

«مقاله پژوهشی»

شناسایی و گروه‌بندی خانواده عوامل رونویسی WRKY در برنج ژاپونیکا

پریسا دریانی^{۱،۲}، فاطمه فرزانه پیرآقرا^۱، ناصر زارع^۱، زهرا سادات شوبر^{۲*}، رسول اصغری زکریا^۱

۱. گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲. گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۶)

Identification and classification of the WRKY transcription factors family in Japonica rice

Parisa Daryani^{1,2}, Fatemeh Farzaneh Piralger¹, Nasser Zare¹, Zahra-Sadat Shobbar^{2*}, Rasool Asghari-Zakaria

1. Department of Plant Production and Genetics, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2. Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

(Received: Feb. 25, 2021 - Accepted: Jun. 16, 2021)

Abstract

WRKY gene family encodes a large group of transcription factors regulating biotic and abiotic stress-responsive genes. In order to identify the WRKY gene family members in rice (*Oryza sativa* ssp. japonica), multiple searches were done in the related databases. Rice WRKY-conserved sequences were used as the templates for tBLASTN searches in datasets for finding new members. An HMM profile of WRKY domain was also used to find WRKY gene family. Multiple sequence alignment was done using clustalW software, and phylogenetic trees were drawn using MEGA10 software based on a neighbour-joining method with a 1000 repeats bootstrap index. According to the results, 165 members of the WRKY gene family were found in rice, of which 63 were new members. Sequences were divided into three main groups based on the number of WRKY domains and the structure of zinc-finger motifs. Conclusively, there were 21 proteins with two WRKY conserved domains in group I, 53 proteins with one WRKY conserved domain and Cx7Cx23HxC zinc-finger motif in group III and 82 proteins with one WRKY conserved domain and Cx4-5Cx22-23HxH zinc-finger motif in group II. The chromosomal location of *OsWRKYs* was detected on the rice genome. The different groups were distributed on various chromosomes. The greatest number of *OsWRKY* genes (32 members) were located on chromosome 1. Following complementary research and identification of promising candidate genes involved in tolerance to each stress, they can be used to increase tolerance to the desired stresses and provide food security using genetic engineering or molecular breeding approaches.

چکیده

خانواده‌ی ژنی WRKY رمزکننده گروه بزرگی از عوامل رونویسی هستند که در تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخیل می‌باشند. برای گردآوری اعضاء این خانواده ژنی در برنج ژاپونیکا (*Oryza sativa* ssp. Japonica)، جستجوی چندگانه در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف مرتبط انجام شد. به منظور شناسایی اعضاء جدید، tblastn بر اساس توالی‌های حفاظت‌شده‌ی خانواده ژنی WRKY در پایگاه اطلاعاتی NCBI و جستجو بر اساس مدل مخفی مارکوف صورت گرفت. هم‌ردیف سازی توالی‌های پروتئینی با استفاده از نرم افزار ClustalW و آنالیز درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA10 انجام گردید. براساس نتایج به دست آمده، ۱۶۵ عضو از خانواده‌ی ژنی WRKY در برنج یافت شد که ۶۳ عضو جدید بودند. توالی‌های موجود بر مبنای تعداد دمن‌های WRKY و ساختار انگشت روی در سه گروه اصلی دسته‌بندی شدند. بر این اساس ۲۱ پروتئین در گروه I، ۵۳ پروتئین با ساختار انگشت روی Cx7Cx23HxC در گروه III و ۸۲ پروتئین با ساختار انگشت روی Cx4-5Cx22-23HxH در گروه II قرار گرفتند. مکان هر ژن روی کروموزوم مشخص شد. گروه‌های مختلف خانواده ژنی WRKY بر روی کروموزوم‌های مختلف برنج توزیع شده‌اند. بیشترین تعداد ژن *OsWRKY* روی کروموزوم یک (۳۲ عضو) قرار داشتند. به دنبال بررسی‌های تکمیلی و تعیین ژن‌های کاندید امیدبخش دخیل در تحمل به هر یک از تنش‌ها، می‌توان از آنها در راستای افزایش تحمل به تنش‌های مورد نظر و تامین امنیت غذایی با استفاده از راهکارهای مهندسی ژنتیک یا اصلاح مولکولی بهره برد.

Keywords: *Oryza sativa*, Japonica subspecies, Phylogenetic analysis, Transcription factors, WRKY

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیک، برنج، زیرگونه ژاپونیکا، WRKY. عوامل رونویسی.

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L) یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی است که غذای بیش از یک سوم جمعیت جهان را تامین می‌کند. تنش‌های زیستی و غیرزیستی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در رشد و عملکرد برنج هستند و تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۵۰، بیش از ۵۰ درصد از زمین‌های قابل کشت جهان تحت تأثیر تنش خشکی قرار گیرد (Singhal et al., 2016). تنش‌های محیطی اثرگذاری‌های چشمگیری بر رشد و نمو و در نهایت عملکرد گیاهان دارند (Cattivelli et al., 2008). سازگاری گیاهان برای رویارویی با تنش‌های محیطی، وابسته به شبکه‌ای از فرایندهای مولکولی درگیر در تنش است، بنابراین شناسایی و بررسی خصوصیات ژن‌های دخیل در تنظیمات این سامانه شبکه‌ای ضروری است (Vinocur and Altman, 2005).

عوامل رونویسی^۱ گروهی از پروتئین‌ها هستند که فرآیندهای سلولی را به وسیله تنظیم بیان ژن‌های هدف پایین دست کنترل می‌کنند. هفت درصد (Cowell et al., 1992) پروتئین‌های گیاهی، عوامل رونویسی هستند که حاکی از اهمیت این پروتئین‌ها در تکامل گونه‌های گیاهی است (Olsen et al., 2005). مطالعات نشان داده‌اند که عوامل رونویسی مانند MYB، WRKY، bHLH، bZIP، DREB و عناصر دخیل در انتقال پیام مانند پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم (MAP کینازها) در کنترل تنظیم میزان بیان بسیاری از پروتئین‌های عملکردی نقش دارند و از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های کنترل ژن‌ها می‌باشند (Rushton et al., 2010). عوامل رونویسی WRKY از بزرگترین خانواده‌های تنظیم‌کننده رونویسی در گیاهان می‌باشند و در تنظیم بسیاری از فرآیندهای زیستی شرکت می‌کنند. نام این

خانواده از چهار اسید آمینه حفاظت‌شده آن شامل lysine، arginine (R)، tryptophan (W) و tyrosine (Y) گرفته شده است. خانواده WRKY یکی از ده خانواده بزرگ ژنی هستند که در گیاهان عالی و تمام اجداد سبز گیاهی کشف شده‌اند (Eulgem et al., 2000). یافته‌های جدید نشان می‌دهد که پروتئین‌های مربوط به خانواده WRKY اغلب به عنوان فعال‌کننده و مهارکننده در فرآیندهای مهم گیاهی شرکت می‌کنند. ژن‌های WRKY یکی از قدیمی‌ترین خانواده‌های ژنی عوامل رونویسی هستند که در طی تکامل سلسله گیاهی دچار مضاعف شدگی گسترده شده‌اند (Rushton et al., 2010; Berri et al., 2009).

