Crop Biotech.
Winter (2020) 10(2): 95-109. DOI: 10.30473/CB.2021.58873.1836

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دهم، شماره دوم، پیاپی سی‌ودوم، زمستان ۱۳۹۹ (۱۰۹-۹۵)

شناسایی و بررسی ارتباط عناصر تنظیمی ناحیه پروموتری خانواده ژنی *DLV* با بیان ژن در گیاه آلوروپوس لیتورالیس

مریم چاله‌کائی[۱]، علی دهستانی[۲*]، علیرضا عباسی[۳]، سید حمیدرضا هاشمی پطرودی[٤]

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. استادیار رشته اصلاح نباتات مولکولی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۳. دانشیار رشته بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳. استادیار اصلاح نباتات مولکولی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۰- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲٦)

Identification and evaluation of relation between regulatory elements of the promoter region of DLV gene family and gene expression in *Aeluropus littoralis*

Maryam Chalekaei[1], Ali Dehastani[2*], Alireza Abbasi[3], Seyed Hamidreza Hashemi Petrudi[4]
1. Ph.D. Candidate of Agricultural Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural College, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Assistant Professor of Molecular Plant Breeding, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural College, University of Tehran, Karaj, Iran.
4. Assistant professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
(Received: Dec. 31, 2020 -Accepted: Mar. 17, 2021)

چکیده

در این پژوهش نوع و فراوانی عناصر تنظیمی در نواحی پروموتری خانواده ژنی *DVL* در گیاه آلوروپوس لیتورالیس مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین بیان ژن *AlDVL8* به‌عنوان یکی از اعضای این خانواده تحت تیمار تنش شوری، هورمون‌های اسیدسالیسیلیک، اسیدجیبرلیک و سیتوکینین اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی پروموتری حاکی از آن بود که این خانواده ژنی عناصر تنظیمی متفاوتی برای پاسخ به انواع تنش‌ها و هورمون‌ها دارا می‌باشد. برخی از این عناصر تنظیمی در ناحیه پروموتری تمامی ژن‌ها موجودند که احتمالاً بیانگر نقش عمومی *DVL*ها است. همچنین، گروهی از عناصر تنظیمی تنها در ناحیه پروموتری بعضی از ژن‌ها موجودند که می‌توانند مرتبط با فعالیت اختصاصی آن‌ها باشند. تیمارهای اعمال شده به غیر از سیتوکینین سبب افزایش بیان ژن در اندام‌هوایی در زمان‌های ۳، ۱۲ و ۲٤ ساعت و کاهش بیان در زمان ٦ ساعت پس از اعمال تنش شد. تیمار سیتوکینین در همه زمان‌ها بیان ژن را در اندام هوایی افزایش داد. در بافت ریشه تقریباً روند معکوس بیان ژن دیده شد، به صورتی که در زمان ٦ ساعت افزایش بیان ژن و در زمان ۱۲ و ۲٤ ساعت کاهش بیان در تمامی تیمارها مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن *AlDVL8* در اندام هوایی و زمینی با تیمارهای آزمایشی القا شد و بیان آن در دو بافت به‌صورت معکوس بود. با توجه به تغییرات هورمون‌ها طی تنش و القای بیان این خانواده ژنی و وجود عناصر پاسخ‌دهنده به تنش در نواحی پروموتری این ژن‌ها، این خانواده ژنی می‌تواند به‌عنوان کاندیدی برای تحمل به تنش‌ها پیشنهاد گردد.

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای سیگنالی، تنش شوری، خانواده پروتئینی، عناصر تنظیمی، گیاه هالوفیت.

Abstract

In this study, the type and frequency of regulatory elements in the promoter regions of DVL gene family in *Aeluropus littoralis* were studied. Relative expression of *AlDVL8* gene as a member of this family was also measured under the salinity stress, salicylic acid, gibberellic acid and cytokinin. The results of the promoter study indicated that, this gene family has different regulatory elements for responding to stresses and hormones. Some of these regulatory elements are present in the promoter region of all genes, possibly indicating the general role of DVLs. Some others are present only in the promoter region of some genes that may be related to their specific activity. Treatments other than cytokinin increased gene expression in the shoot at 3, 12, and 24 hours and decreased expression at 6 hours. Cytokinin treatment at all times increased gene expression. In the root, almost the reverse trend of gene expression was observed, so that at 6 hours, increased gene expression was observed in all treatments, and at 12 and 24 hours, decreased expression was observed in all treatments. The results of this study showed that the expression of *AlDVL8* gene in shoot and root organs was induced by experimental treatments and its expression was inverse in these two different tissues. Due to the changes in hormones during stress, expression induction of this gene family, and the presence of stress-responsive elements in the promoter regions of these genes, this gene family can be suggested as a candidate for stress tolerance.

Keywords: Gene expression, Gene family, Halophyte plant, Regulatory elements, Salt stress.

* نویسنده مسئول: علی دهستانی
E-mail: a.dehestani@gmail.com

مقدمه

نواحی پروموتری ژن‌ها در بالادست نقطه شروع رونویسی قرار گرفته‌اند. اختصاصیت و قدرت یک پروموتر عمدتاً به واسطه موتیف‌های تنظیمی موجود در توالی آن مشخص می‌شود. این موتیف‌ها نواحی کوچکی از توالی DNA هستند که به صورت اختصاصی به فاکتورهای رونویسی متصل می‌شوند و به‌عنوان توالی‌های اصلی و ضروری پروموترها محسوب می‌شوند (Hudson and Quail, 2003). برخی از پروموترها بیانی دائمی و همیشگی دارند و گروهی دیگر به عوامل محیطی یا درونی پاسخ می‌دهند (Dabrowska *et al.*, 2012). شناسایی موتیف‌ها و ساختار آن‌ها به منظور درک بیش‌تری از نحوه بیان و تنظیم ژن‌ها ضروری به‌نظر می‌آید (Mongkolsiriwatana *et al.*, 2009) و به نظر می‌رسد که ژن‌های دارای عملکرد مشابه، دارای نواحی تنظیمی مشابه نیز می‌باشند (Xie *et al.*, 2020).

