر اعضای درون یک زیرگروه تعداد اگزون-اینترون و طول توالی کد کننده (CDS) مشابهی دارند، مانند زیرگروه‌های γ/β و δ که دارای ۹-۱۰ اگزون با طول توالی CDS بین ۱۱۱۴-۸۴۲ کدون می‌باشد، که این نتایج با منشأ گرفتن این پروتئین‌ها از یک جد مشترک از طریق مضاعف شدن‌های متوالی سازگاری



شکل ۲- ساختار اگزون-اینترون ژنهای *MtPLD*: جعبه‌های سبز رنگ و خطوط به ترتیب اگزون و اینترون هستند. شماره‌ها به ترتیب نشان‌دهنده ۱- C2-PLD ۲- PX/PH-PLD ۳- SP-PLD هستند. ساختار اگزون-اینترون شماتیک با استفاده از برنامه GSDS (Gene Structure Display Server) رسم شده است.

Fig 2- Exon-intron structure of *MtPLD* genes: the green boxes and lines indicate the exons and introns. The numbers are presented respectively 1- C2-PLD 2- PX/PH-PLD 3- SP-PLD. Schematic diagram for the exon/intron organization was constructed using the GSDS (Gene Structure Display Server) program.



شکل ۳- ساختار دمین توالی‌های پروتئینی *MtPLD*: دمین‌های مختلف با رنگ‌های متفاوت مشخص شده‌اند. ساختار دمین شماتیک با استفاده از الگوریتم برنامه SMART رسم شده است.

Fig 3- Domain structure of *MtPLD* protein sequences: Different domains marked with different colors. Schematic diagram for the Domain structure was plotted using the SMART program algorithm.

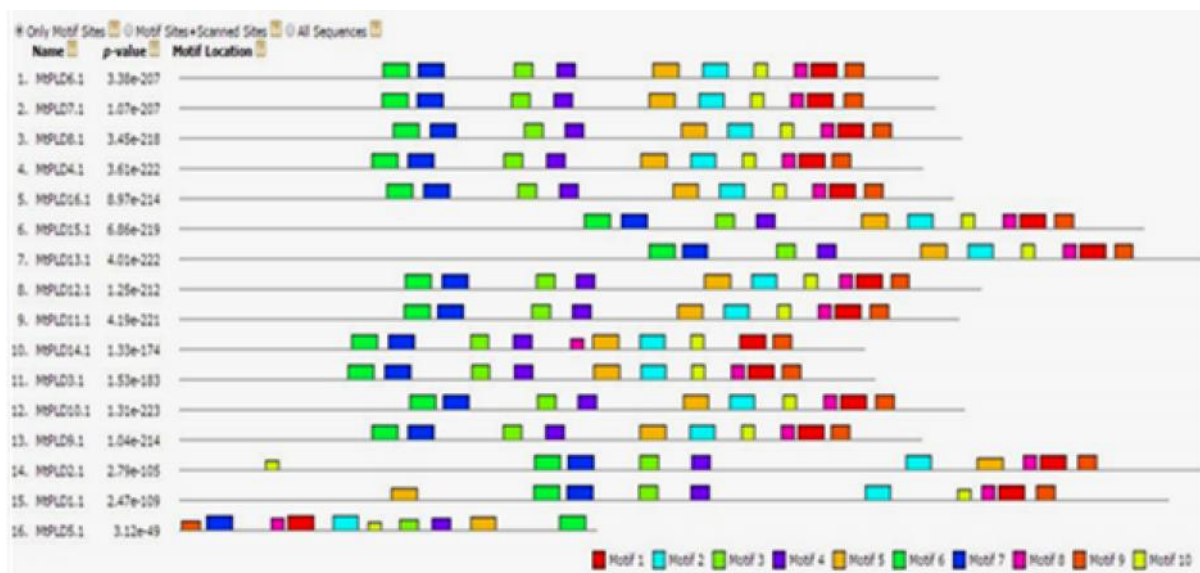
موتیف‌ها در پایگاه داده

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>)