دانشمندان نقش‌های عوامل رونویسی WRKY در فرایندهای زیستی متعددی مثل جوانه زنی، پیری و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی همچون تنش‌های سرما و خشکی را روشن ساخته‌اند. در برنج نقش این عوامل رونویسی در تحمل به تنش خشکی به اثبات رسیده است (Rushton et al., 2010). دلیل نامگذاری این خانواده‌ی ژنی به WRKY وجود ۶۰ اسید آمینه‌ای در توالی پروتئین‌های این خانواده است که در انتهای آمینی این پروتئینی موتیف حفاظت‌شده^۲ WRKYGQK وجود دارد (Eulgem et al., 2000). در تعداد کمی از این پروتئین‌ها این توالی تغییرات کمی در جایگزینی اسید آمینه‌ها مثل WVKY، WKRY، WRRY، WSKY و WKKY داشته است (Xie et al., 2005). همچنین در انتهای کربوکسیلی این دامین، ساختار انگشت‌روی حاوی اسید آمینه‌های سیستئین و هیستیدین به صورت حفاظت‌شده وجود دارد. ساختار انگشت‌روی به فرم‌های Cys2-His/Cys و Cys2-His وجود دارند (Eulgem et al., 2000). موتیف

مطالعات تکمیلی از جمله بررسی الگوی بیان اعضا و عملکرد آن‌ها، امید است بتوان از این ژن‌ها برای اصلاح و دست ورزی گیاهان در جهت افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی بهره برد.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده ژنی WRKY با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط شناسایی اعضای خانواده ژنی با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط با عوامل رونویسی در گیاه برنج *O. sativa ssp. japonica* (*Osj*) شروع شد (جدول ۱). توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی اعضای خانواده‌ی WRKY جمع‌آوری شدند.

جدول ۱. اسامی و آدرس پایگاه داده‌های مورد استفاده در

شناسایی اعضای خانواده ژنی WRKY

Database	URL
TFDB	http://planttfdbcbi.edu.cn
Rice Phylogenomics Database	http://ricephylogenomics.ucdavis.edu/
Grass Funricegenes	http://grassius.org/index.php http://funricegenes.github.io/categories/
Rice Genome Annotation Project	http://rice.plantbiology.msu.edu/annotation_community_families.shtml
Uniprot	https://www.uniprot.org/
Rap-DB	https://rapdb.dna.affrc.go.jp/
Pfam	http://pfamsanger.ac.uk/
Ensemble Plants	http://plantsensembl.org/

tblastn براساس توالی‌های حفاظت‌شده در برنج با استفاده از توالی‌های پروتئینی حفاظت‌شده اعضای خانواده WRKY در گیاه برنج (Wu *et al.*, 2005) **tblastn** علیه داده‌های نوکلئوتیدی برنج (*nr*) در پایگاه داده‌های اطلاعاتی NCBI انجام شد. دامین‌های حفاظت‌شده WRKY تمامی زیرگروه‌های خانواده پروتئینی برنج (I, IIa, IIb, IIc, IIe) در **tblastn** (III و IV) مورد استفاده قرار گرفتند. جهت تشخیص اعضای خانواده WRKY وجود ساختار حفاظت‌شده و کلیدی این خانواده به‌عنوان

WRKYGQK و ساختار انگشت‌روی^۱ برای اتصال به عناصر سیس (*cis* element) W ضروری می‌باشند. حضور توالی حفاظت‌شده W (TTGACT/C) روی شیار بزرگ DNA و در پروموتور ژن‌های هدف توسط عوامل رونویسی WRKY شناسایی‌شده و پس از اتصال به آن‌ها موجب تنظیم بیان ژن‌های موردنظر می‌گردند (Eulgem *et al.*, 2000). این خانواده ژنی بر مبنای تعداد دمین WRKY و خصوصیات موتیف انگشت-روی آن‌ها به چهار گروه تقسیم می‌شوند. گروه I دارای دو دمین WRKY و گروه II و III دارای یک دمین WRKY می‌باشند، ساختار انگشت‌روی در گروه III با گروه‌های I و II متفاوت است به طوری که این موتیف در گروه III به صورت-Cys2 His/Cys و در گروه‌های I و II به صورت-Cys2 His2 می‌باشد. گروه II نیز بر مبنای تفاوت ساختار در دمین WRKY به زیرگروه‌های IIa تا IIe تقسیم‌بندی می‌شوند و گروه IV دو زیر گروه تقسیم می‌شود (Xie *et al.*, 2005). از دو دمین موجود در گروه اول فقط یکی از دمین‌ها (دمین موجود در انتهای کربوکسیلی) کار شناسایی توالی W را بر عهده دارد و دمین دیگر (انتهای آمینی) آن به اختصاصی بودن اتصال کمک می‌کند در واقع دمین انتهای کربوکسیلی گروه I عملکرد مشابهی با دمین WRKY پروتئین‌های گروه‌های II و III دارد (Eulgem *et al.*, 2000).

هدف از این مطالعه، شناسایی تمامی اعضای خانواده ژنی WRKY در برنج ژاپونیکا، گروه‌بندی صحیح و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی دقیق آن‌ها بوده است. نتایج این پژوهش برای تمامی پژوهشگرانی که کارشان به نحوی با اعضای این خانواده ژنی مرتبط است مفید خواهد بود. پس از

دارای دو دمین WRKY بودند، دمین‌های انتهایی آمینی و کربوکسیلی آن‌ها به‌طور جداگانه همدریف شدند. سپس درخت فیلوژنتیکی آن‌ها براساس روش نزدیک‌ترین همسایه‌ها^۱ با آزمون خودراه‌اندازی^۲ با تکرار ۱۰۰۰ توسط نرم‌افزار MEGA10 ترسیم شد.

همه اعضای خانواده WRKY با توجه به گروه‌بندی که در درخت فیلوژنتیک بود مرتب شدند و مناطق مشابه و حفاظت‌شده هر گروه توسط نرم‌افزار MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) مشخص شد.

مکان‌یابی کروموزومی ژن‌ها

توالی‌های پروتئینی تک به تک اعضای خانواده ژنی در برنج در مقابل ژنوم برنج در پایگاه NCBI مورد جستجو قرار گرفتند و مکان هر ژن روی کروموزوم با اندازه مگاباز به‌صورت شماتیک توسط نرم‌افزار MapChart ترسیم شد (Voorrips, 2002).

نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی WRKY

در برنج ژاپونیکا تعداد ۱۲۹، ۱۳۰، ۱۰۵، ۸۱ و ۱۴۹ توالی پروتئینی *OsWRKY* به‌ترتیب از پایگاه‌های اطلاعاتی TFDB، Rice Phylogenomics، Database، Grass، funRiceGenes و Rice Annotation Project Genome جمع‌آوری شد. برای شناسایی اعضای جدید، tblastn براساس توالی‌های حفاظت‌شده این خانواده در برنج در پایگاه اطلاعاتی NCBI و جستجو براساس مدل مخفی مارکوف انجام شد که به‌ترتیب منجر به شناسایی ۷ و ۶۰ توالی جدید شد. در نهایت، توالی‌های تکراری به‌دست‌آمده از جستجوهای مذکور، با استفاده از روش پیدا کردن Duplicate در برنامه Excel تشخیص

شاخص استفاده شد؛ یعنی توالی‌های پیدا شده در صورت داشتن ساختارهای حفاظت‌شده خانواده پروتئینی WRKY مثل WRKYGQK و انگشت روی به‌عنوان توالی‌های جدید ثبت شدند.

جستجو بر اساس مدل مخفی مارکوف (Hidden Markov Model)

برای جستجو بر اساس مدل مخفی مارکوف، ابتدا کد دسترسی HMM برای دمین حفاظت‌شده WRKY (PF03106) از پایگاه Pfam دریافت شد. سپس جستجو برای شناسایی اعضای خانواده ژنی WRKY در پایگاه Rice Genome Annotation Project با استفاده از ابزار آنالین hmmer (جدول ۱) انجام شد.

تأیید دمین در توالی‌های اعضای خانواده ژنی

به‌منظور حصول اطمینان از حضور دمین‌های حفاظت‌شده خانواده ژنی WRKY در اعضا یافت شده، توالی‌های مربوطه در پایگاه‌های Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)، InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/UniProt/>)، SMART (<https://SMART.embl.de/>)، PROSITE (<https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/>) مورد جستجو قرار گرفتند.

طبقه‌بندی و مطالعات فیلوژنتیک

اعضای خانواده ژنی WRKY در دو گونه برنج (*O. rufipogon*، *O. nivara*) از پایگاه اطلاعاتی TFDB گرفته شدند و به‌منظور یافتن اعضای احتمالی جدید و گروه‌بندی، توالی پروتئینی این اعضا بر علیه پروتئین‌های برنج توسط tBLASTN پایگاه NCBI مورد جستجو قرار گرفت.

توالی‌های مربوط به دمین حفاظت‌شده پروتئین‌های اعضای خانواده ژنی WRKY برنج با استفاده از نرم‌افزار ClustalW همدریف شدند. در اعضای که

1. Neighbor-joining
2. Bootstrap

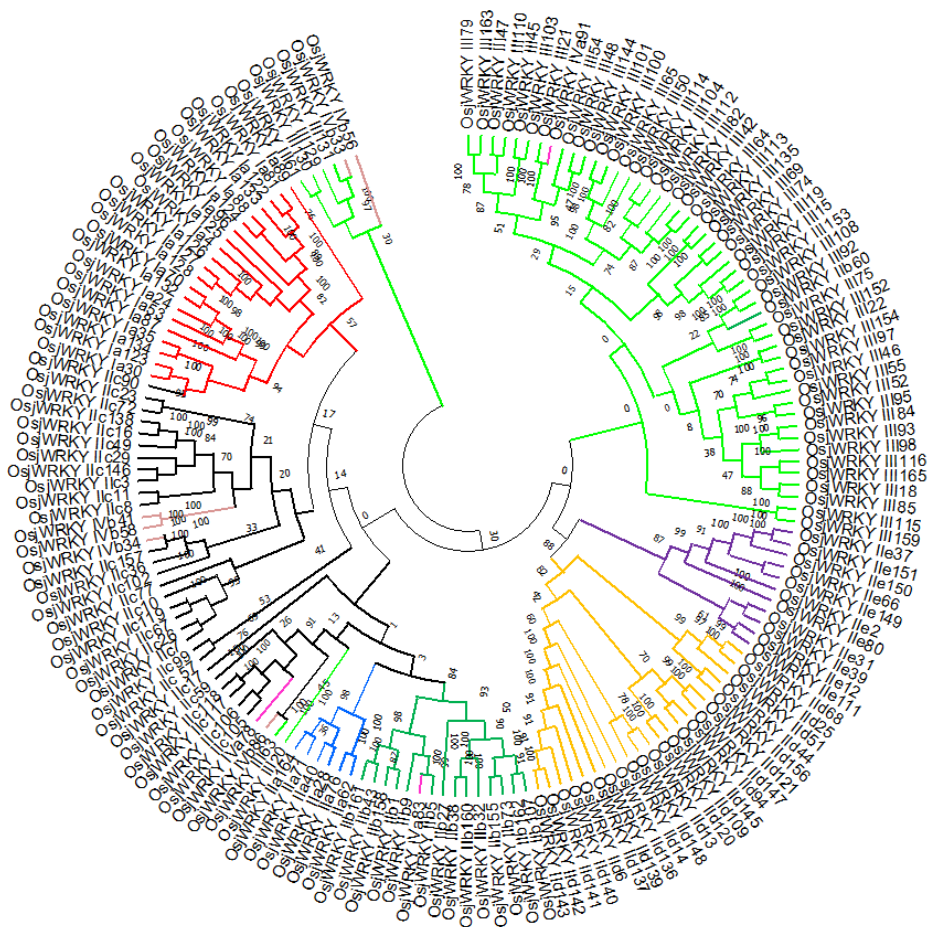
توالی‌هایی از دمین WRKY و انگشت روی ناقص C₂XX بودند که در گروه IVa قرار داده شدند. شش پروتئین *OsWRKY* فقط دارای دمین WRKY بودند و بنابراین به گروه IVb منتسب شدند. در پیدا کردن اعضای خانواده ژنی WRKY داشتن ساختار حفاظت شده WRKYGQK و توالی انگشت روی به دقت بررسی و تأیید شد. شایان ذکر است دلیل انتخاب توالی‌های ناقص گزارش شده به عنوان اعضای این خانواده، دارا بودن موتیف WRKYGQK و شباهت زیاد ساختاری با توالی‌های WRKY و یا ثبت در پایگاه NCBI و HMM^۱ به نام WRKY بوده است. شباهت ساختاری دمین‌های حفاظت شده توالی‌ها بین گروه‌ها و زیرگروه‌های (I, IIc)، (IIa, IIb) و (IIe, IIId) (III) مشهود است که نشان از وجود جد مشترک در آن‌ها می‌باشد. این گروه‌ها و زیرگروه‌ها در شکل ۱ نیز کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند (شکل ۱).