عناصر تنظیمی در نواحی پروموتری را می‌توان با توجه به عناصر از قبل شناسایی شده موجود در پایگاه داده‌ها از جمله PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002) و PLACE (Higo *et al.*, 1999) شناسایی کرد. علاوه بر این، عناصر تنظیمی جدید را نیز می‌توان بدون اطلاع قبلی از نواحی متصل‌شونده به فاکتورهای رونویسی و با استفاده از تکرار آن نواحی در پروموترهای ژن‌های هم بیان شناسایی کرد (Van Helden, 2003). بنابراین، تجزیه و تحلیل پروموترها با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک، هنگامی که با تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها ترکیب شود، کاربردی‌تر است. در گیاهان، فاکتورهای رونویسی نقش مهمی در فیزیولوژی سلول، فرآیندهای نموی و پاسخ به محرک‌های محیطی و تنش‌ها ایفا می‌کنند (Chow *et al.*, 2016). راهبردی که گیاهان در سازگاری به شرایط تنش به‌کار می‌گیرند شامل بیان ژن‌ها از طریق فاکتورهای رونویسی است. پس از اتصال فاکتورهای رونویسی به نواحی پروموتری ژن‌ها، بیان ژن‌های موجود در مسیرهای سیگنالی و پاسخ به تنش‌ها تنظیم می‌شوند (Zhou *et al.*, 2010). همچنین گیاهان به‌عنوان موجودات غیرمتحرک، دارای مکانیسم‌هایی جهت دریافت و پاسخ‌گویی به محیط متغیر اطراف خود هستند. پپتیدهای سیگنالی به‌عنوان سیگنال‌های خارجی فعالیت می‌کنند که به‌واسطه گیرنده‌ها دریافت می‌شوند و در ادامه موجب القای پاسخ به تنش می‌شوند. پپتیدهای سیگنالی کوچک از طریق انتقال اطلاعات دریافتی به واسطه انتشار سلول به سلول سبب واکنش گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شوند. یکی از پپتیدهای سیگنالی کوچک که در گیاهان شناسایی شده‌اند خانواده پروتئینیDVLها هستند (Sudan *et al.*, 2018).

جست‌وجو به منظور شناسایی توالی‌های این خانواده ژنی در آرابیدوپسیس تا به امروز، منجر به شناسایی حداقل ۲۰ عضو از خانواده ژنی *DVL* شده‌است (Valdivia *et al.*, 2013). در تحقیقی پروتئوم گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس با برخی از گیاهان تیره گندمیان در گستره ژنومی مقایسه شد و نتایج آن منجر به شناسایی گروه‌های ژنی اورتولوگی گردید که در همه گونه‌های مورد بررسی مشترک بودند. همچنین ۷۰ گروه ژنی پارالوگ به گیاه آلوروپوس اختصاص پیدا کرد و بزرگ‌ترین گروه این مجموعه خانواده ژنی *DVL*ها با اندازه ۳۹ -۷۲ اسیدآمینه بود (Hashemi *et al.*, 2019). هالوفیت‌ها به دلیل تحمل بالای آن‌ها به شوری، منابع ژنتیکی ارزشمندی برای دستکاری مولکولی گلیکوفیت‌ها هستند و برای افزایش تحمل به تنش شوری مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین درک مکانیسم‌های تحمل به شوری در هالوفیت‌ها و تفاوت آن‌ها با گلیکوفیت‌ها بسیار مهم است (Zouari *et al.*, 2007). دانش موجود در مورد عملکرد زیستی پپتیدهای DVL ناقص است، زیرا در برخی از لاین‌های خاموش شده و موتانت این ژن‌ها

فنوتیپ‌های قابل‌تشخیصی از نظر اختلالات زیستی، مشاهده نشده‌است. به دلیل اندازه کوچک ژن‌های *DVL* فراوانی جهش در آن‌ها خیلی زیاد نمی‌باشد. این نتایج می‌تواند حاکی از افزونگی[1] ژن‌ها و یا فعالیت اختصاصی در شرایط بسیار خاصی باشد (Wen *et al*., 2004Narita *et al*., 2004;). تنها شواهد موجود در مورد فعالیت‌های زیستی این خانواده ژنی از تغییرات مشاهده شده در لاین‌های تشدید بیان شده می‌باشد که بیانگر نقش مهم آن‌ها در نمو گیاهان است. تعیین نقش اصلی این خانواده ژنی مشکل است و با توجه به اینکه توالی محافظت شده ۳۲ آمینواسیدی در آن‌ها برای ظهور تغییرات در لاین‌های تشدید بیان‌شده کافی می‌باشد، محتمل‌ترین نقشی که می‌توان برای آن‌ها در نظر گرفت، نقش‌های سیگنالی است (Valdivia *et al*., 2013).

از آنجا که نقش سیگنالی احتمالی برای خانواده ژنی *DVL* متصور می‌باشد و اطلاعات بسیار محدودی در این زمینه موجود است، در تحقیق حاضر تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ناحیه پروموتری این خانواده ژنی در گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس به منظور شناسایی عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به هورمون‌ها و عوامل محیطی مؤثر در بیان این خانواده ژنی مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین پس از شناسایی این عناصر تنظیمی، برخی از هورمون‌ها و تنش‌های القاکننده بیان، به‌عنوان تیمار در نظر گرفته شدند و القای بیان یکی از اعضای خانواده ژنی DVL تحت تیمارهای منتخب مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت ارتباط حضور این عناصر تنظیمی، تیمارهای هورمونی و تنش با تغییرات بیان ژن مطالعه شد.

1. Redundancy

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پایه‌های گیاهی مورد نیاز گیاه *Aeluropus littoralis* از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان تهیه شدند. گیاهان به صورت غیرجنسی و از طریق قلمه‌های ساقه تکثیر یافتند. قلمه‌های ریشه‌دار شده در محلول غذایی هوگلند و به صورت هیدروپونیک نگهداری شدند و پس از رشد گیاهان به مدت یک ماه در محلول هوگلند، تیمارها اعمال شدند. اعمال تیمار شوری (NaCl) با غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار به صورت تدریجی (پاساژدهی) انجام و به محلول هوگلند اضافه شد. هورمون‌های ۶-بنزیل آمینوپورین (BAP) (100 µM) به‌عنوان یک نوع سیتوکینین، اسید سالیسیلیک (SA) (750 µM)، اسید جیبرلیک (GA3) (100 µM) روی اندام هوایی گیاهان محلول پاشی شدند. نمونه‌برداری در زمان‌های ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمارها انجام گرفت. نمونه‌ها در نیتروژن مایع فریز شدند و تا انجام آزمایشات مورد نظر در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تجزیه وتحلیل پروموتر ژن‌های *DVL*

ژن‌های *DVL* شناسایی‌شده در گیاه آلوروپوس لیتورالیس ۱۶ مورد می‌باشند. این خانواده ژنی از داده‌های توالی‌یابی ژنوم گیاه آلوروپوس لیتورالیس که در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان موجود است، شناسایی شده‌اند. ۱۰۰۰ جفت باز نواحی بالادست از نقطه آغاز رونویسی هر ژن برای شناسایی عناصر تنظیمی پروموتری مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که با توجه به قرائت‌های بدست آمده از توالی‌یابی، طول ناحیه بالادست هر کدام از ژن‌ها متفاوت بود و از نواحی پروموتری بالای ۵۰۰ جفت باز استفاده شد و ژن‌های با ناحیه پروموتری کوتاه‌تر در نظر گرفته نشدند. بدین صورت دو ژن حذف شدند. برای

شناسایی نوع و تعداد عناصر تنظیمی توالی‌های پروموتری، از بانک اطلاعاتی PLACE (https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE) استفاده گردید. از میان عناصر تنظیمی موجود در نواحی پروموتری، عناصر پاسخ‌دهنده به تنش‌ها و هورمون‌ها مدنظر بودند و تنها این عناصر بررسی شدند.