CDD نشان داد که این موتیف‌ها به عنوان موتیف‌های درگیر در فعالیت کاتالیکی آنزیم‌های خانواده PLD هستند. این موتیف‌ها در پروتئین‌های PLD دیگر گیاهان از جمله آرابیدوپسیس، برنج، پنبه، انگور و فلفل نیز دیده شده است (Qin and Wang, 2002; Li et al. 2007; Liu et al. 2010; Tang et al. 2016). تمام اعضای این خانواده دارای ۱۰ موتیف بوده ضمن اینکه، در هر سه زیرخانواده توزیع مکانی موتیف‌ها تقریباً یکسان است. به عنوان مثال در زیر خانواده C2-PLD هر یک از زیر گروه‌های α ، β ، γ ، δ و ϵ جایگاه موتیف‌ها بر روی پروتئین‌ها تقریباً یکسان است و همین‌طور در زیر خانواده‌های PX/PH-PLD و SP-PLD نیز این امر صادق است. همچنین مکان و ترتیب قرارگیری موتیف‌ها در زیر خانواده‌های PX/PH-PLD و SP-PLD که در یک دسته مجزا در درخت فیلوژنی قرار می‌گیرند، نسبت به یکدیگر و زیرخانواده C2-PLD متفاوت است. این نتایج نیز صحت گروه‌بندی اعضای خانواده MtPLD را در سه زیرخانواده ذکر شده تأیید می‌کند.

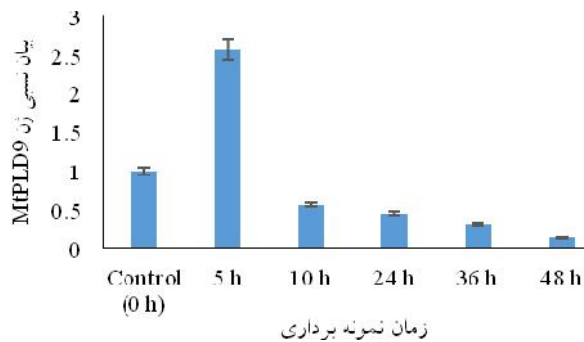
بررسی دمین توالی‌های پروتئین MtPLD جهت شناسایی دمین‌های اصلی با برنامه Pfam و SMART انجام شد (شکل ۳). نتایج بررسی نشان داد که تمامی پروتئین‌های MtPLD دارای دو دمین حفاظت شده اصلی HKD هستند، که در شکل ۳ با نام PLDc مشخص شده است. این دو دمین در تشکیل جایگاه فعال آنزیم‌های PLD و فعالیت فسفولیپازی آنها نقش مؤثر دارند. علاوه بر این، ۴ دمین دیگر (دمین C2، دمین PX، دمین PH، دمین SP) نیز در سمت N-ترمینال این خانواده شناسایی شد، که این دمین‌ها در دیگر گیاهان آرابیدوپسیس (Qin and Wang, 2002)، برنج (Li et al. 2007)، پنبه (Tang et al. 2016)، فلفل (Liu et al. 2010) و انگور (Liu et al. 2010) نیز مشاهده شده است. همان‌طور که قبلاً ذکر شد اعضای خانواده MtPLD نیز مانند دیگر گیاهان بر پایه این دمین‌ها به سه زیرخانواده C2-PLD (α ، β ، γ ، δ و ϵ)، PX/PH-PLD (ζ) و SP-PLD (φ) تقسیم می‌شوند.

به منظور بدست آوردن اطلاعات بیشتر از دیگر موتیف‌های موجود در پروتئین‌های خانواده MtPLD از برنامه MEME جهت شناسایی این موتیف‌ها استفاده شد (شکل ۴). بر این اساس ۱۰ موتیف توالی در این خانواده شناسایی شد بررسی این



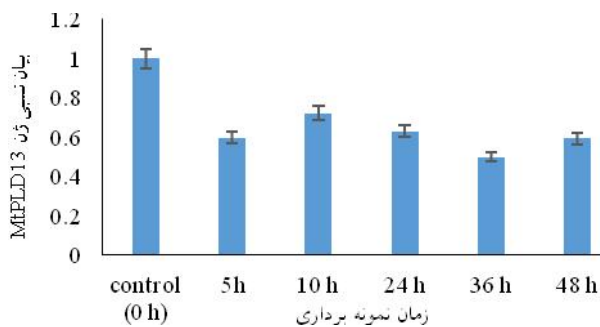
شکل ۴- بررسی موتیف‌های پروتئین‌های خانواده MtPLD: موتیف‌های مختلف با رنگ‌های مختلف مشخص شده است. ساختار شماتیک موتیف با استفاده از الگوریتم برنامه MEME رسم شده است.