گروه III دارای بیشترین عضو (۵۳) و گروه Ib بدون عضو بود (شکل ۲). بر اساس نتایج پژوهش حاضر، ۸۲ عضو از ۱۶۵ *OsWRKY* متعلق به زیر گروه II می‌باشند (یعنی بیش از ۵۰ درصد) (شکل ۲الف). همچنین از ۶۳ عضو جدید گزارش شده ۱۹ عضو از گروه III بودند (شکل ۲-ب). توزیع فراوانی گروه بندی اعضای خانواده ژنی WRKY برنج روی کروموزوم‌ها نشان می‌دهد که گروه‌های مختلف بر روی کروموزوم‌های مختلف توزیع شده‌اند (شکل ۳). بیشترین تعداد ژن WRKY (۳۲) و کمترین تعداد ژن (۲) به ترتیب روی کروموزوم یک و ۱۰ قرار گرفتند (شکل‌های ۳ و ۴). بعد از کروموزوم یک بیشترین تعداد ژن روی کروموزوم پنج و سه قرار داشتند. بیشترین تراکم ژنی در روی کروموزوم یک، سه و پنج بود (شکل ۴).

داده و حذف شدند. همچنین توالی‌هایی که منتسب به جایگاه کروموزومی یکسانی بودند، به عنوان یک عضو در نظر گرفته شدند. برای حصول اطمینان از حضور دمین WRKY توالی‌های پروتئینی یافت شده در پایگاه Pfam، SMART و PROSITE مورد جستجو قرار گرفتند و تنها رونوشت‌های پروتئینی که دارای دمین WRKY بودند انتخاب شدند. بدین ترتیب، تعداد ۶۳ عضو جدید پیدا شد و در مجموع ۱۶۵ توالی پروتئینی حاصل از مکان‌های ژنی WRKY در برنج ژاپونیکا شناسایی شدند و به دلیل حفظ همخوانی با کارهای پیشین، نامگذاری اعضای صحیح معرفی شده در منابع قبلی (Jimmy and Babu, 2019; Ross et al., 2007) و سایت TFDB تغییر داده نشد، فقط اعضای تکراری یا نادرست با اعضای درست که در این پژوهش شناسایی شدند جایگزین شدند و بقیه اعضای جدید هم در ادامه شماره گذاری قبلی نام گذاری شدند (شکل ۱).

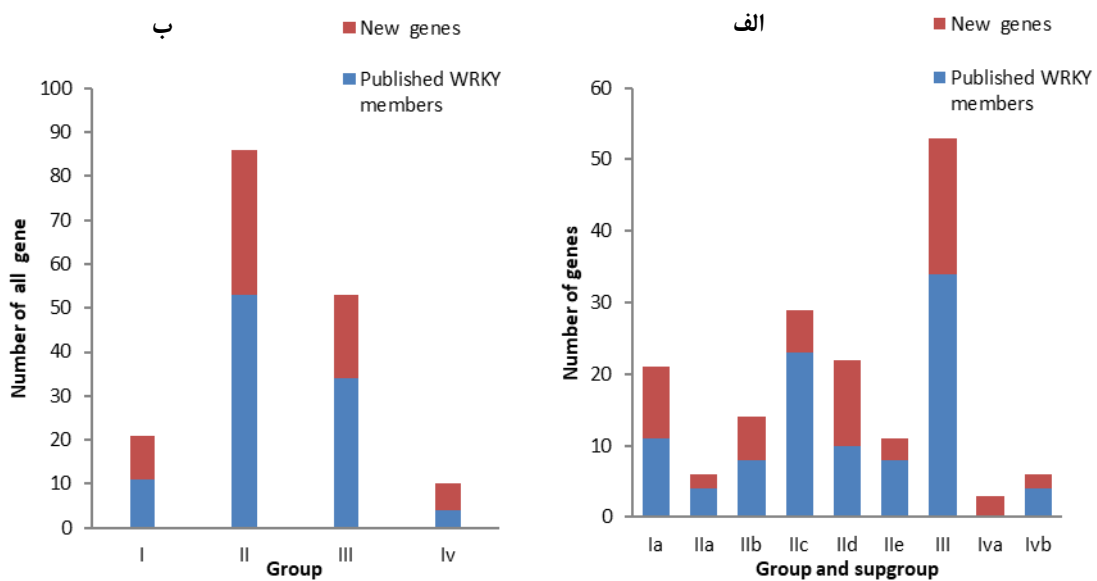
گروه بندی اعضای خانواده ژنی WRKY و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

درخت فیلوژنی بر پایه دمین حفاظت شده WRKY اعضا یافت شده ترسیم شد و بر اساس شباهت‌های ساختاری به کار رفته برای گروه بندی خانواده ژنی WRKY در برنج در زیرگروه‌های دهگانه طبقه بندی شد (شکل ۱). بر این اساس ۲۱ پروتئین دارای دو دمین حفاظت شده WRKY در گروه I، ۵۳ پروتئین دارای یک دمین WRKY با ساختار انگشت روی Cx₇Cx₂₃HxC در گروه III و از پروتئین‌های دارای یک دمین WRKY با ساختار انگشت روی Cx₄Cx₂₂₋₂₄HxH، ۶ پروتئین در زیرگروه IIa، ۱۴ پروتئین در زیرگروه IIb، ۲۹ پروتئین در زیرگروه IIc، ۲۲ پروتئین در زیرگروه IIId و ۱۱ پروتئین در زیرگروه IIe قرار گرفتند که در درخت فیلوژنتیک رسم شده مشاهده می‌شود. سه پروتئین دارای

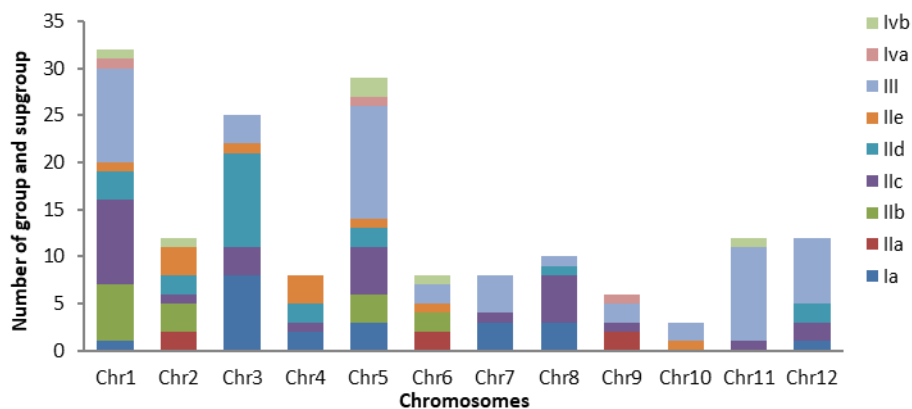


Group	Ia	IIa	IIb	IIc	IId	IIe	III	IVa	IVb
Color	Red	Blue	Green	Black	Yellow	Purple	Cyan	Pink	Brown