بررسی الگوی بیان ژن

استخراج RNA و سنتز cDNA

اندام هوایی و ریشه گیاه به صورت جداگانه با استفاده از دستگاه لیزکننده بافت (تیشولایزر) و نیتروژن مایع پودر شدند. استخراج RNA کل از بافت گیاهی با استفاده از کیت تریزول (Threezol, Riragene) و طبق دستوالعمل شرکت سازنده، انجام گرفت. پس از استخراج RNA، کیفیت نمونه‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد تأیید شد. کمیت نمونه‌ها نیز با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری مشخص شد. به منظور حذف DNA ژنومی از نمونه‌های استخراجی، از تیمار DNase I شرکت Thermo Scientific استفاده شد که طبق دستوالعمل شرکت انجام گرفت. سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت Thermo Scientific مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس cDNA ساخته شده با نسبت پنج برابر رقیق شد.

آنالیز بیان ژن با استفاده از روش RT-qPCR

طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار AlleleID انجام گرفت (جدول ۱). اندازه‌گیری سطوح بیان ژن هدف با استفاده از دستگاه ABI و با استفاده از کیت RealQ Plus Master Mix Green شرکت امپلیکون دانمارک انجام شد. چرخه دمایی مورد استفاده در این روش بدین صورت بود؛ ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه برای ۳۵ چرخه. آنالیز منحنی ذوب نمونه‌ها و چرخه آستانه با نرم‌افزار StepOne plus محاسبه شد. در این پژوهش بیان یکی از ژن‌های خانواده *DVL* به‌عنوان نماینده‌ای از اعضای این خانواده مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که در آنالیز پروموتری این خانواده، ژن *DVL8* دارای بیش‌ترین عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش‌ها و هورمون‌ها (۱۱۰ مورد) است، بررسی بیان این ژن تحت تیمار شوری و برخی هورمون‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. ژن‌های مرجع *RPS3, EF1a* با توجه به مطالعه‌ای که بر روی ژن‌های مرجع کاندید در گیاه آلوروپوس لیتورالیس انجام گرفته بود (Hashemi *et al.*, 2016)، انتخاب شدند. توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده، در جدول ۱ آورده شده‌است. برای نرمال‌سازی بیان ژن‌ها، میانگین هندسی ژن‌های مرجع به‌کار گرفته شد. از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای آنالیز کمی داده‌های مربوط به میزان بیان نسبی استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001). مقایسه تیمارها با شاهد با استفاده از از آزمون T انجام گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	کد دسترسی	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیری (bp)
RPS3	JZ191044	ATTCACTGGCTGACCGGATG GTGCCAAGGGTTGTGAGGTC	107
EF1a	EE594715	TGCTGTCGGTGTCATCAA CTTCCATCAAACGCCTCATT	97
ALDVL8	Alg9140	TACATGGACGACAAGAGCAA CTCCAGCACACCAGCAT	200

نتایج و بحث

ناحیه پروموتری هر ژن دارای ترکیب منحصربه فردی از عناصر تنظیمی می‌باشد که بیان آن ژن را از نظر زمانی، مکانی و در پاسخ به عوامل خارجی مختلف تنظیم می‌کند. بنابراین شناسایی این عناصر تنظیمی و نحوه ارتباط آن با تنظیم بیان ژن می‌تواند به تعیین نقش ژن‌ها کمک کند (Ibraheem *et al.*, 2010). بر اساس نتایج حاصل از آنالیز پروموتر، توالی پروموتری خانواده ژنی *DLV* دارای موتیف‌های متعددی هستند. در این میان، عناصر پاسخ‌دهنده به هورمون‌ها (۳۹ مورد) و تنش‌ها (۲۳ مورد) حضور دارند (شکل‌های ۱ و ۲). موتیف‌های تنظیمی پاسخ‌دهنده به هورمون‌های گیاهی اسید آبسیزیک (ABA) (۱۶ مورد)، اسید جیبرلیک (GA) (۱۱ مورد)، اکسین (Aux) (۶ مورد)، سیتوکینین (CK) (۲ مورد)، اسید سالیسیلیک (SA) (۲ مورد) و اسید جاسمونیک (JA) (۲ مورد) در این نواحی پروموتری شناسایی شدند (شکل ۱). هر یک از پروموترهای ژن‌های *DVL* حداقل یک عنصر تنظیمی مرتبط با پاسخ به تنش‌ها و یا هورمون‌ها را داراست بنابراین این ژن‌ها در پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی و پاسخ‌های هورمونی می‌توانند نقش ایفا کنند.

اسید آبسیزیک (ABA)

یکی از موتیف‌هایی که با تعداد بالا در تمامی نواحی پروموتری خانواده ژنی *DVL* شناسایی شده‌است جایگاه شناسایی MYCها با نام MYCCONSENSUSAT می‌باشد. تعداد این توالی در هر ناحیه پروموتری ۴-۱۴ مورد بود که در مقایسه با سایر موتیف‌های تنظیمی موجود، بیش‌ترین تکرار را دارا بود. همچنین ناحیه شناسایی MYCها که در زیرگروه همین موتیف تنظیمی قرار می‌گیرد، نیز با عنوان MYCATERD در ۹ مورد از پروموترهای مورد بررسی موجود بود. این توالی‌ها به ترتیب در پروموتر ژن*erd1* و *rd22* که پاسخ‌دهنده به کم‌آبی می‌باشند، شناسایی شدند (Simpson *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 1997). توالی‌های شناسایی MYC در پاسخ به هورمون ABA و تنش خشکی موجب القای بیان ژن می‌گردد (Busk and Pagès, 1998). یکی دیگر از توالی‌ها که با تعداد ۲-۱ مورد در اکثر توالی‌های پروموتری وجود داشت جایگاه شناسایی MYB است. این توالی نیز در ناحیه پروموتری ژن *rd22* به‌عنوان یک ژن پاسخگو به کم آبی حضور دارد. ژن (*bHLH*) *AtMYC2* و (*MYB*) *AtMYB2* در گیاه آرابیدوپسیس به‌عنوان فعال کننده رونویسی در مسیر سیگنالینگ ABA نقش دارند و همچنین بیان تعدادی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری و خشکی را تنظیم می‌کنند (Abe *et al.*, 2003). MYB2 به‌عنوان عامل رونویسی هورمون‌های اسید آبسیزیک در شرایط تنش عمل می‌کند (Du *et al.*, 2009). ناحیه مرکزی اتصال DBFها با توالی از دیگر توالی‌های پاسخ‌دهنده به ABA بودند که در اکثر پروموترهای مورد بررسی با تعداد ۲-۷ مورد مشاهده شدند. DBFها در واقع نوعی از فاکتورهای رونویسی bZIP محسوب می‌شوند، که عناصر پاسخگو به ABA هستند (Kim *et al.*, 1997). *ABI5* یک ژن پاسخ‌دهنده به ABA در آرابیدوپسیس می‌باشد که یک فاکتور رونویسی bZIP را کد می‌کند (Finkelstein and Lynch, 2000). از دیگر عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به ABA که در پروموتر *DVLها* مشاهده شد، ABREها بودند. این عناصر تنظیمی در پنج مورد از پروموترها حضور داشتند. ABREها جایگاه اتصال فاکتور رونویسی ABFها می‌باشند. در پژوهشی فعالیت القایی پروموتر *Rd29A* پس از همسانه‌سازی از گیاه آرابیدوپسیس در گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن بود که ABA، تنش

شوری و خشکی باعث القای پروموتر *Rd29A* گردید (Rahnama and Haghighat, 2014).

