

**ORIGINAL ARTICLE**

# Identification and analysis of miRNAs in various Thymus species

Aboozar Soorni\*, Sepehr Meratian Esfahani, Badraddin Ebrahim Sayed-Tabatabaei

Department of  
Biotechnology, College of  
Agriculture, Isfahan University of  
Technology, Isfahan, Iran.

**Correspondence**

Aboozar Soorni  
Email: [soorni@iut.ac.ir](mailto:soorni@iut.ac.ir)

**How to cite**

Soorni, A., Meratian Esfahani, S., & Sayed-Tabatabaei, B. E. (2023). Identification and analysis of miRNAs in various Thymus species. *Crop Biotechnology*, 12(43), 1-10.

**ABSTRACT**

Today, medicinal plants are used in the treatment of many diseases because of their secondary metabolites. Thyme as one of these plants contains a wide range of secondary metabolites such as terpenes. Various methods have been developed to increase these materials. In classical methods, environmental factors are changed to produce the most effective substance in medicinal plants, but in newer approaches that are based on plant genetics, higher yields are observed. One of these approaches is the use of miRNAs. These miRNAs control gene expression after transcription by mRNA analysis or inhibition of their translation, and play different roles in biological and metabolic processes in plants and animals. One of the simplest and least expensive methods for identifying miRNAs is the use of bioinformatics tools and methods. To identify distinct miRNA in different species of thyme, a study based on homology search was conducted using transcriptomic data of thyme. First, this information was refined and then alignment performed against all known miRNAs in the miRBase database. After screening of results based on factors such as length and e-value level, the secondary structure of miRNAs was analyzed with UNAFold tool. Target genes were identified using psRNATARGET tool and phylogenetic relationships were investigated using maximum likelihood method and RaxML tool. In total 64 distinct candidate's miRNAs were identified in different species of thymus and 14 miRNAs included miR172 and miR396 played an important role in terpenes synthesis and it has been proven in previous studies. The phylogenetic tree was able to show the relationship between miRNAs in different species.

**KEYWORDS**

Thyme, Bioinformatics, Terpenes, Secondary metabolites, NGS.

نشریه علمی

## زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

## شناسایی و تجزیه و تحلیل miRNAs در گونه‌های مختلف آویشن

ابوذر سورنی\*، سپهر مرآتیان اصفهانی، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی

گروه زیست‌فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

## چکیده

امروزه گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن متابولیت‌های مؤثر، در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه و استفاده همگان قرار گرفته‌اند. یکی از این گیاهان آویشن است که حاوی گستره وسیعی از متابولیت‌های ثانویه مانند ترپن‌ها می‌باشد. روش‌های مختلفی برای افزایش این مواد ابداع شده است. در روش‌های کلاسیک از تغییر عوامل محیطی جهت افزایش تولید ماده مؤثره استفاده می‌گردد. در حالی که در روش‌های نوین از دست‌ورزی‌های ژنتیکی که بازده بالاتری نیز دارند بهره گرفته می‌شود. از جمله این رویکردها استفاده از نقش و عملکرد miRNAs می‌باشد. این RNAs بیان ژن را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها کنترل کرده و نقش‌های متنوعی را در فرآیندهای بیولوژیکی و متابولیکی در گیاهان و جانوران بازی می‌کنند. روش‌های متعددی برای شناسایی miRNAs موجود می‌باشد که یکی از ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین آن‌ها، استفاده از ابزارها و روش‌های بیوانفورماتیکی است. لذا به منظور شناسایی miRNAs متمایز در گونه‌های مختلف آویشن، مطالعه‌ای مبتنی بر جستجوی همولوژی با استفاده از اطلاعات ترانسکریپتومی گیاه آویشن انجام گرفت. ابتدا این اطلاعات پالایش و سپس همدردی در برابر تمام miRNAs شناخته‌شده موجود در بانک اطلاعاتی miRBase انجام شد. بعد از غربالگری نتایج بر اساس شاخص‌هایی همچون طول و سطح e-value ساختار ثانویه miRNAs با ابزار UNAFold مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی ژن‌های هدف با استفاده از ابزار psRNATARGET و بررسی روابط فیلوژنتیکی به روش حداکثر احتمال و ابزار RaxML انجام شد. در مجموع ۶۴ miRNAs کاندید متمایز در گونه‌های مختلف آویشن شناسایی شدند که از این تعداد ۱۴ عدد در مسیر سنتز ترپن‌ها قرار داشتند. از مهم‌ترین این miRNAs می‌توان به miR172 و miR396 اشاره کرد که در مطالعات پیشین نقش آن‌ها در مسیر سنتز ترپنوئیدها به اثبات رسیده است. درخت فیلوژنتیک توانست ارتباط میان miRNAs در گونه‌های مختلف را به خوبی نشان دهد.

## واژه‌های کلیدی

آویشن، بیوانفورماتیک، ترپن‌ها، متابولیت‌های ثانویه، NGS.

نویسنده مسئول:

ابوذر سورنی

رایانامه: soomi@iut.ac.ir

استناد به این مقاله:

سورنی، ابوذر، مرآتیان اصفهانی، سپهر و سید طباطبایی، بدرالدین ابراهیم (۱۴۰۲). شناسایی و تجزیه و تحلیل miRNAs در گونه‌های مختلف آویشن. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۲)، ۱-۱۰.

## مقدمه

جنس آویشن (*Thymus*) در سال ۱۷۳۵ میلادی توسط لینه شناسایی و طبقه‌بندی شد. این جنس متعلق به خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) است که دارای ۲۰۰ جنس و بیش از ۸۰۰ گونه‌ی گیاهی می‌باشد. آویشن، گیاهی دولپه‌ای، چندساله با گل‌هایی به رنگ سفید تا ارغوانی است. کاسه‌ی گل در آویشن از کرک‌های غده‌ای حاوی اسانس پوشیده شده است (Morales, 2002). از این جنس ۱۴ گونه در ایران شناسایی شده که چهار گونه *Thymus. Thymus. persicus Thymus. armanicus* و *Thymus. lancifolius* و *Thymus. daenensis* بومی ایران هستند.