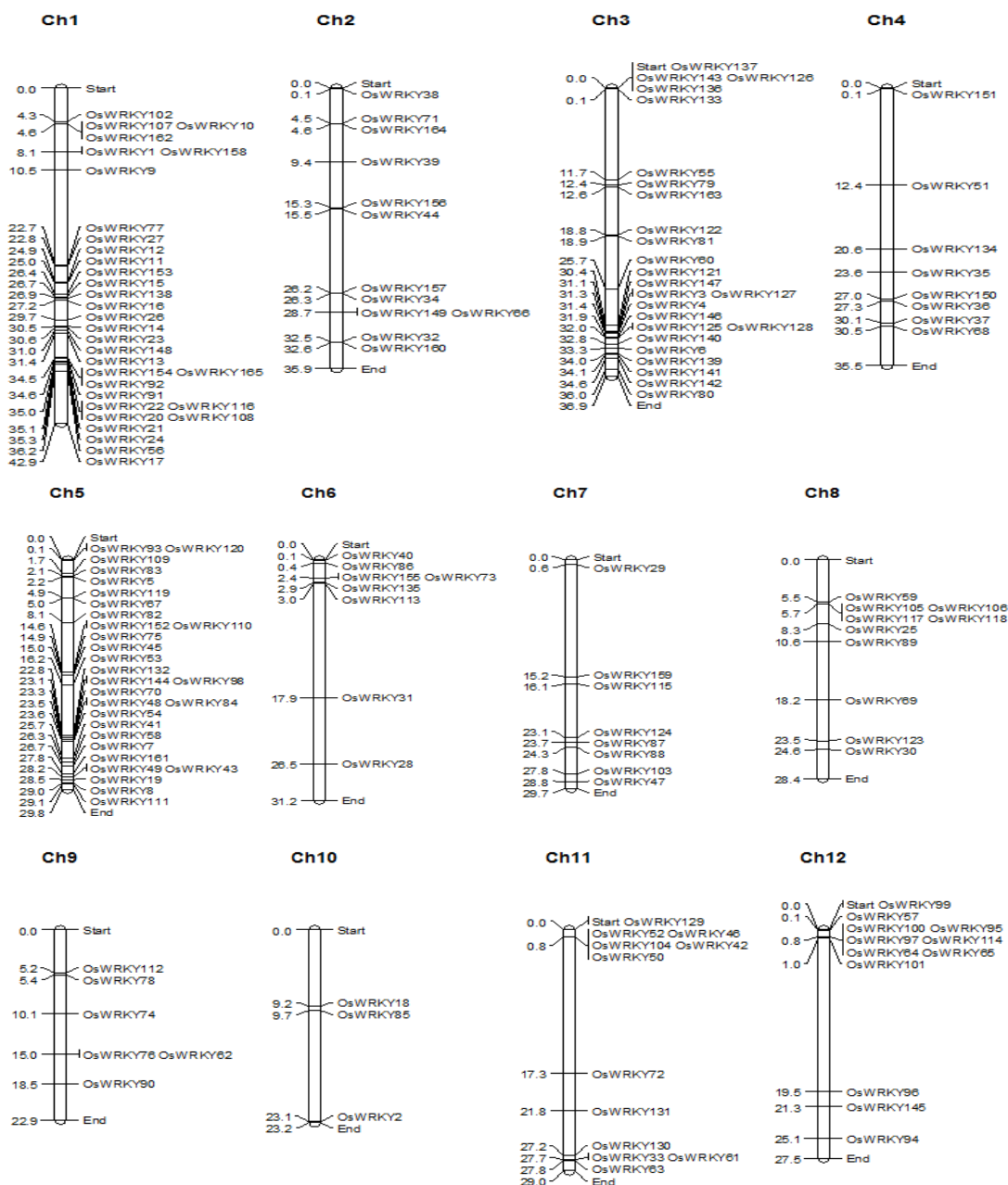
شکل ۱. درخت فیلوژنی خانواده ژنی WRKY در برنج ژاپونیکا بر پایه دمین حفاظت‌شده



شکل ۲. الف) گروه‌بندی اعضای از پیش معرفی شده و اعضای جدید شناخته شده خانواده ژنی WRKY برنج ژاپونیکا، ب) تعداد اعضای از پیش معرفی شده و اعضای جدید شناخته شده خانواده ژنی WRKY برنج ژاپونیکا به تفکیک زیرگروه‌ها



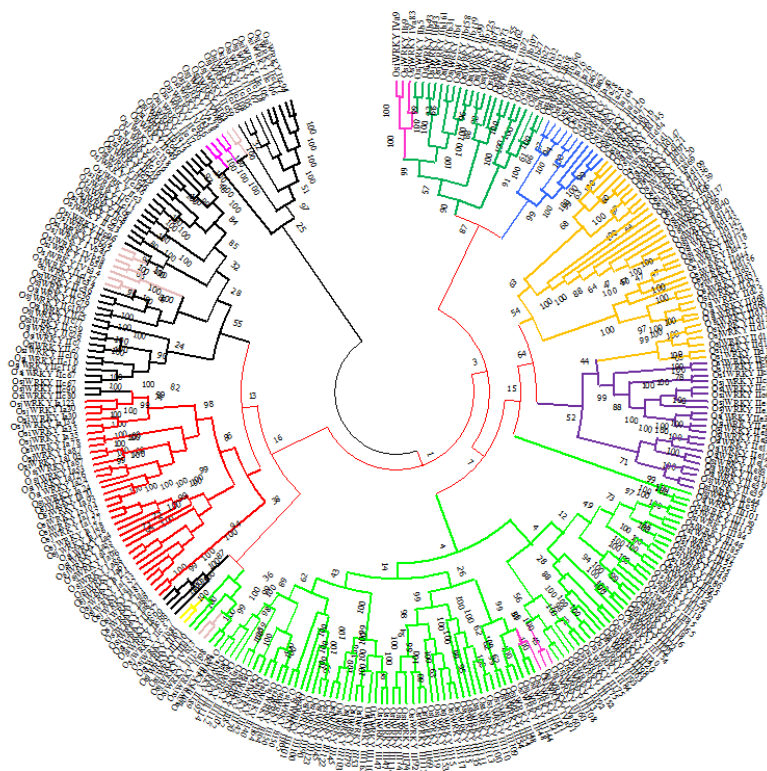
شکل ۳- نمودار توزیع فراوانی خانواده ژنی WRKY روی کروموزوم‌های برنج ژاپونیکا



شکل ۴. جایگاه اعضای خانواده ژنی WRKY روی کروموزوم‌های برنج ژاپونیکا

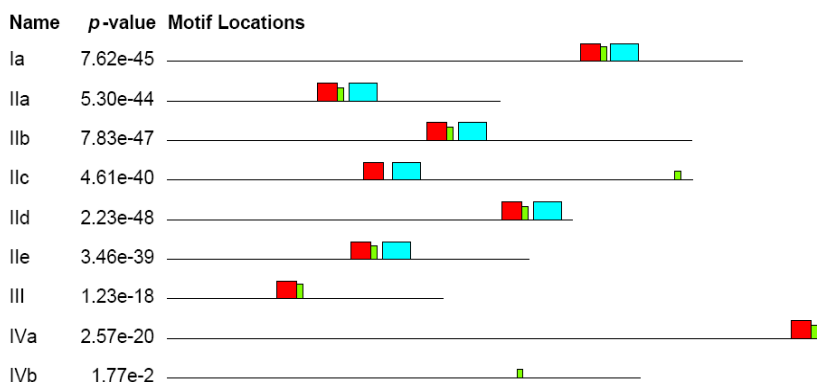
موتیف‌های حفاظت‌شده خانواده ژنی WRKY و محل قرارگیری موتیف‌ها در هر یک از گروه‌ها/ زیرگروه‌های برنج ژاپونیکا WRKY مشخص شدند (شکل ۶).