جیبرلین (GA)

عنصر تنظیمی WRKY71OS به‌عنوان توالی مرکزی W-box محسوب می‌شود که در تمامی پروموترهای ژن‌ها با تعداد ۱-۹ عدد موجود بود. این ناحیه پروموتری در ژن *WRKY71* برنج شناسایی شده و به‌عنوان یک بازدارنده رونویسی مسیر سیگنالی اسید جیبرلیک است (Zhang *et al.*, 2004). عنصر تنظیمی pyrimidine box پاسخ‌دهنده به جیبرلین است که در ۹ عدد از پروموترها با تعداد ۱-۲ عدد مشاهده شد. این ناحیه جایگاه اتصال فاکتور رونویسی BPBF است. پروتئین‌های BPBF در تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به جیبرلین در جو شناسایی شده‌اند (Mena *et al.*, 2002). علاوه بر این عناصر تنظیمی پاسخگو به جیبرلین با عنوان GARE و CARE نیز در برخی از پروموترهای مورد بررسی حضور داشتند که این عناصر تنظیمی در ناحیه پروموتری ژن *REP-1* برنج در پاسخ به جیبرلین شناسایی شده‌اند (Sutoh and Yamauchi, 2003).

سیتوکینین (CK)

عنصر متصل‌شونده به ARR1 یکی از موتیف‌های تنظیمی است که در تمامی ۱۴ ژن *DVL* مورد بررسی مجموعاً با تعداد ۹۹ مورد مشاهده شده‌است. این عنصر تنظیمی به‌عنوان یک عنصر پاسخ‌دهنده به سیتوکینین و فعال کننده رونویسی محسوب می‌شود (Ross *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2000).

| Elements / Gene | Hormone responsivness | | |

اکسین (Aux)

در تمامی توالی‌های پروموتری به جز یک مورد حداقل یک عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به اکسین موجود بود. عنصر تنظیمی SURE پاسخ‌دهنده به گوگرد می‌باشد که دارای توالی اتصال شونده به عنصر پاسخ‌دهنده به اکسین (ARF) می‌باشد و در ۱۲ مورد از پروموترهای مورد مطالعه با تعداد ۱–۵ عدد موجود بود. از دیگر موتیف‌های تنظیمی مربوط به اکسین که با تکرار بالا در پروموترها مشاهده شد، جایگاه اتصال به ASF-1 بود که در هشت مورد از پروموترها موجود بود. جایگاه اتصال به ARF، جایگاه اتصال به *NtBBF1* و توالی موجود در SAUR از دیگر عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به اکسین در پروموترها هستند که در ناحیه پروموتری ۷ مورد از ژن‌ها وجود داشتند. جایگاه اتصال به ASF-1 در بسیاری از پروموترها موجود است و سبب القای رونویسی ژن‌ها به واسطه اکسین می‌شود (Redman *et al.*, 2002).

اسید سالیسیلیک (SA)

عنصر تنظیمی W-box به تعداد ۱–۴ عدد در ۱۲ مورد از پروموترها مشاهده شد. این موتیف تنظیمی در پروموتر ژن آرابیدوسیس شناسایی شد و طبق تحقیقات انجام شده این توالی به واسطه پروتئین‌های WRKY القا شده با SA شناسایی می‌شوند (Yu *et al.*, 2001).

اسید جاسمونیک (JA)

چند مورد محدود از عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به JA با عناوین T/G-box و توالی مرکزی GCC-box در نواحی پروموتری ژن‌ها مشاهده شدند. T/G-box در ناحیه پروموتری ژن‌های *pin2* و *LAP* گوجه‌فرنگی شناسایی شده است. این نواحی در القای ژن‌ها به واسطه JA نقش دارد (Boter *et al.*, 2004). توالی مرکزی GCC-box نیز در پاسخ به JA و اتیلن مشارکت می‌کند (Brown *et al.*, 2003). عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به شرایط محیطی که در ناحیه پروموتری ژن‌های *DVL* مشاهده شد، شامل عناصر پاسخگو به خشکی (۸ مورد)، سرما (۴ مورد)، اتیوله شدن (۲ مورد)، شوری (یک مورد) و تنفس بی‌هوازی (۳ مورد) بودند (شکل ۲).

خشکی

عنصر تنظیمی MYBCORE از خانواده MYBها در ۱۲ مورد از نواحی پروموتری مورد بررسی، مشاهده شد. این موتیف متصل‌شونده به MYB در ناحیه پروموتری ژن‌های *ATMYB1* و *ATMYB2* مشاهده شده‌است. علاوه بر این جایگاه شناسایی دیگری از MYBها که به *ATMYB2* متصل می‌شود، در سه مورد از پروموترها مشاهده شد. *ATMYB2* در تنظیم ژن‌های دخیل در تنش خشکی نقش دارد (Urao *et al.*, 1993). توالی ACGT نیز در ۸ مورد از پروموترهای مورد بررسی با تعداد ۲–۱۰ عدد مشاهده شد. این توالی در پروموتر ژن *erd1* شناسایی شده‌است و در القای بیان ژن تحت تنش خشکی نقش دارد (Simpson *et al.*, 2003). همچنین موتیف‌های متصل‌شونده به فاکتورهای رونویسی القا شونده تحت شرایط تنش خشکی نیز در برخی از پروموترهای مشاهده شد. این موتیف‌ها عبارت بودند از موتیف مرکزی عنصر تنظیمی DRE/CRT[1] و ناحیه اتصال CBF[2]. CBFها همچنین با عنوان پروتئین‌های متصل‌شونده به عناصر پاسخگو به کم‌آبی شناخته می‌شوند (DREBs)[3] (Xue, 2002). DREBها به این دو ناحیه پروموتری متصل می‌شوند (Dubouzet *et al.*, 2003).