Fig 4. Motif analysis of MtPLD proteins: Different motifs are indicated by different colors. Schematic diagram for the motif structure was represented by MEME program algorithm.



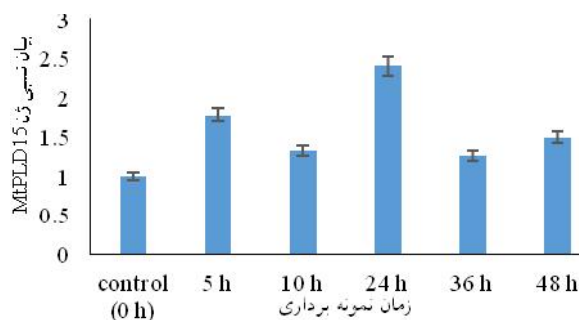
شکل ۶- الگوی بیان ژن *MtPLD9* تحت تنش شوری NaCl با غلظت ۲۳ ds/m (داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد ارائه شده‌اند)

Fig 6- Expression patterns of *MtPLD9* under 23 ds/m NaCl salt stress (Data are presented as mean $\pm$ standard error)



شکل ۷- الگوی بیان ژن *MtPLD13* تحت تنش شوری NaCl با غلظت ۲۳ ds/m (داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد ارائه شده‌اند)

Fig 7- Expression patterns of *MtPLD13* under 23 ds/m NaCl salt stress (Data are presented as mean $\pm$ standard error)

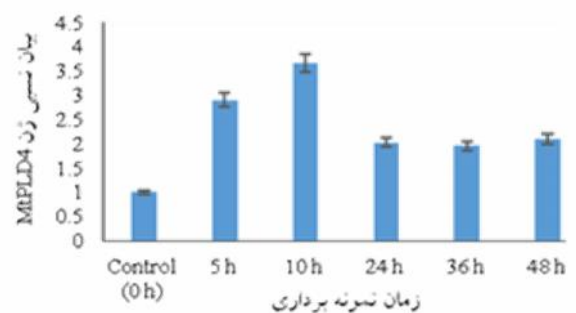


شکل ۸- الگوی بیان ژن *MtPLD15* تحت تنش شوری NaCl با غلظت ۲۳ ds/m (داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد ارائه شده‌اند)

Fig 8- Expression patterns of *MtPLD15* under 23 ds/m NaCl salt stress (Data are presented as mean $\pm$ standard error)

اثر تیمار شوری بر روی بیان برخی از ژن‌های *MtPLD*

در این آزمایش الگوی بیان ژن‌های *MtPLD4*، *MtPLD9*، *MtPLD13*، *MtPLD15* تحت تنش شوری NaCl با غلظت ۲۳ ds/m بررسی شد. نتایج نشان داد بیان ژن *MtPLD4* در طی ۱۰ ساعت افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود تقریباً ۴ برابر گیاهان شاهد رسید و بعد از آن به تدریج در طی زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت مقدار آن کاهش یافت (شکل ۵)، اما، در بازه‌های زمانی ۵، ۱۰، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بیان این ژن نسبت به شاهد بطور معنی‌داری افزایش نشان داده است.