ترسیم درخت فیلوژنتیکی دو گونه دیگر از برنج (*O. rufipogon*, and *O. nivara*) نیز صحت گروه‌بندی انجام‌شده را تأیید کرد (شکل ۵). همچنین



Group	Ia	IIa	IIb	IIc	IId	IIe	III	IVa	IVb
Color	Red	Blue	Green	Black	Yellow	Purple	Cyan	Magenta	Brown

شکل ۵. درخت فیلوژنی خانواده ژنی WRKY در برنج ژاپونیکا (*O. sativa ssp. japonica*) با دو گونه دیگر برنج (*O. rufipogon*, *O. nivara*) بر اساس دمین حفاظت‌شده



Motif	Symbol	Motif Consensus
1.	■	DGYRWRKYGQKVVKGNPYP
2.	□	CPVRKQVERCAEDPSMLIVTYEGEHNH
3.	■	RSYYRC

شکل ۶. شمایک موتیف‌های حفاظت‌شده خانواده ژنی WRKY و محل قرارگیری موتیف‌ها در هر یک از گروه‌ها/ زیرگروه‌های برنج ژاپونیکا (ترسیم‌شده با نرم‌افزار MEME)

خانواده پروتئینی WRKY در برنج ژاپونیکا است (شکل‌های ۱ و ۲-الف). مطالعات قبلی نیز *OsWRKY28*، *OsWRKY62*، *OsWRKY71* و *OsWRKY76* را در گروه IIa ژن‌های WRKY قرار داده بودند (Peng et al., 2000; Eulgem et al., 2008). به نظر می‌رسد اعضاء این گروه در آرایش سیستم ریشه مؤثر باشند. مشخص شده که *OsWRKY76* با تنظیم پاسخ‌های سلولی به انواع تنش غیر زیستی و زیستی (Yokotani et al., 2013)، تا حدی سبب تنظیم بیان *RSOsPR10* در ریشه‌های جانبی برنج شده و در نتیجه سبب افزایش رشد ریشه، عملکرد و افزایش تحمل به شوری و خشکی خاک می‌شود (Yamamoto et al., 2018). *OsWRKY28* با تنظیم تجمع فسفات و آرسنات، در معماری سیستم ریشه و باروری در برنج نقش دارد (Wang et al., 2018). *OsWRKY164* و *OsWRKY40* دو عضو جدید یافت شده در این گروه هستند که احتمال می‌رود در آرایش سیستم ریشه نقش داشته باشند.

گروه IIb (رنگ سبز تیره): این گروه شامل ۱۵ عضو از خانواده پروتئینی WRKY در برنج ژاپونیکا است (شکل‌های ۱ و ۲-الف). *OsWRKY5* از طریق NAC مرتبط با پیری و مسیر بیوسنتز اسید آسیتیک پیر شدن برگ برنج را تسریع می‌کند (Kim et al., 2019).

گروه IIc (رنگ مشکی): این گروه شامل ۲۹ عضو از خانواده پروتئینی WRKY در برنج ژاپونیکا است (شکل ۲ الف). این گروه ژنی در تحمل تنش غیر زیستی و زیستی از جمله خشکی، اسمزی و بیماری نقش دارند. افزایش بیان *OsWRKY08* ناشی از تنش، تحمل تنش اسمزی را در *Arabidopsis* بهبود می‌بخشد (Song et al., 2010). آبشارهای تنظیمی رونویسی *OsWRKY10* نقش مهمی در دفاع اولیه و مقاومت به Xa1 بازی می‌کنند تا بتوانند یک پاسخ سریع ایمنی را در برابر

نقش اعضای خانواده ژنی WRKY به تفکیک گروه‌ها و زیر گروه‌ها

گروه I (رنگ قرمز): این گروه شامل ۲۱ عضو از خانواده پروتئینی WRKY در برنج ژاپونیکا است (شکل‌های ۱ و ۲-الف). نقش ژن‌های این گروه در مقاومت به بیماری‌ها اثبات شده است. برای مثال عامل رونویسی *WRKY70* در برنج به‌طور اختصاصی در هنگام حمله گیاهخوار (*Chilo suppressalis*) القا شده و از طریق برهم کنش با W-box، با تنظیم مثبت اسید جاسمونیک (JA) و تنظیم منفی بیوسنتز جیبرلین (GA)، دفاع را در اولویت قرار می‌دهد (Li et al., 2015). *OsWRKY4* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت مهم عمل می‌کند که در پاسخ‌های دفاعی به بیماری غلاف برنج از طریق مسیر پیام وابسته به JA/ET نقش دارد (Wang et al., 2015). ژن *OsWRKY24* تنظیم‌کننده مثبتی است که در افزایش اندازه دانه از طریق طول شدن سلول‌ها نقش دارد (Jang and Li, 2018). بیان پیوسته ژن *WRKY30* در برنج، تجمع اسید جاسمونیک درونزاد، بیان ژن PR و مقاومت به عوامل بیماری‌زای قارچی را در برنج افزایش می‌دهد (Peng et al., 2012). همچنین *OsWRKY30* توسط MAP کینازها فعال می‌شود تا تحمل به خشکی را در برنج ایجاد کند (Shen et al., 2012). اجزای درگیر در مسیر پیام‌رسانی زخم و آسیب، *OsMCK4-OsMPK1-OsWRKY53* می‌توانند نقش مهمی در تنظیم ارتباط متقابل بین تنش غیر زیستی و زیستی داشته باشند (Yoo et al., 2014). افزایش بیان *WRKY89* در برنج، مقاومت در برابر اشعه ماوراء بنفش B و مقاومت در برابر بیماری را در گیاهان برنج افزایش می‌دهد (Wang et al., 2007).

گروه IIa (رنگ آبی): این گروه شامل ۶ عضو از

افزایش می‌دهد (Hwang et al., 2011).
OsWRKY51 در برنج به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت در پاسخ دفاعی در برابر *Xanthomonas oryzae pv oryzae* عمل می‌کند (Hwang et al., 2016).
 گروه IIe (رنگ بنفش): این گروه شامل ۱۱ عضو از خانواده پروتئینی WRKY در برنج ژاپونیکا است (شکل‌های ۱ و ۲-الف). بیان بالای *OsWRKY31* مقاومت در برابر بیماری را افزایش می‌دهد و می‌تواند در مسیر انتقال پیام اکسین عمل کند و باعث رشد ریشه و تشکیل ریشه‌های جانبی شود (Zhang et al., 2008). ماژول *OsWRKY80-OsWRKY4* به عنوان یک مدار تنظیم‌کننده مثبت در مقاومت برنج در برابر *Rhizoctonia solani* می‌باشد (Peng et al., 2016).