مواد شیمیایی تشکیل‌دهنده آویشن عمدتاً به دو گروه فلاونوئیدها و اسانس‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند. فلاونوئیدها شامل تیموسین<sup>۱</sup>، ایزوتیمونین<sup>۲</sup>، فلاونول‌ها<sup>۳</sup> و لوتئولین<sup>۴</sup> بوده و ترکیبات اصلی اسانس فرار در آویشن مونوترپن‌های آروماتیک هستند که شامل تیمول<sup>۵</sup>، کارواکرول<sup>۶</sup>، پی-سیمن<sup>۷</sup>، گاماترپین<sup>۸</sup> و کامفور<sup>۹</sup> می‌باشند. البته از سایر مواد تشکیل‌دهنده آویشن، می‌توان به تانن‌ها<sup>۱۰</sup> و رزمارینیک اسید نیز اشاره کرد (Behnia et al, 2008; Braga et al, 2008; Hummelbrunner et al, 2001; Isman, 2000; Ozguven and Tansi, 1998; Sedy and Koschier, 2003).

بنابراین، با توجه به نیاز روزافزون استفاده از گیاهان دارویی، روش‌ها و تکنیک‌های فراوانی در رابطه با تولید، کنترل و افزایش ماده‌ی مؤثر آن‌ها به وجود آمده است. محققین در روش‌های کلاسیک با افزایش ماده مغذی مورد نیاز گیاه و به‌طور کلی فراهم آوردن شرایط محیطی مناسب میزان ماده مؤثر این گیاهان را تغییر می‌دهند. روش‌های کلاسیک تا حدودی می‌توانند میزان تولید ماده مؤثر گیاه را تغییر دهند؛ اما به دلیل وقت‌گیر بودن، داشتن رویکرد آزمایشی و آماری (سعی و خطا) در طی مراحل و همچنین محدود بودن پتانسیل بهینه‌سازی شرایط محیطی، رویکردهای جدیدتری جایگزین روش‌های کلاسیک شدند.

نتایج مطالعات نشان می‌دهد عوامل مختلفی در کیفیت و کمیت مواد مؤثره گیاهان دارویی تأثیرگذار هستند. این عوامل را

می‌توان به دو دسته کلی درونی و بیرونی تقسیم کرد. عوامل بیرونی شامل شرایط آب و هوایی، تنوع جغرافیایی، تغییرات فصلی، نور، آلودگی، بیماری‌ها و عوامل خاکی است؛ اما عوامل تعیین‌کننده درونی اصولاً مبتنی بر ژنتیک گیاه هستند که در تقابل و تعامل با شرایط محیطی، فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و متابولیسمی را تنظیم می‌کنند (Srivastava, 2002)؛ این عوامل خود می‌توانند به پتانسیل ژنتیکی گیاه، سطح بیان ژن‌ها و تغییرات پس از بیان تقسیم شوند. علاوه بر پتانسیل ژنتیکی، میزان بیان ژن در تولید ماده مؤثره اهمیت فراوان دارد. میزان بیان یک ژن خود به عوامل مختلفی بستگی دارد، از جمله این عوامل می‌توان به تعداد نسخه‌های یک ژن اشاره کرد، هنگامی که تعداد کپی یک ژن بیشتر باشد بیان ژن مورد نظر افزایش خواهد یافت. همچنین وجود یک پروموتور قوی که در ارتباط با یک ژن است می‌تواند رونویسی آن ژن و در نهایت بیان ژن را افزایش دهد. عامل مهم دیگر در میزان بیان ژن‌ها، فاکتورهای رونویسی (TF) هستند. فاکتورهای رونویسی پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ی بیان هستند که به DNA متصل می‌شوند و تحت تأثیر عوامل مختلف مانند سیگنال‌های بین سلولی باعث کاهش و یا افزایش بیان ژن در طول زندگی یک سلول می‌شوند (Arora et al, 2013). یکی دیگر از عوامل که جز تغییرات پس از رونویسی قرار دارد، miRNAs می‌باشند که اثر قابل قبولی در کاهش و یا افزایش میزان ماده مؤثره گیاهان دارند. در واقع miRNAs، مولکول‌های RNA حفاظت‌شده‌ی غیر کد کننده و تک‌رشته‌ای کوتاهی به طول ۱۶ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که از طریق کنترل بیان ژن‌های مختلف به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ها بعد از رونویسی شناخته می‌شوند. در گیاهان miRNAs در فرآیندهای مختلفی از جمله رشد و نمو، متابولیسم، مورفوژنز، انتقال سیگنال، تعیین زمان گلدهی و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده دخیل هستند (Davison et al, 2006). miRNAs تقریباً یک درصد ژنوم را در برمی‌گیرند اما هرکدام از آن‌ها صدها ژن را مورد هدف می‌دهند (Bentwich et al, 2005; Lim et al, 2003).

این miRNAs بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها، کنترل می‌کنند (و Vahid et al, 2010). رونوشت‌های اولیه miRNA طی دو مرحله پردازش تبدیل به مولکول بالغ کوتاه‌تر می‌شوند. ابتدا miRNAs در هسته سلول از روی نواحی بین ژنی یا درون ژنی به‌وسیله RNA پلیمراز II به فرم miRNA اولیه (pri-miRNA) با طول ۱ تا ۳ کیلو باز، رونویسی می‌شوند. در ادامه این pri-miRNAs در

1. Thymosin
2. Isotimonin
3. Flavonols
4. Luteolin
5. Thymol
6. Carvacrol
7. P.cymene
8.  $\gamma$ .Terpinene
9. Camphor
10. Tanan