شکل ۵- الگوی بیان ژن *MtPLD4* تحت تنش شوری NaCl با غلظت ۲۳ ds/m (داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد ارائه شده‌اند)

Fig 5- Expression patterns of *MtPLD4* under 23 ds/m NaCl salt stress (Data are presented as mean $\pm$ standard error)

الگو بیان ژن *MtPLD9* در طی ساعات اولیه افزایش پیدا می‌کند و به بیشترین مقدار خود تقریباً ۲/۵ برابر گیاهان شاهد در ساعت ۵ می‌رسد که تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد دارد و بعد از آن در طی زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بیان این ژن به شدت کاهش و به یک هفتم مقدار بیان اولیه آن در گیاهان شاهد در زمان ۴۸ ساعت رسید (شکل ۶).

بیان ژن‌های *MtPLD13* و *MtPLD15* نیز به ترتیب در شکل‌های ۷ و ۸ نشان داده شده است. بیان ژن *MtPLD13* کلاً روند کاهشی داشت و به تدریج بیان آن در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت کاهش می‌یابد و تقریباً به یک دوم مقدار اولیه آن در شاهد پس طی ۴۸ ساعت رسید.

بیان ژن *MtPLD15* در طی زمان‌های ۵، ۱۰ و ۲۴ ساعت افزایش پیدا می‌کند و به بیشترین مقدار خود (تقریباً ۲/۵ برابر گیاهان شاهد) در زمان ۲۴ ساعت می‌رسد که تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد دارد و بعد از گذشت این زمان، در طی زمان‌های ۳۶ و ۴۸ ساعت بیان آن کاهش می‌یابد و تقریباً به حدود مقدار اولیه آن در گیاهان شاهد می‌رسد.

متعاقب تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان گروهی از ژن‌ها که به ژن‌های "مقاومت" معروف هستند به‌طور معنی‌دار و در زمان نسبتاً کوتاهی القاء می‌شوند و سپس میزان بیان به سطح پایه یا اولیه برگشت می‌کند (Hammond-Kosack and Jones, 1997). پروفیل بیانی mRNA در مقیاس وسیع در واکنش گیاه آرابیدوپسیس به تنش شوری مطالعه و مشخص شد که یک سوم از مجموع ۱۰۷۸۲ cDNA مطالعه شده به‌طور معنی‌داری فعال شدند (Kawazaki et al, 2001). نتیجه مشابه در القاء ژن‌های سنتزکننده فایتوالکسین‌ها نیز مشاهده شده است (Wittstock and Gerschenzon, 2002). علاوه بر این، زمان بندی یا تایمینگ بیان این قبیل ژن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است به گونه‌ای که معمولاً در ارقام مقاوم به تنش در مقایسه با ارقام حساس بیان سریع‌تر است (Glazebrook, 2001). به عبارت دیگر، واکنش‌های حساسیت یا مقاومت به تنش فقط در وجود و یا فقدان ژن‌های مربوط در میزبان وابسته نیست بلکه زمان بیان ژن‌ها از اهمیت تعیین‌کننده برخوردار است. مطالعه اخیر نیز با هدف مطالعه پروفیل بیانی انجام و نشان داد که این ژن‌ها پس از ایجاد تنش در فاصله نسبتاً کوتاهی به‌طور معنی‌داری القاء و لذا قابلیت تاثیر در دفاع گیاه در برابر تنش‌ها و بخصوص شوری را دارند.

ژن‌های *MtPLD4* و *MtPLD9* در زیرگروه α و دسته C2-PLDs خانواده ژنی MtPLDs قرار می‌گیرند. اورتولوگ این ژن‌ها در آرابیدوپسیس *AtPLD α 1* و *AtPLD α 2* می‌باشد که در طی تنش شوری فسفولیپیدهای ساختاری در غشای پلاسمایی را هیدرولیز تا PA و یک گروه سر آزاد را تولید کنند. PA یک مولکول پیام رسان از مسیر پروتئین کینازهای فعال شده از طریق میتوزن (MPPK) موجب فعال‌سازی آنتی‌پورتر Na^+/H^+ (SOS1) می‌شود که نقش مهمی در خروج یون‌های سدیم از سلول دارد