گروه III (رنگ سبز روشن): این گروه شامل ۵۳ عضو از خانواده پروتئینی WRKY در برنج ژاپونیکا است (شکل‌های ۱ و ۲-الف). ژن‌های گروه III نقش بسیار مهمی را در تک لپه‌ای‌ها بازی می‌کنند، این گروه از نظر تکاملی پیشرفته‌ترین گروه خانواده WRKY به حساب آمده و موجب سازگاری گیاه می‌شوند (Zhang and Wang, 2005).
OsWRKY74 در هسته و به‌طور عمده در ریشه و برگ بیان می‌شود و در تحمل تنش کمبود فسفات (Pi) نقش دارد. علاوه بر این، *OsWRKY74* ممکن است در پاسخ به کمبود آهن (Fe) و ازت (N) و همچنین تنش سرما در برنج نقش داشته باشد (Dai et al., 2015).
OsWRKY22، در پاسخ مقاومت در برابر بیماری بلس‌ت^۲ (*Magnaporthe grisea*) نقش دارد (Abbruscato et al., 2012)، و باعث تحمل آلومینیوم از طریق فعال‌سازی بیان *OsFRDL4* و افزایش ترشح سیترات در برنج *Oryza sativa* می‌شود (Li et al., 2018).

پاتوژن ایجاد کنند (Choi et al., 2020).
WRKY11 در مقاومت برنج در برابر عامل بیماریزا و تحمل به تنش خشکی نقش دارد (Lee et al., 2018). در تیمارهای تنش‌های زنده و غیرزنده، *OsWRKY23* به‌طور قابل‌توجهی توسط پیری برگ القاشونده با تاریکی مداوم^۱ و آلودگی توسط پاتوژن برنج *Pyricularia oryzae Cav* و همچنین اسید سالیسیلیک (SA) القا شد. در شرایط رشد طبیعی، *OsWRKY23* منحصراً در ریشه و برگ‌های پیر پدیدار می‌شود (Jing et al., 2009). فاکتور رونویسی *OsWRKY29* با کاهش واکنش اسید آبسزیک، خواب بذر را در برنج سرکوب می‌کند (Zhou et al., 2020). ژن‌های *OsWRKY36* و *OsWRKY102* رمزه مهارکننده‌های تشکیل دیواره ثانویه سلولی هستند و جهش در آنها موجب افزایش قابل‌توجهی در میزان لیگنین (تا ۲۸ و ۳۲ درصد) شد (Miyamoto et al., 2020).
OsWRKY67 به‌طور مثبت مقاومت اولیه و *XA21* را تنظیم می‌کند و یک کاندید امیدبخش برای بهبود ژنتیکی مقاومت به بیماری در برنج است (Vo et al., 2018).
 بیان ژن *OsWRKY72* در پیام اسید آبسزیک و مسیر انتقال اکسین Arabidopsis دخالت می‌کند (Song et al., 2010).

گروه IId (رنگ نارنجی): این گروه شامل ۲۲ عضو از خانواده پروتئینی WRKY در برنج ژاپونیکا است (شکل‌های ۱ و ۲-الف). این زیر گروه نقش مهمی در تحمل بیماری‌ها دارد. ژن *WRKY13* در تنظیم مقاومت در برابر آلودگی غلاف به قارچ در برنج *Oryza sativa* L مؤثر است (Lilly et al., 2018). بیان هترولوگ ژن *OsWRKY6* در Arabidopsis بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ دفاعی را فعال می‌کند و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا را

OsWRKY82 به هر دو تنش زنده و غیر زنده پاسخ می‌دهد و ممکن است در تنظیم پاسخ دفاعی به عوامل بیماری‌زا و تحمل در برابر تنش‌های غیر زنده توسط اسید جاسمونیک/ مسیر پیام‌رسانی وابسته به اتیلن نقش داشته باشد (Peng *et al.*, 2011).

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پروژه تحقیقاتی مصوب در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به شماره ۱۲-۰۵-۰۵-۱۱-۰۳۳-۹۵۰۶۰۷-۹۶ می‌باشد که بدین وسیله مورد تشکر و قدردانی قرار می‌گیرد.

REFERENCES

- Abbruscato P, Nepusz T, Mizzi L, Del Corvo M, Morandini P, Fumasoni I, Michel C, Paccanaro A, Guiderdoni E, Schaffrath U (2012) *OsWRKY22*, a monocot WRKY gene, plays a role in the resistance response to blast. *Molecular plant pathology*. 13 (8):828-841.
- Berri S, Abbruscato P, Faivre-Rampant O, Brasileiro AC, Fumasoni I, Satoh K, Kikuchi S, Mizzi L, Morandini P, Pè ME (2009) Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and Arabidopsis. *BMC plant biology*. 9 (1):1-22.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Francia E, Marè C, Tondelli A, Stanca AM (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field crops research*. 105 (1-2):1-14.
- Cowell IG, Skinner A, Hurst HC (1992) Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors. *Mol. cell. Biol*. 12: 3070-3077.
- Cheng H, Liu H, Deng Y, Xiao J, Li X, Wang S (2015) The *WRKY45-2 WRKY13 WRKY42* transcriptional regulatory cascade is required for rice resistance to fungal pathogen. *Plant Physiology*. 167 (3):1087-1099.
- Choi N, Im JH, Lee E, Lee J, Choi C, Park SR, Hwang DJ (2020) *WRKY10* transcriptional regulatory cascades in rice are involved in basal defense and Xa1-mediated resistance. *Journal of experimental botany*. 71(12):3735-3748.
- Dai X, Wang Y, Zhang WH (2015) *OsWRKY74*, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *Journal of Experimental Botany*. 67 (3):947-960.
- Eulgem TRP, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*.199-206.
- Hwang SH, Kwon SI, Jang JY, Fang IL, Lee H, Choi C, Park S, Ahn I, Bae Sc, Hwang DJ (2016) *OsWRKY51*, a rice transcription factor, functions as a positive regulator in defense response against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant cell reports*. 35 (9):1975-1985
- Hwang SH, Yie SW, Hwang DJ (2011) Heterologous expression of *OsWRKY6* gene in Arabidopsis activates the expression of defense related genes and enhances resistance to pathogens. *Plant Science*. 181 (3):316-323.