عملکردی مهم در طول این تنش‌ها بودند ( Pegler *et al.*, 2019). نجاجی و همکاران miRNAs را شناسایی کرد که سطح آن‌ها در اثر کمبود شدید آب در *Tripogon loliiformis* گیاهی که می‌تواند از حالت خشک شده دوباره زنده شود، تغییر می‌کند (Njaci *et al.*, 2018). مطالعات گسترده‌ای بروی نقش و عملکردی بسیاری از متابولیت‌های ثانویه انجام شده است. از جمله این مطالعات که توسط یو زی-ایکس و همکارانش انجام شده نشان داد بیان بیش از حد mir156 با اثر بروی فاکتور رونویس SPL اثر مستقیم بروی کاهش سنتز ترپن‌ها به خصوص سسکوئی‌ترین‌ها موجود در آرابیدوپسیس دارد ( Gou *et al.*, 2011). مطالعات صورت گرفته بروی زنجبیل توسط نوپور سنگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر تنظیمی miRNAs مانند miR5021 و miR805 بر پیش‌سازهای ترپن‌های را به اثبات رساند (Singh *et al.*, 2016). ژائو و یانگ در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که برخی از miRNAs بر فاکتورهای رونویسی مسیر ترپن‌ها مانند mir3632 بر MYC2 و miR33418 بر MYB در چای اثر مستقیم دارند ( Zhao *et al.*, 2018).

### روش شناسایی پژوهش

اطلاعات ترنسکرپتومی مربوط به گونه‌های مختلف آویشن حاصل از توالی یابی ترنسکرپتوم بافت برگ گونه‌های آویشن *T. persicus*, *T. vulgaris*, *T. daenensis*, *T. aremeniacus*, *T. lancifolius*, *T. pubescens* به ترتیب با ۶۰/۹۸، ۶۴/۹۹، ۶۱/۸۱، ۶۲/۲۰ و ۶۵/۸۵ میلیون خوانش به کمک دستگاه Illumina HiSeq 4000 در مطالعه سورنی و همکاران (۲۰۱۹)، از بانک اطلاعاتی NCBI به شماره دسترسی PRJNA481444 دریافت شد (Soorni *et al.*, 2019).

### کنترل کیفیت و سرهم‌بندی قرائت‌ها

کنترل و کیفیت خوانش‌های خام حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار FastQC انجام شد ( Aparicio-Puerta *et al.*, 2020). به منظور کاهش خطای خوانش حاصل از وجود توالی‌های آداپتورها و حذف توالی بی کیفیت از Trimmomatic استفاده شد ( Bolger *et al.*, 2014). جهت سرهم‌بندی توالی‌ها از نرم‌افزارهای Trinity و rnaSPades استفاده شد ( Grabherr *et al.*, 2011). در نهایت جهت حذف توالی‌های تکراری از نرم‌افزار cd-hit-est با مقادیر پیشفرض استفاده شد (Badapanda and Rathore, 2018).

هسته به ساختارهای ساقه حلقه با طول تقریبی ۷۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید که pre-miRNA نامیده می‌شوند، شکسته می‌شوند (Bartel, 2004). در نهایت این ساختار مجدد دستخوش تغییر قرار گرفته و یک miRNAs بالغ به طول ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید حاصل می‌شود ( Millar, 2005; Zhang *et al.*, 2018, and Waterhouse).

مکانیسم‌ها عمل miRNAs به دو صورت است: در حالت اول miRNA بالغ به mRNA می‌چسبد و با ایجاد ساختار ۲ رشته‌ای باعث تجزیه mRNA می‌شود. در این حالت جفت‌شدگی کامل بین miRNA و mRNA هدف ایجاد می‌شود. در حالت دوم کمپلکس miRNA به همراه RISC به‌عنوان یک سرکوبگر و یا یک ممانعت کننده عمل می‌کند و مانع ترجمه mRNA در ریبوزوم می‌شود، در این حالت بین miRNA و توالی هدف آن اتصال ناقص وجود دارد ( Zhang *et al.*, 2006). با توجه به اهمیت شناسایی miRNAs در گیاهان و عدم وجود مطالعه و تحقیقی در این زمینه در گیاه آویشن، در این مطالعه از اطلاعات ترنسکرپتومی چند گونه مختلف آویشن با کمک ابزارهای بیوانفورماتیک برای شناسایی miRNA استفاده شد و در نهایت پیشبینی عملکرد آن‌ها در مسیرهای مختلف بیولوژیکی این گیاه نیز مورد بررسی قرار گرفت.

### پژوهش

مولکول‌های miRNA اولین بار توسط لی و همکاران در سال ۱۹۹۳ در *caenorhabditis elegans* هنگام بررسی کاهش سطح پروتئین LIN-4 که در مرحله‌ای از پیشرفت لاروی از مرحله L1 به L2 ضروری بود گزارش شد (Lee *et al.*, 2003). ابتدا تصور می‌شد این روش تنظیم بیان ژنی پدیده‌ای منحصر به *C. elegans* است، اما در سال‌های بعد اولین miRNAs گیاهی در سال ۲۰۰۲ در آرابیدوپسیس شناسایی شدند. مطالعات بعدی روی miRNAs در گیاهان اثر کنترلی آن‌ها روی رشد برگ و گل را اثبات کرد ( Aukerman and Sakai, 2003; Palatnik *et al.*, 2003). در سال‌های بعد از اطلاعات ترنسکرپتومی جهت شناسایی miRNAs استفاده شد. پلگر و همکاران از اطلاعات ترنسکرپتومی برای تعیین فراوانی miRNAs در آرابیدوپسیس تحت شرایط گرما، خشکسالی و تنش شوری استفاده کردند. این بررسی بسیاری از miRNAs را با تغییرات ساختاری در سطح بالا در این شرایط شناسایی کرد. در واقع محققین در این مطالعه miRNAs را شناسایی کردند که کاندیدای ایفای نقش‌های

mature جمع‌آوری شده و سپس با کمک ابزار MUSCEL هم‌ردیف شدند. نتیجه حاصل شده به‌عنوان ورودی اولیه برای ساخت درخت تبارزایی استفاده شد (Barik *et al*, 2014). درخت تبارزایی با استفاده از maximum likelihood با maximum bootstrap ۵۰۰ به کمک ابزار RaxML تولید شد (Stamatakis, 2014).