(Yu et al. 2010). علاوه بر این، آزمایشی که بر روی گیاه آرابیدوپسیس و گوجه فرنگی انجام شد نشان داد که بیان ژن *AtPLD α* در طی تنش شوری افزایش پیدا می‌کند و خاموشی ژن *PLD α 1* در گیاه آرابیدوپسیس و گوجه فرنگی، حساسیت این گیاهان را به تنش شوری افزایش داد (Bargmann et al. 2008). ژن‌های *MtPLD13*، *MtPLD15* در زیرگروه γ/β و دسته ژن‌های C2-PLD خانواده ژنی *MtPLD* قرار می‌گیرند. بیان ژن *MtPLD15* در ساعات اولیه روند افزایشی داشت و سپس کاهش یافت، بیان ژن *MtPLD13* نیز در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۴، ۳۶، ۴۸ ساعت روند کاهشی داشت. مطالعه بیان ژن γ GmPLD سویا در شرایط تحت تنش شوری NaCl با غلظت ۲۳ ds/m نشان داد که بیان این ژن نیز روند کاهشی داشته و طی هشت ساعت تیمار شوری مقدار بیان این ژن به یک دهم مقدار اولیه آن در گیاه شاهد رسیده است (Zhao et al. 2012). زیر گروه γ/β معمولاً سطح بیانی پایینی دارند اما، پس از زخم‌زنی و آلودگی به عوامل بیماری به سرعت القاء می‌شوند (Li et al. 2009). همچنین بیشترین زمان القاء بیان این ژن‌ها در ساعات اولیه مشاهده می‌شود که می‌تواند با نقش این آنزیم‌ها در مسیر پیام‌رسانی جهت فعال-سازی مسیرهای پایان دست در طی تنش سازگاری داشته باشد (Yu et al. 2010). مطالعات کامل در خصوص نقش کارکردی ژن‌های زیرگروه γ/β خانواده ژنی *PLD* گیاهان در تنش شوری انجام نشده است و نیاز به آنالیزهای بیشتر دارد.

همچنین الگوی بیان ژن *MtPLD5* در زیر گروه ϕ نیز در این تحقیق بررسی شد. اما، الگوی بیان از این ژن در شرایط و زمان‌های ذکر شده در مورد چهار ژن دیگر مشاهده نشد. حتی با طراحی پرایمرهای مختلف الگوی بیان مشخصی از این ژن تحت تنش شوری NaCl با غلظت ۲۳ ds/m در این تحقیق مشاهده نشد. اگرچه که ممکن است این ژن در زمان‌ها و شدت تنش‌های دیگر دارای الگوی بیان مشخصی باشد، مورد دیگر ممکن است بیان این ژن بسیار پایین بوده که توسط آزمایشات این تحقیق قابل ردیابی نبوده، همچنین اطلاعاتی مبنی بر الگوی بیان اورتولوگ این ژن در گیاهان دیگر تحت تنش شوری در منابع مطالعه شده در این تحقیق در اختیار نبود.

آن به طور معنی داری کاهش یافت، دارای کمترین تعداد عناصر تنظیمی مربوط به تنش های محیطی نسبت به سه ژن دیگر بوده است.

نتیجه گیری نهایی

شواهد فراوانی از نقش ژن های PLD و PA حاصل از تولید آن ها در پاسخ به تنش های گیاهی از جمله خشکی، شوری، سرما، ABA، زخم، عوامل بیماریزا وجود دارد (Hong et al. 2010). کارکردهای مختلفی برای پروتئین های PLD در القاء پیام رسانی و هم در پاسخ مستقیم به تنش های گیاهی گزارش شده است. ژن های خانواده PLD دارای نقش های متمایزی هستند، اگرچه که بعضی از اعضا دارای عملکردهای همپوشان نیز هستند (Zhao et al. 2012). ایزوفرم های زیرگروه α و δ به فراوانی طی تنش های خشکی، شوری و سرما بیان می شوند، ایزوفرم های γ/β بیشتر طی تنش های زخم و عوامل بیماریزا بیان می شوند و در نهایت زیرگروه ζ سطح بیان پایینی داشته و در ساختار ریشه و هموستازی فسفات درگیر است (Li et al. 2009). نتایج این تحقیق نیز هم راستا با دیگر پژوهش های انجام شده بر روی ژن های خانواده PLD در گیاهان دیگر تأیید کننده نقش برجسته زیرگروه α ژن های PLD در تنش های شوری است.