- Jang S, Li HY (2018) Overexpression of *OsAP2* and *OsWRKY24* in Arabidopsis results in reduction of plant size. *Plant Biotechnology*. 18.0508 a.
- Jimmy JL, Babu S (2019) Variations in the structure and evolution of Rice WRKY genes in Indica and japonica genotypes and their co-expression network in mediating disease resistance. *Evolutionary Bioinformatics*. 15:1176934319857720.
- Jing S, Zhou X, Song Y, Yu D (2009) Heterologous expression of *OsWRKY23* gene enhances pathogen defense and dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation*. 58 (2):181-190.
- Kim T, Kang K, Kim S-H, An G, Paek NC (2019) *OsWRKY5* promotes rice leaf senescence via senescence-associated NAC and abscisic acid biosynthesis pathway. *International journal of molecular sciences*. 20 (18):4437.
- Lee H, Cha J, Choi C, Choi N, Ji H-S, Park SR, Lee S, Hwang DJ (2018) Rice *WRKY11* plays a role in pathogen defense and drought tolerance. *Rice* 11 (1):1-12.
- Li GZ, Wang ZQ, Yokosho K, Ding B, Fan W, Gong QQ, Li GX, Wu YR, Yang JL, Ma JF (2018) Transcription factor *WRKY22* promotes aluminum tolerance via activation of *OsFRDL4* expression and enhancement of citrate secretion in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* . 219 (1):149-162.
- Li R, Zhang J, Li J, Zhou G, Wang Q, Bian W, Erb M, Lou Y (2015) Prioritizing plant defence over growth through WRKY regulation facilitates infestation by non-target herbivores. *Elife* 4:e04805.
- Lilly JJ, Subramanian B (2018) Gene network mediated by *WRKY13* to regulate resistance against sheath infecting fungi in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*. 280:269-282.
- Miyamoto T, Takada R, Tobimatsu Y, Suzuki S, Yamamura M, Osakabe K, Osakabe Y, Sakamoto M, Umezawa T (2020) Double knockout of *OsWRKY36* and *OsWRKY102* boosts lignification with altering culm morphology of rice. *Plant Science*. 296:110466.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in plant science*. 10 (2):79-87.
- Peng Xx, TANG Xk, ZHOU P, HU Yj, DENG Xb, Yan H, WANG Hh (2011) Isolation and expression patterns of rice *WRKY82* transcription factor gene responsive to both biotic and abiotic stresses. *Agricultural Sciences in China*. 10 (6):893-901.
- Peng X, Hu Y, Tang X, Zhou P, Deng X, Wang H, Guo Z (2012) Constitutive expression of rice *WRKY30* gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, PR gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. *Planta*. 236 (5):1485-1498.
- Peng X, Wang H, Jang JC, Xiao T, He H, Jiang D, Tang X (2016) *OsWRKY80-OsWRKY4* module as a positive regulatory circuit in rice resistance against *Rhizoctonia solani*. *Rice*. 9 (1):1-14.
- Peng Y, Bartley LE, Chen X, Dardick C, Chern M, Ruan R, Canlas PE, Ronald PC (2008) *OsWRKY62* is a negative regulator of basal and *Xa21*-mediated defense against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Molecular plant*. 1 (3):446-458.
- Pillai SE, Kumar C, Patel HK, Sonti RV (2018) Overexpression of a cell wall damage induced transcription factor, *OsWRKY42*, leads to enhanced callose deposition and tolerance to salt stress but does not enhance tolerance to bacterial infection. *BMC plant biology*. 18 (1):1-15.

- Qiu Y, Yu D (2009) Over-expression of the stress-induced *OsWRKY45* enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis. *Environmental and experimental botany*. 65 (1):35-47.
- Raineri J, Wang S, Peleg Z, Blumwald E, Chan RL (2015) The rice transcription factor *OsWRKY47* is a positive regulator of the response to water deficit stress. *Plant molecular biology*. 88 (4):401-413.
- Ross CA, Liu Y, Shen QJ (2007) The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Plant Biology*. 49 (6):827-842.
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. *Trends in plant science*. 15 (5):247-258.
- Shen H, Liu C, Zhang Y, Meng X, Zhou X, Chu C, Wang X (2012) *OsWRKY30* is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. *Plant molecular biology*. 80 (3):241-253.
- Singhal P, Jan AT, Azam M, Haq QMR (2016) Plant abiotic stress: a prospective strategy of exploiting promoters as alternative to overcome the escalating burden. *Frontiers in Life Science*. 9 (1):52-63.
- Song Y, Chen L, Zhang L, Yu D (2010) Overexpression of *OsWRKY72* gene interferes in the abscisic acid signal and auxin transport pathway of Arabidopsis. *Journal of biosciences*. 35 (3):459-471.
- Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*. 16 (2):123-132.
- Vo KT, Kim CY, Hoang TV, Lee SK, Shirsekar G, Seo YS, Lee SW, Wang GL, Jeon JS (2018) *OsWRKY67* plays a positive role in basal and *XA21*-mediated resistance in rice. *Frontiers in plant science*. 8:2220.
- Voorrips R (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of heredity*. 93 (1):77-78.
- Wang H, Hao J, Chen X, Hao Z, Wang X, Lou Y, Peng Y, Guo Z (2007) Overexpression of rice *WRKY89* enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant molecular biology*. 65 (6):799-815.
- Wang H, Meng J, Peng X, Tang X, Zhou P, Xiang J, Deng X (2015) Rice *WRKY4* acts as a transcriptional activator mediating defense responses toward *Rhizoctonia solani*, the causing agent of rice sheath blight. *Plant molecular biology*. 89 (1):157-171.
- Wang P, Xu X, Tang Z, Zhang W, Huang XY, Zhao FJ (2018) *OsWRKY28* regulates phosphate and arsenate accumulation, root system architecture and fertility in rice. *Frontiers in plant science*. 9:1330.
- Wu KL, Guo ZJ, Wang HH, Li J (2005) The WRKY family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins. *DNA research*. 12 (1):9-26.
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ (2005) Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant physiology*. 137 (1):176-189.
- Yamamoto T, Yoshida Y, Nakajima K, Tominaga M, Gyohda A, Suzuki H, Okamoto T, Nishimura T, Yokotani N, Minami E (2018) Expression of *RSOsPR10* in rice roots is antagonistically regulated by jasmonate/ethylene and salicylic acid via the activator *OsERF87* and the repressor *OsWRKY76*, respectively. *Plant direct* 2 (3):e00049.
- Yokotani N, Sato Y, Tanabe S, Chujo T, Shimizu T, Okada K, Yamane H, Shimono M, Sugano S, Takatsuji H (2013) *WRKY76* is a rice

- transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. *Journal of experimental botany* 64 (16):5085-5097.
- Yoo SJ, Kim SH, Kim MJ, Ryu CM, Kim YC, Cho BH, Yang KY (2014) Involvement of the *OsMKK4-OsMPK1* cascade and its downstream transcription factor *OsWRKY53* in the wounding response in rice. *The plant pathology journal*. 30 (2):168.
- Zhang J, Peng Y, Guo Z (2008) Constitutive expression of pathogen-inducible *OsWRKY31* enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants. *Cell Research*. 18 (4): 508-521.
- Zhang Y, Wang L (2005) The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC evolutionary biology* 5 (1):1-12.
- Zhou C, Lin Q, Lan J, Zhang T, Liu X, Miao R, Mou C, Nguyen T, Wang J, Zhang X (2020) WRKY Transcription Factor *OsWRKY29* Represses Seed Dormancy in Rice by Weakening Abscisic Acid Response. *Frontiers in Plant Science* 11:691.