1. Dehydration-responsive element/C-repeat
2. C-repeat (CRT) binding factor
3. Dehydration-responsive element-binding proteins

Elements / Gene	Stress responsivness																					
	drought								cold				etiolation		salt	anaerobic						
	Binding site for MYC 174	Binding site for all animal MYB 176	Binding site for ATMYB2 177	MYC recognition sequence 413	BRE-like sequence 414	ACGT sequence 415	Core motif of DRE/CRT 418	CBF Binding site of barley (H.v.) CBF1 497	Core of LTRE 153	LTRE-1 250	MYC recognition site 407	Core CRT/DRE motif 411	BRE-like sequence 414	CGT sequence 415	GT-1 motif 453	1 of motifs found innaerobic gene 477	1 of motifs found innaerobic gene 478	1 of motifs found innaerobic gene 479	Sum
AIDVL1 (Alg65)- 512 bp		1			5	6					8		5	6	1				32
AIDVL3 (Alg2586)- 1000 bp		2	1								4				2		3		12
AIDVL4 (Alg2587)- 1000 bp	1	6		1		2	1	1	1		10			2	1	1		1	28
AIDVL5 (Alg4777)- 1000 bp	1	2		1		4			2	1	4			4	1				20
AIDVL6 (Alg5644)- 1000 bp	1	2		1		5	1	2		1	8			4	2		2		29
AIDVL7 (Alg8921)- 842 bp		2			3	10		3		1	8		3	10	2	1			43
AIDVL8 (Alg9140)- 1000 bp	2	4	1	2	1	2				1	12	1	1	2	1		2		32
AIDVL9 (Alg9889)- 1000 bp	1	2		1		2			1		14			2	1				24
AIDVL10 (Alg9890)- 1000 bp	1	4	1	1				2	3		6	2			1		2		23
AIDVL12 (Al12043)- 1000 bp	1	1		1							14					1			18
AIDVL13 (Alg14266)- 1000 bp		2			4	8	1	2	1		6		4	8			1	1	38
AIDVL14 (Alg15232)- 505 bp										1	4				2				7
AIDVL15 (Alg15707)- 813 bp											8				3		2		13
AIDVL16 (Alg15801)- 753 bp	1	3		1		4		1			8			4			1		23
Sum	9	31	3	9	13	43	3	11	8	5	114	3	13	42	17	3	13	2	342

شکل ۲. آنالیز ناحیه پروموتری خانواده ژنی *DVL*. نوع و فراوانی عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش‌ها در شکل آورده شده‌است. اعداد موجود در مقابل هر عنصر تنظیمی، اعداد موجود در پایگاه PLACE می‌باشد که به صورت اختصاصی، به منظور شناسایی هر عنصر تنظیمی داده شده‌است.

شوری

موتیف GT-1 در ۱۱ پروموتر با تعداد ۱-۳ مورد مشاهده شد. این توالی برای اولین بار در ناحیه پروموتری ژن *SCaM-4* سویا شناسایی شد و مطالعات بر روی این توالی حاکی از آن بود که در بیان ژن *SCaM-4* تحت اثر شوری دخالت دارد (Park *et al.*, 2004).

سرما

عنصر تنظیمی LTRE-1 که یک عنصر پاسخ‌دهنده به دمای پایین می‌باشد، در پنج مورد از نواحی پروموتری با تعداد یک مورد مشاهده شده‌است. عنصر تنظیمی LTRE-1 برای اولین بار در ناحیه پروموتری ژن *blt4.9* جو شناسایی شد. ژن *blt4.9* پاسخ‌دهنده به سرما است و این ناحیه پروموتری در القای بیان آن در شرایط سرما نقش دارد (Dunn *et al.*, 1998). همچنین ناحیه مرکزی عنصر تنظیمی LTRE با موتیف CCGAC نیز در ۵ پروموتر مورد بررسی، با تعداد ۱-۳ عدد مشاهده شد. این موتیف برای اولین بار در ژن *cor15a* شناسایی شد و در بیان ژن *BN115* در کلزا در شرایط سرما نیز نقش داشت (Baker *et al.*, 1994).

اتیوله‌شدن

توالی BRE-like و ACGT نیز از عناصر تنظیمی هستند که در پاسخ ژن به اتیوله شدن نقش دارند و به ترتیب در ۹ و ۵ مورد از نواحی پروموتری *DVL*ها حضور داشتند. این توالی‌های تنظیمی در تاریکی و تحت شرایط تنش خشکی موجب القای بیان ژن می‌شوند (Simpson *et al.*, 2003).

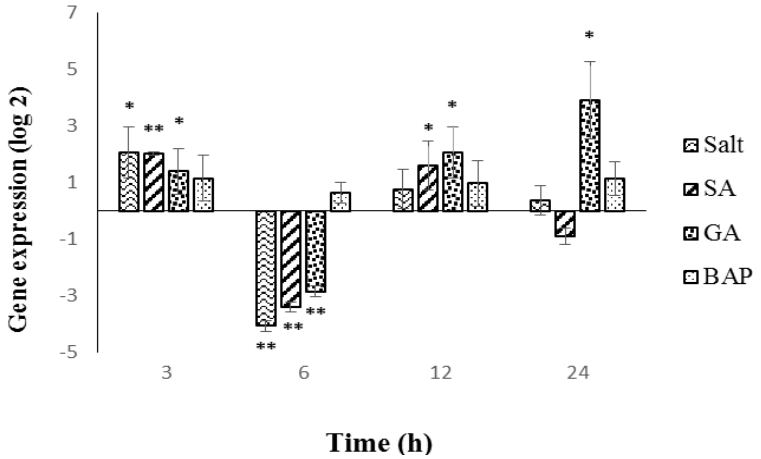
تنفس بی‌هوازی

سه مورد از موتیف‌های مرتبط با بیان بی‌هوازی ژن‌ها در ۳، ۷ و ۲ ناحیه پروموتری ژن‌های *DVL* مشاهده شدند. در مطالعه‌ای ۱۶ موتیف تنظیمی محافظت شده در ناحیه پروموتری ۱۳ ژن دخیل در مسیر تخمیری گیاهان متفاوت شناسایی شده است (Mohanty *et al.*, 2005) که سه مورد از این موتیف‌های تنظیمی در ناحیه پروموتری *DVL*ها مشاهده شدند.

گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی، راهبردهای متنوعی از قبیل تنظیمات هورمونی، تغییرات ردوکس و تنظیمات اپی‌ژنتیکی ژن‌های مرتبط با تنش را به کار می‌گیرند (Ryu and Cho, 2015). از میان هورمون‌های گیاهی اسید آبسیزیک، اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک و اتیلن نقش مهمی در پاسخ دفاعی گیاهان به عوامل و تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کنند. همچنین شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد که فعالیت اسید آبسیزیک، اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک و اتیلن با فعالیت اکسین‌ها، اسیدجیبرلیک‌ها و سیتوکینین‌ها در پاسخ گیاهان به تنش تداخل دارد (Bari and Jones, 2009). معمولاً اسید آبسیزیک مسئول دفاع گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی است، زیرا شرایط محیطی مانند خشکی، شوری، سرما و گرما موجب افزایش سطح آن می‌شود (Zhang *et al.*, 2006). حضور این تعداد از عناصر پاسخگو به هورمون‌ها در ناحیه پروموتری ژن‌های *DVL* گیاه آلوروپوس حاکی از آن است که بیان این خانواده ژنی می‌تواند به تغییرات هورمون‌ها طی تنش‌های محیطی پاسخ دهد و در نتیجه تنش‌های محیطی می‌تواند موجب تنظیم بیان آن‌ها گردد.

بیان ژن *AlDVL8*

سطوح بیان ژن *AlDVL8* دراندام هوایی گیاه تحت تأثیر تیمارهای متفاوت قرار گرفت (شکل۳). در ۳ ساعت اولیه تنش تمامی تیمارها نسبت به شاهد افزایش بیان نشان دادند که این افزایش بیان برای تنش‌های شوری، اسید سالیسیلیک و اسید جیبرلیک معنی‌دار بود. تنش شوری و SA موجب دو برابر شدن بیان ژن مورد نظر شد و بیان ژن تحت تیمار BAP و GA به ترتیب ۱/۶ و ۱/۱ برابر افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت، روند تغییرات بیان ژن کاهشی بود. در واقع تیمارهای شوری، SA و GA به ترتیب موجب کاهش بیان ۴، ۳/۴ و ۲/۸ برابری نسبت به شاهد شدند که تمامی این کاهش بیان‌ها نسبت به شاهد معنی‌دار بودند.