آنالیز ناحیه پرموتور ژن های *MtPLD4*، *MtPLD9*، *MtPLD13* و *MtPLD15*

آنالیز توالی های عناصر تنظیمی (Cis-element) ناحیه پرموتور این چهار ژن نشان داد که تعداد عناصر مرتبط با تنش های زیستی و غیرزیستی ژن های *MtPLD4* و *MtPLD9* - که در زیرگروه α قرار دارند - نسبتاً بیشتر از دو ژن دیگر است. در این خصوص، انواع مرتبط با پاسخ به تنش خشکی (۴ عدد)، پاسخ به اسید سالیسیلیک (۱ عدد)، پاسخ به اسید جاسمونیک (۱ عدد) در ناحیه تنظیمی ژن *MtPLD4* قرار دارد. عناصر تنظیمی در ژن *MtPLD9* شامل پاسخ به خشکی (۱ عدد)، پاسخ به اسید سالیسیلیک (۱ عدد)، پاسخ به تنش و دفاع (۲ عدد) و پاسخ به متیل جاسمونات (۱ عدد) هستند. ژن *MtPLD13* حاوی عناصر تنظیمی مربوط به تنش و دفاع (۱ عدد) و پاسخ به سرما (۱ عدد) است و ژن *MtPLD15* دارای عناصر تنظیمی پاسخ به خشکی (۱ عدد)، پاسخ به اسید سالیسیلیک (۳ عدد) و پاسخ به متیل جاسمونات (۱ عدد) هستند. دو ژن اخیر در زیر گروه γ/β است (جدول ۳). اسید سالیسیلیک هورمونی است که عمدتاً درگیر در در تنش های زیستی است. بیشترین تعداد توالی عناصر تنظیمی درگیر در پاسخ به اسید سالیسیلیک (۳ عدد) در ناحیه پرموتوری ژن *MtPLD15* وجود دارد که منطبق بر مطالعات مبنی بر افزایش بیان ژن های β PLD در پاسخ به تنش های زیستی است (Li et al. 2009). ژن *MtPLD13* که در پاسخ به تنش NaCl بیان

جدول ۳- توالی های Cis-element موجود در ناحیه پرموتوری ژن های *MtPLD4*، *MtPLD9*، *MtPLD13* و *MtPLD15* بر طبق پایگاه داده PlantCARE

Table 3. Cis-elements present in the promoter region of *MtPLD4*, *MtPLD9*, *MtPLD13* and *MtPLD15* genes according to the PlantCARE database

Cis-element	MtPLD4	MtPLD9	MtPLD13	MtPLD15	Function
MBS	4	1	0	1	MYB binding site involved in drought-inducibility
TCA-element	1	1	0	3	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
TC-rich repeats	0	2	1	0	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
TGACG-motif	1	1	0	1	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
LTR	0	0	1	0	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness

منابع

- Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic acids research* 34(2):W369–W373.
- Bargmann BO, Laxalt AM, Ter Riet B, Van Schooten B, Merquiol E, Testerink C, Haring MA, Bartels D, Munnik T. 2009. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant and Cell Physiology* 50(1): 78-89.
- Bell CJ, Dixon RA, Farmer AD, Flores R, Inman J, Gonzales RA, Harrison MJ, Paiva NL, Scott AD, Weller JW, May GD. 2001. The Medicago genome initiative: a model legume database. *Nucleic Acids Research*. 29(1):114-117.
- Castroluna A, Ruiz OM, Quiroga AM, Pedranzani HE. 2014. Effects of salinity and drought stress on germination, biomass and growth in three varieties of *Medicago sativa* L. *Avances Invest. Agropec*. 18(1):39-50.
- Chen G, Snyder CL, Greer MS, Westlake RJ. 2011. Biology and Biochemistry of Plant Phospholipases. *Critical Reviews in Plant Sciences* 30(3):239–258.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research* 42(D1):D222–D230.
- Glazebrook J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301-308.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 1997. Plant Disease Resistance Genes, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:575–607.
- Hong Y, Zhang W, Wang X. 2010. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, Cell & Environment* 33(4):627–635.
- Hu B, Jin J, Guo AY, Zhang H, Luo J, Gao G. 2014. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31 (8): 1296-1297.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research* 30(1): 325-327.
- Li G, Lin F, Xue H. 2007. Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLD β 1 in seed germination. *Cell research* 17(10):881–894.
- Li M, Hong Y, Wang X. 2009. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791(9):927–935.
- Liu Q, Zhang C, Yang Y, Hu X. 2010. Genome-wide and molecular evolution analyses of the phospholipase D gene family in Poplar and Grape. *BMC plant biology* 10(1):117-132.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 25(4): 402-408.
- Qin C, Wang X. 2002. The *Arabidopsis* phospholipase D family characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains. *Plant physiology* 128(3):1057-1068.
- Qin W, Pappan K, Wang X. 1997. Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLD γ and regulation of plant PLD γ , β , and α by polyphosphoinositides and calcium. *Journal of Biological Chemistry* 272(45):28267–28273.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30(12):2725–2729.
- Tang K, Dong C, Liu J. 2016. Genome-wide analysis and expression profiling of the phospholipase D gene family in *Gossypium arboreum*. *Science China Life Sciences* 59(52):130-141.
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R. 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research* 45(3):250–278.
- Wang X, Xu L, Zheng L. 1994. Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *Journal of Biological Chemistry* 269(32):20312–20317.
- Wittstock U, Gerschenzon J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 300–307.

- Yu L, Nie J, Cao C, Jin Y, Yan M, Wang F, Liu J, Xiao Y, Liang Y, Zhang W. 2010. Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 188(3):762–773.
- Zhang C, Zhang H, Zhao Y, Jiang H, Zhu S, Cheng B, Xiang Y. 2013. Genome-wide analysis of the CCCH zinc finger gene family in *Medicago truncatula*. *Plant cell reports* 32(10):1543-1555.
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X. 2004. Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(25):9508–9513.
- Zhao J, Zhou D, Zhang Q, Zhang W. 2012. Genomic analysis of phospholipase D family and characterization of GmPLD α s in soybean (*Glycine max*). *Journal of plant research* 125(4):569-578.

In silico* identification of the *PLD* gene family and analysis of their expression pattern in response to salt stress in *Medicago truncatula

Somayeh Allahi¹, Mohammad Mehdi Sohani^{*2} and Hasan Hasani Kumleh³

1- MSc. in Plant Biotechnology, 2- Associate Professor and 3- Assistant Professor

Plant Biotechnology Department, Faculty of Agricultural Sciences. University of Guilan, Iran

*Corresponding Author: msohani@guilan.ac.ir

Abstract

Phospholipase D (PLD) and its product phosphatidic acid play important roles in cellular processes in plants including growth and development and stress responses. *PLD* genes constitute an important gene family in higher plants. The *PLD* family has been identified in *Arabidopsis*, rice, cotton and grape. In this study, 16 *PLD* genes were identified in the *Medicago truncatula* L. on the basis of protein domains, evolutionary relationship, gene architecture and sequence identity. They were grouped into six clads; α (4 genes), β (2 genes), γ (2 genes), δ (3 genes), ϵ (2 genes), ζ (2 gene) and ϕ (1 gene). The gene expression pattern of *MtPLD4*, *MtPLD9* in the α subgroup and *MtPLD13*, *MtPLD15* in the β/γ subgroup were investigated in four-week-old seedlings of *Medicago truncatula* under salt stress (23 ds/m NaCl) using qRT-PCR. *MtPLD4* gene expression compared to that in control plants was increased 48 hr post-treatment. *MtPLD13* gene expression decreased 48 hr post-treatment. Expression of the *MtPLD9* and *MtPLD15* genes increased in the early hours and then decreased compared to control plants. The results showed that the α subgroup *MtPLD* genes in particular are valuable candidates for further functional genomics analysis.

Key words: Phosphatidic acid, Salt stress, Phospholipase D, PLD, *Medicago Truncatula*, qRT-PCR