### یافته‌های پژوهش

#### نتایج سرهم‌بندی قرائت‌ها و بررسی کیفیت آن

به‌طور کلی، شاخص‌های مختلفی برای ارزیابی کیفیت سرهم‌بندی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، شمار کانتیگ‌ها (شمار ترانسکرپت‌های پیش‌بینی شده) و اندازه کل سرهم‌بندی‌ها به‌عنوان مهم‌ترین معیارها مورد بررسی قرار گرفتند. در اکثر نمونه‌ها بیشترین تعداد کانتیگ (دامنه از ۸۵۰۷۸ تا ۱۳۱۶۵۷) و اندازه کل سرهم‌بندی توسط نرم‌افزار Trinity حاصل شد. درحالی‌که تعداد کانتیگ‌های شناسایی شده توسط نرم‌افزار maSPades (دامنه از ۵۷۸۳۵ تا ۱۰۸۶۳۰) کمتر از ابزار Trinity بود. اندازه کل ترانسکرپتوم به‌دست آمده نیز تفاوت معنی‌داری با ابزار Trinity داشت. در اغلب موارد شمار بالای کانتیگ‌های به‌دست آمده، تکه‌تکه<sup>۲</sup> بودن ترانسکرپتوم مرجع و شباهت بالای بسیاری از ترانسکرپت‌ها را نشان می‌دهد. این در حالی است که گاهاً افزایش اندازه‌ی کل، باعث ایجاد یک سرهم‌بندی پیوسته‌تر با پوشش بیشتر می‌شود.

افزایش شمار کانتیگ‌ها می‌تواند به علت وجود خطاهای توالی‌یابی و عدم هم‌پوشانی قطعات به وجود آید. از طرف دیگر سطح بیان ژن‌ها در اطلاعات ترانسکرپتومی، تأثیر بسزایی روی تعداد کانتیگ‌های حاصل از سرهم‌بندی دارد. در واقع ابزارهایی که سرهم‌بندی را از ترانسکرپت‌هایی با بیان بالا ایجاد می‌کنند، سرهم‌بندی پیوسته‌تر با اندازه بزرگ‌تر را تولید می‌کنند.

### انجام blast برای شناسایی miRNAs، غربالگری و بررسی ساختار ثانویه

شناسایی miRNAs با استفاده از بلاست ترانسکرپتوم حاصل از خروجی cd-hit در مقابل اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی miRbase انجام شد. برای این کار از مجموعه blastall و ابزار Blastn استفاده شد (گرایهر، هاس و یاسور، ۲۰۱۱). نتایج حاصل از بلاست، بر اساس درصد ۹۵-۱۰۰، طول هم‌ردیفی ۲۰-۲۳، حداکثر عدم تطابق ۴، گپ صفر و E.value<sup>۵</sup> ۱۰<sup>-۵</sup> غربالگری شدند و نتایج دارای مقادیر پایین‌تر از شاخص‌های تعریف شده حذف شدند (Zhang *et al*, 2018). جهت بررسی ساختار ثانویه، ۲۰۰ نوکلئوتید در بالادست نقطه شروع و ۲۰۰ نوکلئوتید در پایین دست نقطه‌ی پایان miRNA بالغ با استفاده از ابزار Bedtools جداسازی شد. کمترین جایگاه در بالادست نوکلئوتید شماره ۱ توالی در نظر گرفته شد و در پایین دست با توجه به طول مخصوص هر توالی بیشترین مقدار ممکن در نظر گرفته شد (Quinlan, 2014). بعد از انجام Blastx جهت حذف توالی‌های کد کننده، ساختار ثانویه ترانسکرپت‌های باقی مانده مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ساختار ثانویه با کمک نرم‌افزار UNAFold (http://www.unafold.org) انجام شد. در این نرم‌افزار به‌صورت پیش فرض میزان درصد بازهای نوکلئوتیدی A و U محاسبه شده و همچنین میزان MFE کمتر از -۲۰ kcal/mol حذف می‌شود. همچنین جهت بررسی مجدد ساختار ثانویه (ساقه-حلقه) miRNA از اسکریپت<sup>۱</sup> SUMirfind، SUMirFold نیز استفاده شد. این اسکریپت به همراه unafold و پکیج‌های مورد نیاز آن‌ها به‌طور صحیح گزینش مناسب را انجام می‌دهند (Alptekin *et al*, 2017). بعد از شناسایی نواحی گزینش‌شده‌ی مورد نظر از bedtools برای جداسازی توالی از روی داده‌های ترانسکرپتوم استفاده شد.

### شناسایی ژن‌های هدف و ساخت درخت تبارزایی

به‌منظور شناسایی ژن‌های هدف از ابزار psRNATARGET استفاده شد (Dai *et al*, 2018). در این آنالیز توالی miRNAs با توالی مسیرترین‌ها مقایسه شدند. برای ساخت درخت تبارزایی، تمام miRNAs شناسایی شده به‌صورت

جدول ۱. خوانش‌های چپ و راست، قبل از فرآیند حذف

گونه	<i>T. armeniacus</i>	<i>T. lancifolius</i>	<i>T. persicus</i>	<i>T. pubescens</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. daenensis</i>
شمار خوانش‌ها قبل از فیلتر	۱۲۷۶۶۰۶۰۰	۶۵۸۵۹۴۵۶	۶۱۸۱۰۳۴۴	۶۲۲۰۹۱۱۸	۶۴۹۹۷۲۳۳۲	۶۰۹۸۲۳۱۲

گونه‌ها مطلوب‌تر است، به همین علت در مراحل بعدی آنالیزها، از سرهم‌بندی‌های حاصل از Trinity استفاده شد.

### نتایج حاصل از cd-hit، بلاست و بررسی ساختار ثانویه

برای حذف توالی‌های تکراری از ابزار cd-hit-est برای هرگونه استفاده شد. به‌طور کلی تعداد توالی‌های خوشه‌بندی شده دامنه‌ای بین ۸۵۰۷۸ متعلق به گونه‌ی *T. persicus* تا ۱۳۱۶۵۷ متعلق به گونه‌ی *T. daenensis\_M* داشتند. بیشترین و کمترین میزان کاهش در تعداد توالی‌ها به ترتیب متعلق به گونه‌های *T. armeniacus* و *T. persicus* بودند.