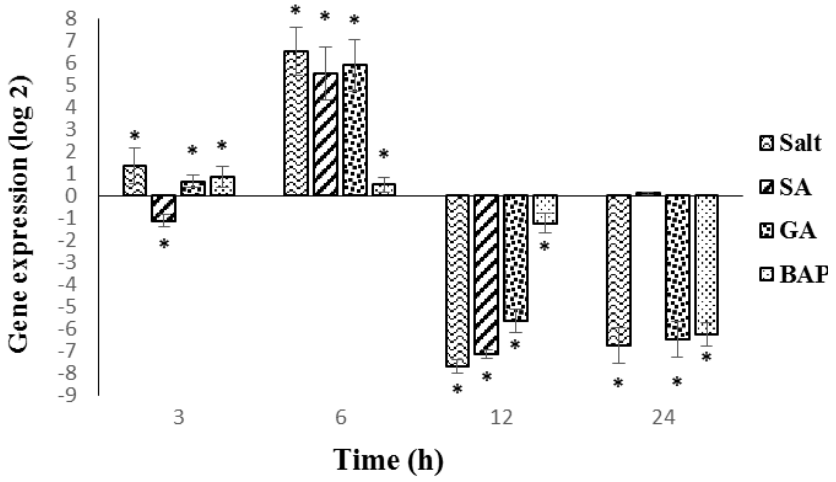


شکل ۳. سطح بیان ژن *AlDVL8* در اندام هوایی. تیمارهای آزمایشی شامل تنش شوری (۶۰۰ میلی‌مولار)، هورمون‌های SA (۷۵۰ میکرومولار)، GA (۱۰۰ میکرومولار) و BAP (۱۰۰ میکرومولار) بودند. نمونه برداری‌ها در ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی انجام گرفتند. (** و * به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد را نشان می‌دهد.)

تیمار BAP تنها موجب افزایش اندکی (۰/۶۶ برابری) در بیان ژن شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود. در ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش مجدداً افزایش بیان ژن مشاهده شد که برای تیمار اسید سالیسیلیک (افزایش ۱/۶ برابر) و اسید جیبرلیک (افزایش ۸/۲ برابر) معنی‌دار بود در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش نیز افزایش ۰/۴ برابری بیان تحت شرایط شوری مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین کاهش غیر معنی‌دار اسید سالیسیلیک نیز مشاهده شد. در این زمان تیمار GA سبب شد که بیان ژن به میزان ۴ برابر نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یابد و تیمار BAP نیز سبب افزایش بیان یک برابری شد.

علاوه بر اندام هوایی سطوح بیان ژن *AlDVL8* در ریشه گیاهان نیز تحت تیمارها بررسی شد و نتایج حاکی از تغییرات سطح بیان تحت تیمارهای آزمایشی بود (شکل ۴). در زمان اولیه نمونه برداری (۳ ساعت) تیمار شوری و SA و GA به ترتیب موجب افزایش بیان معنادار ۱، ۰/۸ و ۰/۷ برابری نسبت به شاهد شدند. در این زمان تنها تیمار SA موجب کاهش بیان یک برابری ژن *AlDVL8* نسبت به شاهد شد. به طور جالب‌توجهی در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تیمار، شوری، SA و GA بیان ژن را به طور معناداری به میزان ۵/۵ تا ۶/۵ برابر افزایش دادند. در زمان ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمارها نیز بیان ژن به طور قابل‌توجه و معنی‌داری کاهش یافت. بیش‌ترین میزان کاهش در تیمار تنش شوری با ۷/۶ برابر و کم‌ترین میزان کاهش در BAP با ۱/۲ برابر بود. در ۲۴ ساعت نیز بیان ژن کاهشی بود. در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش، تیمارهای شوری، GA و BAP موجب کاهش معنی‌دار بیان به میزان ۶ برابر نسبت به شاهد شدند. تیمار هورمون SA در زمان ۲۴ ساعت، تغییر محسوسی در بیان ژن ایجاد نکرد.

به صورت کلی الگوی بیانی این ژن تحت تیمارهای آزمایشی در ریشه و اندام هوایی کاملاً متفاوت بود و تیمارها در زمان‌های متفاوت بر بیان ژن تأثیرگذار بودند. در مطالعه ای که بر روی چهار عضو از خانواده ژنی *DVL* آلوروپوس انجام شد، بیان در دو مورد از این ژن‌ها به شدت تحت تأثیر شوری قرار گرفت و بیان ژن‌های مطالعه شده در این آزمایش در بافت برگ بیش‌تر از بافت ریشه گزارش شد. علاوه بر این ژن‌ها در زمان‌های مختلف بیان متفاوتی از خود نشان دادند، در بافت‌های مختلف الگوی بیانی خاص خود را ارائه کردند (Hashemi and Ghorbani, 2021).



شکل ۴. سطح بیان ژن *AlDVL8* در ریشه. تیمارهای آزمایشی شامل تنش شوری (۶۰۰ میلی‌مولار)، هورمون‌های SA (۷۵۰ میکرومولار)، GA (۱۰۰ میکرومولار) و BAP (۱۰۰ میکرومولار) بودند. نمونه برداری‌ها در ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی انجام گرفتند. (** و * به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد را نشان می‌دهد.)

بیان ژن *AlDVL8* نیز مطابق با تحقیقات هاشمی و همکاران (Hashemi *et al.*, 2021) تحت تنش شوری در برخی از زمان‌ها القا شد. در تحقیق ما نیز الگوی بیانی متفاوتی تحت تیمارها و زمان‌های متفاوت مشاهده شد. به طور جالبی بیان ژن در ریشه واندام هوایی تقریباً عکس یکدیگر بود، بدین صورت که در زمان ۶ ساعت که بیان ژن دراندام هوایی کاهش یافت، بیان در بافت ریشه افزایش یافت. همچنین در زمان ۱۲ ساعت نیز که سطح بیان ژن در ریشه کاهش داشت در اندام هوایی گیاه افزایش بیان ژن مشاهده شد. در زمان ۲۴ ساعت نیز همین الگوی بیانی معکوس در دو بافت وجود داشت. همچنین الگوی بیان ژن معکوس در بافت برگ و ریشه برای ژن‌های *AlDVL3* و *AlDVL6* تحت تنش شوری در پژوهش هاشمی و همکاران مشاهده شده است که منطبق با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد (Hashemi *et al.*, 2021). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ژن *AlDVL8* در هر دواندام هوایی و ریشه بیان می‌شود ولی این بیان بیش‌تر حالت معکوس و مکمل دارد و احتمالاً تنها بیان در ریشه و یا اندام هوایی فعال است.

در مطالعه ون و همکاران (Wen *et al.*, 2004) بر روی گیاه آرابیدوپسیس بیان پنج ژن از خانواده *DVL* مطالعه شد. نتایج حاکی از آن بود که ژن‌های *DVL* عمدتاً در بافت‌های متفاوتی بیان می‌شوند. بیان *DVL1* بسیار کم بود. بیان *DVL2* نیز پس از یک هفته تنها در ساقه گزارش شد. بیان *DVL3* در بافت ساقه و برگ مشاهده شد. در رابطه با ژن *DVL4* بیان بسیار بالایی در برگ‌ها دیده شد، در حالی که سطح بیان در ریشه، ساقه و گل‌ها کاهش نشان داد. *DVL5* بیان بیش‌تری در گل و برگ داشت (Wen *et al.*, 2004). همچنین در تحقیق دیگری که بر روی بیان ژن‌های *DVL* آرابیدوپسیس انجام شد، اختصاصیت آن‌ها در بافت‌های متفاوت به اثبات رسید. برخی از این خانواده ژنی در تمامی بافت‌ها بیان داشتند و برخی دیگر تنها در بافت‌های خاصی رونوشت داشتند (Valdivia *et al.*, 2013). با توجه به نتایج تحقیقات مشابه می‌توان گفت که بیان *AlDVL8* در هر دو اندام هوایی و اندام زمینی (ریشه) انجام می‌گیرد. علاوه بر این در مطالعه‌ای که بر روی موتیف‌های تشکیل‌دهنده این خانواده ژنی انجام گرفت حاکی از آن بود که بیان اختصاصی در بافت‌های مختلف گیاهی از جمله برگ، ریشه، گل و ... به موتیف‌های تشکیل دهنده هر ژن بستگی دارد و ژن‌های دارای موتیف‌های مشابه دارای بیان اختصاصی خود در هر بافت هستند (Guo *et al.*, 2015). بنابراین بیان اختصاصی بافت و حتی بیان معکوس در بافت‌ها می‌تواند نتیجه ساختار درونی و موتیف‌های موجود در هر ژن از این خانواده و ژن *AlDVL8* مطالعه شده در این تحقیق باشد. در واقع این موتیف‌ها در نهایت نوع عملکرد اختصاصی هر ژن را تعیین می‌کند.

همچنین با مطالعه عناصر تنظیمی موجود در ناحیه پروموتری ژن *AlDVL8* می‌توان به عوامل محرک بیان آن پی‌برد (جدول ۲). از میان عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به هورمون‌ها و عوامل تنشی ژن *AlDVL8* بیش‌ترین تعداد عناصر (۱۱۰) را در میان ۱۴ ژن مورد مطالعه دارا بود. ناحیه پروموتری این ژن دارای عنصر پاسخ‌دهنده به تنش شوری (یک مورد و یک عدد)، هورمون‌های SA (دو نوع و پنج عدد)، CK (یک مورد و ۱۲ عدد)، GA (سه مورد و در مجموع ۲۵ عدد) بود. سطوح بیان این ژن تحت تأثیر این تیمارها قرار گرفت. در واقع تیمار شوری، SA، BAPو GA هر کدام موجب القای بیان ژن در بافت و زمان مشخصی شدند، با این وجود در برخی زمان‌ها کاهش بیان نیز مشاهده شده که احتمالاً به سایر عوامل فیزیولوژیک گیاه مرتبط می‌باشد و در این زمینه نیاز است مطالعه بیشتری صورت گیرد. در مطالعه‌ای افزایش بیان ژن‌های خانواده DVL موجب افزایش بیان یا کاهش بیان ژن‌های متعددی شد که

احتمالاً در مسیرهای سیگنالی نقش دارند (Valdivia *et al.*, 2013). از طرف دیگر افزایش بیان ژن *DVL16* آرابیدوپسیس موجب افزایش بیان ۱۷ ژن در گیاهان تراریخت شد که هیچ یک از ژن‌ها ارتباطی مشخصی با مسیرهای سیگنالی و تنظیمی تقسیم سلول نداشتند (Narita *et al.*, 2004).

در لاین تراریخت آرابیدوپسیس افزایش بیان داده شده با ژن*AtDVL4*، تعداد ۴۲۲ ژن افزایش بیان قابل‌توجهی نشان دادند. در میان این ژن‌ها، فاکتورهای رونویسی بیش‌ترین فراوانی را داشتند و فاکتور رونویسی NAC1بیش‌ترین پاسخ را نشان داد. NAC1 یک فاکتور رونویسی پاسخ‌دهنده به اکسین است. همچنین ژن‌های پاسخ‌دهنده به شرایط محیطی ژن‌های پاسخ‌دهنده به هورمون‌ها از فراوانی بالایی برخوردار بودند. این نتایج حاکی از نقش این پلی‌پپتیدهای کوچک در پاسخ به شرایط محیطی و تغییرات هورمونی در شرایط تنشی است (Larue *et al.*, 2010). افزون بر این، در تحقیقی ژن *AtDVL16* و یکی از اعضای خانواده DVL از گیاه برنج (*Os01t0972300*) در گیاه آرابیدوسیس افزایش بیان داده شده بود، تغییرات موفولوژیکی ایجاد شده در اندام‌های این لاین‌های تراریخت علاوه بر موتیف‌های ساختاری ژن‌ها به تأثیر هومون‌هایی از جمله سیتوکینین و اکسین ارتباط داده شد (Guo *et al.*, 2015). بنابراین با توجه به مطالعات دیگر تا حدی به ارتباط میان هورمون‌ها، تنش‌ها و این پپتیدهای کوچک می‌توان پی‌برد، اما نقش و سازوکار آن‌ها در برابر تنش باید در تحقیقات بعدی مطالعه شود.

به صورت کلی نتایج بررسی پروموتری این خانواده ژنی حاکی از آن بود که توالی‌های مربوط به عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده انواع تنش‌های غیرزیستی و هورمون‌ها در این نواحی موجود هستند. با این وجود برخی از این عناصر تنظیمی در تمامی پروموترهای مورد بررسی مشاهده شده‌اند که می‌توانند حاکی از فعالیت مشترک این خانواده ژنی در پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها باشند. در مقابل نواحی پروموتری که در پروموتر تمامی ژن‌ها حضور ندارد، احتمالاً برای فعالیت‌های اختصاصی‌تر ژن‌ها کاربرد دارند. نتایج بیان ژن *AlDVL8* از این خانواده ژنی در اندام هوایی و ریشه نشان داد که بیان ژن تحت تأثیر تیمارهای شوری و هورمونی قرار می‌گیرد. این نتایج حاکی از القای بیان ژن به واسطه هورمون‌ها و تنش است و مطابق با عناصر تنظیمی موجود در ناحیه پروموتری هورمون‌ها است. اما اینکه چرا در برخی زمان‌ها افزایش و در برخی زمان‌ها کاهش بیان مشاهده شده‌است، می‌تواند به فیزیولوژی درونی گیاه و پاسخ و سیگنال‌دهی در زمان‌های متفاوت مرتبط باشد که می‌بایست تحقیقات بیش‌تری در این زمینه صورت گیرد. از آنجا که طی تنش سطح هورمون‌های درونی گیاه تغییر می‌کند و میزان هورمون طی تنش بر بیان این خانواده ژنی می‌تواند اثرگذار باشد و با توجه به اثر تنش شوری بر بیان این ژن‌ها و حضور سایر عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش از جمله خشکی در نواحی پروموتری این خانواده ژنی، می‌توان نقش احتمالی تحمل به تنش و همچنین نقش سیگنالی تحت تنش را برای این خانواده ژنی در نظر گرفت.