نتایج حاصل از بلاست نوکلئوتیدی بین توالی‌های گونه‌های مختلف آویشن و تمام miRNAs شناخته‌شده موجود در پایگاه داده mirBase نشان دهنده وجود ۱۳۹ تا ۲۹۸ miRNAs احتمالی در گونه‌های مختلف بود.

در گونه *T. armeniacus*، miRNAs متعلق به ۵ خانواده ژنی شامل (miR167، miR164، miR156، miR160، miR172) یافت شدند. همچنین یافته‌ها نشان داد که تعداد miRNAs در مرحله بلاست از ۲۹۸ عدد به ۱۶ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه کاهش یافت.

برای اکثر نمونه‌ها (به‌استثناى گونه *T. daenensis*)، بیش‌ترین مقدار  $N_{50}$  و بالاترین طول میانگین کانتیگ‌ها توسط نرم‌افزار Trinity تولید شد. از نظر تئوری، سرهم‌بندی‌های بهتر می‌بایست کانتیگ‌های طویل‌تر با ارزش  $N_{50}$  بالاتر داشته باشند. البته اهمیت پارامتر  $N_{50}$  هنوز مورد بحث بسیاری از محققین است، چرا که  $N_{50}$  بزرگ‌تر لزوماً به معنی تولید سرهم‌بندی بهتر نیست و ممکن است نشان‌دهنده‌ی کایمریسم<sup>۱</sup> (ادغام دو یا تعداد بیشتری ترانسکرپت در یک کانتیگ در طول سرهم‌بندی) بالاتر باشد، اما مطالعات قبلی نشان داده است که  $N_{50}$  بالاتر می‌تواند به‌طور مصنوعی منعکس‌کننده‌ی کیفیت بالای سرهم‌بندی باشد. در تفسیر نتایج سرهم‌بندی، هم‌ردیفی بیش از ۹۱ درصد خوانش‌ها به ترانسکرپتوم مرجع نشان‌دهنده‌ی کیفیت مطلوب ترانسکرپتوم‌های حاصل از سرهم‌بندی است.

به علت وجود مشکلات و خطاهای مختلف در زمینه‌ی سرهم‌بندی که به دلایل مختلفی از جمله، تکه‌تکه بودن خوانش‌ها، و حضور ایزوفرم‌ها رخ می‌دهد، در مطالعات مختلف، بر اساس نوع هدف و گونه یا جنس گیاه مورد مطالعه، سرهم‌بندی به‌دست‌آمده توسط یکی از این نرم‌افزارهای موجود انتخاب می‌شود. در این مطالعه چنین به نظر می‌رسد که نتایج نرم‌افزار Trinity در اکثر

جدول ۲. نتایج حاصل از Trinity و maSPades

ابزارها	اندازه‌ی Kmer	گونه‌ها	شمار کانتیگ‌ها	طول میانگین (bp)	حداقل طول (bp)	حداکثر طول (bp)	مجموع بازها
Trinity	25	<i>T. armeniacus</i>	126163	1011.870358	201	20222	127660600
		<i>T. daenensis</i>	89972	708.6183924	201	14381	63755814
		<i>T. daenensis_M</i>	131657	942.9280023	201	12209	124143072
		<i>T. lancifolius</i>	129683	689.8232922	201	11739	89458354
		<i>T. persicus</i>	85078	798.4041938	201	12221	67926632
		<i>T. pubescens</i>	85867	699.796243	201	11713	60089404
		<i>T. vulgaris</i>	116275	683.4869834	201	12233	79472449
maSPades	25	<i>T. armeniacus</i>					
		<i>T. daenensis</i>	108630	740.4439658	49	14853	80434428
		<i>T. daenensis_M</i>	108630	740.4439658	49	14853	80434428
		<i>T. lancifolius</i>	80601	609.0374561	79	39310	49089028
		<i>T. persicus</i>	59134	720.6155849	188	20536	42612882
		<i>T. pubescens</i>	57835	645.8514394	84	13832	37352818
		<i>T. vulgaris</i>	72874	618.8600598	74	12663	45098808

دیگر از miRNAs همانند mir172 فقط در ۱ گونه شناسایی شدند.

### جدول ۳. کلی نتایج حاصل از آنالیز miRNAs بدست آمده در مسیر ترپنیدها

نام میکرو. آران. ای	گونه‌ی هدف	مسیر شناسایی شده
miR12112	<i>T. daenensis</i>	DXR
miR12112	<i>T. daenensis</i>	ISPG
miR12112	<i>T. daenensis_M</i>	DXR
miR12112	<i>T. lancifolius</i>	DXR
miR12112	<i>T. lancifolius</i>	GDS
miR12112	<i>T. lancifolius</i>	ISPH
miR12112	<i>T. vulgar</i>	DXR
miR12112	<i>T. vulgar</i>	DXS
miR171	<i>T. daenensis</i>	DXS
miR171	<i>T. daenensis_M</i>	DXS
miR171	<i>T. lancifolius</i>	DXS
miR159	<i>T. daenensis_M</i>	DXS
miR159	<i>T. daenensis_M</i>	GGPPS
miR159	<i>T. vulgar</i>	DXS
miR159	<i>T. vulgar</i>	GGPPS
miR160	<i>T. daenensis</i>	ISPG
miR160	<i>T. daenensis</i>	GGPPS
miR160	<i>T. pubescense</i>	ISPG
miR160	<i>T. pubescense</i>	GGPPS
miR160	<i>T. pubescense</i>	DXS
miR408	<i>T. persicus</i>	ISPF
miR408	<i>T. lancifolius</i>	IDL
miR172	<i>T. armeniacus</i>	ISPF
miR172	<i>T. armeniacus</i>	ISPD
miR172	<i>T. armeniacus</i>	DXR
miR164	<i>T. daenensis_M</i>	ISPG
miR397	<i>T. daenensis_M</i>	GDS
miR397	<i>T. daenensis_M</i>	DXS
miR397	<i>T. daenensis_M</i>	ISPH
miR169	<i>T. daenensis_M</i>	GDS
miR169	<i>T. daenensis_M</i>	ISPH
miR399	<i>T. daenensis_M</i>	GDS
miR396	<i>T. persicus</i>	GGPPS
miR396	<i>T. persicus</i>	DXS
miR396	<i>T. persicus</i>	DXR
miR11604	<i>T. vulgar</i>	ISPD
miR11604	<i>T. vulgar</i>	CML
miR395	<i>T. vulgar</i>	CML

### بررسی درخت فیلوژنتیکی

با توجه به نتایج حاصل از نرم افزار RaxML، بیشترین فاصله بین miR12112 با miR169 و miR399 بود. کمترین اختلاف تبارزایی متعلق به miR12112 متعلق به گونه‌های *T. vulgar*، *T. daenensis* بودند که البته اختلاف قابل توجهی نسبت به miR12112 موجود در گونه *T. lancifolius* نشان داد. همچنین miR159 از گونه‌ی *T. vulgar* با miR397 از گونه *T. danensis* نیز شباهت بالایی نشان داد.

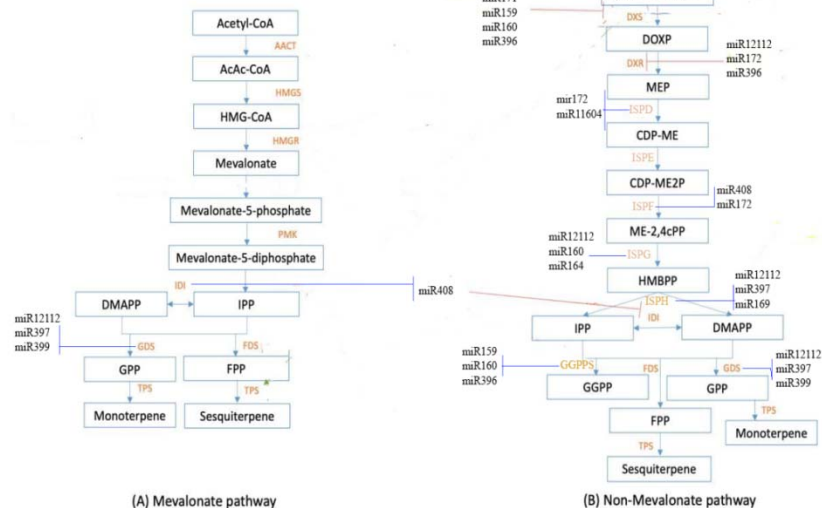
عامل اصلی این تغییرات حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE)، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده (AMFE) و میزان شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) هستند. در گونه *T. daenensis*، تعداد miRNAs از ۱۶۱ عدد به ۴ عدد در مرحله گزینش ساختار مناسب ساقه-حلقه کاهش یافت که این ۴ miRNAs متعلق به ۳ خانواده (miR171، miR160 و miR12112) بودند. در گونه *T. daenensis\_M* تعداد miRNAs از ۲۸۳ عدد در مرحله بلاست به ۱۳ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه کاهش یافت که شامل ۸ خانواده مختلف (miR397، miR171، miR169، miR164، miR159، miR160، miR399 و miR12112) بودند. در گونه *T. lancifolius* تعداد miRNAs از ۱۹۴ عدد در مرحله بلاست به ۱۰ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه رسید که شامل ۵ خانواده (miR171، miR156، miR408، miR399، miR12112) بود. در گونه *T. persicus* تعداد miRNAs از ۱۵۵ عدد در مرحله بلاست به ۳ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه تقلیل یافت که شامل ۳ خانواده (miR408، miR394، miR396) بودند. در گونه *T. pubescense*، miRNAs متعلق به ۲ خانواده ژنی شامل (miR160، miR156) یافت شدند. همچنین یافته‌ها نشان داد که تعداد miRNAs در مرحله بلاست از ۱۳۹ به ۴ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه کاهش یافت. و در نهایت در گونه *T. vulgar*، miRNAs متعلق به ۷ خانواده (miR160، miR156، miR159، miR11604، miR12112، miR395، miR408) یافت شدند. تعداد miRNAs در این گونه در مرحله بلاست ۱۷۳ و در بررسی ساختار ثانویه ۱۴ عدد بود.

### نتایج حاصل از psRNA target

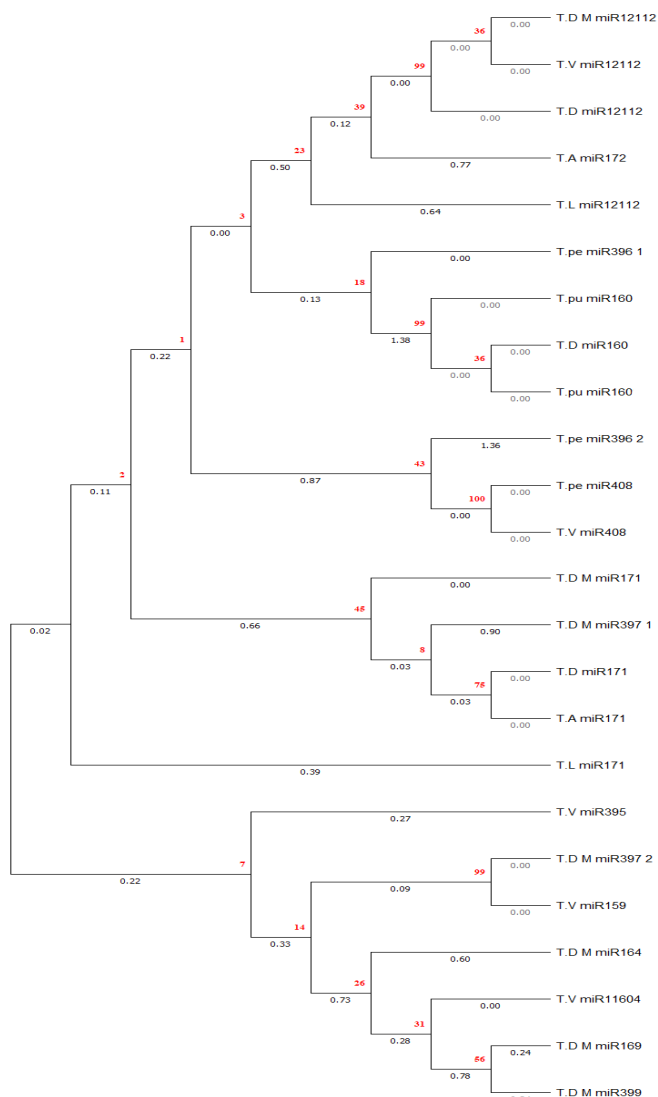
در مرحله آخر ژن‌های هدف تمام miRNAs پیشنهادی که ساختار ساقه-حلقه مناسب داشتند با کمک نرم‌افزار psRNA target در برابر توالی ژن‌های شناسایی شده مسیر ترپن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. به طور کلی ۱۴ miRNAs از خانواده‌های مختلف در ۶ گونه آویشن در مسیر سنتز ترپن‌ها یافت شدند.