REFERENCES

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. Plant. Cell. 15(1):63-78.

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. Plant. Cell. 9(10): 1859-1868.

Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF

(1994) The 5′-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold, drought- and ABA-regulated gene expression. Plant. Mol. Biol. 24(5):701-713.

Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. Plant. Mol. Biol. 69(4):473-488.

Boter M, Ruíz-Rivero O, Abdeen A, Prat S (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. Genes. Dev. 18(13):1577-1591.

Brown RL, Kazan K, McGrath KC, Maclean DJ, Manners JM (2003) A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1. 2 gene of Arabidopsis. Plant Physiol. 132(2):1020-1032.

Busk PK, Pagès M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. Plant. Mol. biol. 37(3):425-435.

Chow C-N, Zheng H-Q, Wu N-Y, et al. (2016) PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. Nucleic. Acids. Res. 44(D1):D1154-D1160.

Dabrowska G, Mierek-Adamska A, Goc A (2012) Plant metallothineins: putative functions identified by promoter analysis in silico. Acta. Biol. Cracov. Bot. 54(2).

Du H, Zhang L, Liu L (2009) Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. Biochemistry. (Moscow.). 74(1):1-11.

Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-and cold-responsive gene expression. Plant. J. *33*(4), 751-763.

Dunn MA, White AJ, Vural S, Hughes MA (1998) Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (blt4. 9) from barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant molecular biology 38(4):551-564.

Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. Plant. Cell. 12(4):599-609.

Guo P, Yoshimura A, Ishikawa N, Yamaguchi T, Guo Y, Tsukaya H (2015) Comparative analysis of the RTFL peptide family on the control of plant organogenesis. J. Plant. Res. 128(3): 497-510.

Hashemi SH, Ghorbani M (2021) RT-qPCR analysis of some members of DEVIL gene family in *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. under salinity stress. Environ. Stresses. Crop. Sci. 13(4):1245-1258.

Hashemi SH, Nematzadeh G, Ahmadian G, Yamchi A, Kuhlmann M (2016) Identification and validation of *Aeluropus littoralis* reference genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization. J. Biol. Res. (Thessalon.). 23(1):1-13.

Hashemi SH, Nematzade G, Kuhlmann M (2019) Identification and analysis of a DEVIL paralog gene cluster in *Aeluropus littoralis* by a comparative genomic approach. Crop Biotech. 9(25): 75- 87.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic. Acids. Res. 27(1): 297-300.

Hudson ME, Quail PH (2003) Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. Plant. Physiol. 133(4):1605-1616.

Ibraheem O, Botha CE, Bradley G (2010) In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5′ regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. Comput Biol. Chem. 34(5-6):268-283.

Kim SY, Chung HJ, Thomas TL (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. PlantJ 11(6):1237-1251.

Larue CT, Wen J, Walker JC (2010) Interactions between a NAC-domain transcription factor and the putative small protein encoding DVL/ROT gene family. Plant. Mol. Biol. Rep. 28(1), 162.

Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic. Acids. Res. 30(1): 325-327.

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.

Mena M, Cejudo FJ, Isabel-Lamoneda I, Carbonero P (2002) A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone. Plant. Physiol. 130(1):111-119 .

Mohanty B, Krishnan S, Swarup S, Bajic VB (2005) Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. Ann. Bot. 96(4):669-681.

Mongkolsiriwatana C, Pongtongkam P, Peyachoknagul S (2009) In silico promoter analysis of photoperiod-responsive genes identified by DNA microarray in rice (*Oryza sativa* L.). J Nat Sci 43:164-77.

Narita NN, Moore S ,Horiguchi G, et al. (2004) Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*. Plant. J. 38(4):699-713.

Park HC, Kim ML, Kang YH, et al. (2004) Pathogen-and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. Plant. physiol. 135(4):2150-2161.

Rahnama H, Haghighat V (2014) Cloning and functional analysis of inducible promoter Rd29A in transgenic tobacco plants. Cell. Mol. Res. 26(4):480-490.

Redman J, Whitcraft J, Johnson C, Arias J (2002) Abiotic and biotic stress differentially stimulate as-1 element activity in Arabidopsis. Plant. Cell. Rep. 21(2):180-185.

Ross EJ, Stone JM, Elowsky CG, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Sarath G (2004) Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. J. Exp. Bot. 55(403):1721-1731.

Ryu H, Cho Y-G (2015) Plant hormones in salt stress tolerance. J. Plant. Biol. 58(3):147-155

Sakai H, Aoyama T, Oka A (2000) Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. Plant. J. 24(6):703-711.

Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Two different novel cis-acting elements of erd1, a clpA homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. Plant. J. 33(2):259-270.

Sudan J, Sharma D, Mustafiz A, Kumari S (2018) Signaling Peptides: Hidden

Molecular Messengers of Abiotic Stress Perception and Response in Plants. In: Zargar SM, Zargar MY (eds) Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective, 1st Ed. Springer, Singapore, pp 95-125

Sutoh K, Yamauchi D (2003) Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. Plant. J. 34(5):635-645.

Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K (1993) An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. Plant. Cell. 5(11):1529-1539.

Valdivia ER, Hertweck KL, Cho SK, Walker JC (2013) DVL/RTFL. In: Kastin AJ (ed) Handbook of Biologically Active Peptides, 2nd Ed. Academic Press, Waltham, pp 15-19.

Van Helden J (2003) Regulatory sequence analysis tools. Nucleic. Acids. Res. 31(13):3593-3596.

Wen J, Lease KA, Walker JC (2004) DVL, a novel class of small polypeptides: overexpression alters Arabidopsis development. Plant. J. 37(5): 668-677.

Xie T, Zeng L, Chen X, Rong H, Wu J, Batley J, Jiang J, Wang Y (2020) Genome-Wide Analysis of the Lateral Organ Boundaries Domain Gene Family in *Brassica Napus*. Genes. 11(3): 280.

Xue GP (2002) Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. Nucleic. Acids. Res. 30(15): e77-e77.

Yu D, Chen C, Chen Z (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. Plant. Cell. 13(7):1527-1540.

Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. Field. Crops. Res. 97(1):111-119.

Zhang ZL, Xie Z, Zou X, Casaretto J, Ho THD, Shen QJ (2004) A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. Plant. Physiol. 134(4): 1500-1513.

Zhou M-L, Ma JT, Pang JF, Zhang ZL, Tang YX, Wu YM (2010) Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors . Afr. J. Biotechnol. 9(54):9255-9269.

Zouari N, Saad RB, Legavre T, et al. (2007) Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. Gene. 404(1-2):61-69.