اطلاعات نشان داد برخی از miRNAs شناسایی شده مانند miR12112، miR171، miR408، miR159 و miR160 در چندین گونه مشترک است در حالی که برخی

Involvement of miRNAs in Terpenoid Biosynthesis



شکل ۱. miRNAs شناسایی شده در مسیرهای بیوسنتزی ترپن‌ها. ژن‌های هدف به رنگ قرمز و miRNAs کاندید شناسایی شده برای هر ژن به رنگ مشکی در مقابل نام ژن ذکر شده است



شکل ۲. درخت تبارزایی miRNAs شناسایی شده در مسیر ترپن‌ها به روش حداکثر احتمال با استفاده از ابزار RaxML



گونه‌های مختلف آویشن، کنترل کیفیت آن‌ها با ابزار FastQC، و سرهمبندی با استفاده از Trinity، شناسایی miRNAs انجام شد. در مراحل بعدی blastn بین داده‌های ترانسکریپتومی و تمام miRNAs بالغ شناسایی شده موجود در سایت miRBase انجام شد. در مراحل بعدی ساختار ثانویه به منظور انتخاب و شناسایی ساختار ساقه-حلقه miRNAs به کمک ابزارهای UNAFold، SUMirFind و SUMirFold انجام شد که منجر به شناسایی miRNAs گیاه آویشن شد. در این پژوهش علاوه بر شناسایی miRNAs مختلف، سنجشی برای دخیل بودن miRNAs در مسیرهای سنتزی شناسایی شده‌ی ترپن‌ها به کمک ابزار psRNA target صورت گرفت. نتایج نشان داد که ۱۴ miRNAs از خانواده‌های ژنی مختلف در مسیرهای سنتزی ترپن‌ها نقش دارند. همچنین تعدادی از miRNAs شناسایی شده در گونه‌های مختلف باهم مشترک بوده‌اند. بعد از انجام آنالیزهای مورد هدف این مطالعه برای درک و شناسایی روابط تبارزایی بین miRNAs شناسایی شده در گونه‌های مختلف آویشن دخیل در مسیرهای سنتزی ترپن‌ها درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد.

## References

- Alptekin, B., Akpınar, B. A., & Budak, H. (2017). A comprehensive prescription for plant miRNA identification. *Frontiers in plant science*, 7, 2058.
- Aparicio-Puerta, E., Gómez-Martín, C., Giannoukagos, S., Medina, J. M., Marchal, J. A., & Hackenberg, M. (2020). mirnaQC: a webserver for comparative quality control of miRNA-seq data. *Nucleic acids research*, 48(W1), W262-W267.
- Arora, S., Rana, R., Chhabra, A., Jaiswal, A., & Rani, V. (2013). miRNA-transcription factor interactions: a combinatorial regulation of gene expression. *Molecular genetics and genomics*, 288, 77-87. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00438-013-0734-z>
- Aukerman, M. J., & Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell*, 15(11), 2730-2741.
- Badapanda, C., & Rathore, A. (2018). Discovering microRNAs and their targets in the red flour beetle *Tribolium castaneum* from expressed sequence tags. *Meta Gene*, 17, 61-67.

به طور کلی نتایج حاصل را می‌توان به ۵ زیرگروه تقسیم کرد: گروه اول شامل؛ miR1212 متعلق به گونه‌های *T. daenensis* و *T. vulgaris* و همچنین miR172 متعلق به گونه‌های *T. armeniacus* است که اختلاف جزئی با miR12112 دارد که همانطور که ذکر شد با دوگونه باغی و دنیایی اختلاف معنی‌داری دارد. در گروه دوم مشخص شد که miR396\_1 متعلق به آویشن ایرانی بیشترین شباهت را به miR160 موجود در سایر گونه‌ها دارد. نکته حائز اهمیت این است که miR396\_2 متعلق به آویشن ایرانی بیشتر شبیه به miR408 موجود در سایر گونه‌ها است.

## نتیجه‌گیری

هدف اولیه این پژوهش شناسایی miRNAs موجود در گونه‌های مختلف آویشن بومی ایران با کمک اطلاعات ترانسکریپتومی موجود بود. لذا در این مطالعه بعد از جمع‌آوری اطلاعات اولیه ترانسکریپتومی

- Barik, S., SarkarDas, S., Singh, A., Gautam, V., Kumar, P., Majee, M., & Sarkar, A. K. (2014). Phylogenetic analysis reveals conservation and diversification of micro RNA166 genes among diverse plant species. *Genomics*, 103(1), 114-121.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297.
- Behnia, M., Haghghi, A., Komeylizadeh, H., Tabaei, S.-J. S., & Abadi, A. (2008). Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. *The Korean journal of parasitology*, 46(3), 153.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., & Meiri, E. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics*, 37-770-766,(7).
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Braga, P. C., Culici, M., Alfieri, M., & Dal Sasso, M. (2008). Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 31(5), 472-477.
- Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis

- server (2017 release). *Nucleic acids research*, 46(W1), W49-W54.
- Davison, T. S., Johnson, C. D., & Andruss, B. F. (2006). [2] Analyzing MicroRNA Expression Using Microarrays. *Methods in enzymology*, 411, 14-34.
- Gou, J.-Y., Felippes, F. F., Liu, C.-J., Weigel, D., & Wang, J.-W. (2011). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor. *The Plant Cell*, 23(4), 1512-1522.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., & Zeng, Q. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29(7), 644-652.
- Hummelbrunner, L. A., & Isman, M. B. (2001). Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 49(2), 715-720.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19 (8-10), 603-608.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, 75(5), 843-854.
- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science*, 299(5612), 1540-1540.
- Millar, A. A., & Waterhouse, P. M. (2005). Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Functional & integrative genomics*, 5, 129-135.
- Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. *Thyme: the genus Thymus*, 1, 1-43.
- Njaci, I., Williams, B., Castillo-González, C., Dickman, M. B., Zhang, X., & Mundree, S. (2018). Genome-wide investigation of the role of microRNAs in desiccation tolerance in the resurrection grass *Tripsacum daniellii*. *Plants*, 7(3), 68.
- ÖZGÜVEN, M., & Tansi, S. (1998). Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. *Turkish journal of agriculture and forestry*, 22(6), 537-542.
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425(6955), 257-263.
- Pegler, J. L., Oultram, J. M. J., Grof, C. P. L., & Eamens, A. L. (2019). Profiling the Abiotic Stress Responsive microRNA Landscape of Arabidopsis thaliana. *Plants (Basel)*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/plants8030058>
- Quinlan, A. R. (2014). BEDTools: the Swiss Army tool for genome feature analysis. *Current protocols in bioinformatics*, 47(1), 11.12. 11-34.11.12.
- Roselló, J. A. E. (1981). Cytotaxonomic and evolutionary studies in "Thymus" ("Labiatae"): relationships of the members of section "Thymus" Jalas. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*.
- Sedy, K., & Koschier, E. (2003). Bioactivity of carvacrol and thymol against *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci*. *Journal of Applied Entomology*, 127(6), 313-316.
- Singh, N., Srivastava, S., & Sharma, A. (2016). Identification and analysis of miRNAs and their targets in ginger using bioinformatics approach. *Gene*, 575(2), 570-576.
- Soorni, A., Borna, T., Alemardan, A., Chakrabarti, M., Hunt, A. G., & Bombarely, A. (2019). Transcriptome landscape variation in the genus *Thymus*. *Genes*, 10(8), 620.
- Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. Elsevier.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(11), 1231-1243.
- Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*, 46(2), 243-259.
- Zhang, Y., Yun, Z., Gong, L., Qu, H., Duan, X., Jiang, Y., & Zhu, H. (2018). Comparison of miRNA evolution and function in plants and animals. *Microrna*, 7(1), 4-10.
- Zhao, S., Wang, X., Yan, X., Guo, L., Mi, X., Xu, Q., Zhu, J., Wu, A., Liu, L., & Wei, C. (2018). Revealing of microRNA involved regulatory gene networks on terpenoid biosynthesis in *Camellia sinensis* in different growing time points. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 66(47), 12604-12616.

**ORIGINAL ARTICLE**

# Identification of *HSP60* family gene in the soybean genome and their functional analysis in response to abiotic stresses

Samira Mohammadi\*

Department of Plant Breeding. Faculty of Agricultural Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU). Sari, Iran.

**Correspondence**

Samira Mohammadi  
Email: [s.mohamadi@stu.sanru.ac.ir](mailto:s.mohamadi@stu.sanru.ac.ir)

**How to cite**

Mohammadi, S. (2023). Identification of *HSP60* family gene in the soybean genome and their functional analysis in response to abiotic stresses. *Crop Biotechnology*, 12(43), 11-28.

**ABSTRACT**

60 kDa heat shock proteins (HSP60s) also known as chaperonin (cpn60) play an important role in plant growth and stress response. In this study, 32 *HSP60* genes were identified in the soybean genome through bioinformatics tools, which are distributed on 14 chromosomes. Most of these proteins are hydrophilic, acidic, and unstable with a high aliphatic index. The evolutionary tree divided HSP60 proteins of soybean, Arabidopsis, and rice into three main groups based on their cellular location. The proteins of different subgroups have highly conserved gene structure, conserved motifs, intron phase, and three-dimensional structure, which can indicate their functional similarities in different subgroups. Several cis-regulatory elements responsive to stresses, growth and hormones were found in the promoter of *GmHSP60* genes, that indicate their role in plant growth and response to environmental stresses. Gene ontology (GO) analysis predicted that *GmHSP60* genes were responsible for protein folding and refolding in an ATP-dependent manner in response to various stresses. Analysis of the transcriptome pattern (RNA-seq) showed that most of the *GmHSP60* genes had high expression in response to salt, drought, cold, heat, submergence, and nutrient deficiency stresses, which indicates their role in improving soybean tolerance to abiotic stresses. Overall, these findings provide useful information to better understand the function of *GmHSP60* genes in soybean and facilitate the way for the utilization of chaperonin family genes for achieving plant tolerance against abiotic stresses.

**KEYWORDS**

Heat shock protein, Chaperonin, Three-dimensional structure, Cis-regulatory elements, Gene ontology.

نشریه علمی

## زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

# شناسایی ژن های خانواده *HSP60* در گستره ژنوم سویا و بررسی کارکردی آن ها در پاسخ به تنش های غیرزیستی

سمیرا محمدی\*

گروه اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

### چکیده

پروتئین های شوک حرارتی ۶۰ کیلو دالتونی (*HSP60*) که به عنوان چاپرونین (*cpn60*) نیز شناخته می شوند، نقش مهمی در رشد و نمو و پاسخ گیاه به تنش ایفا می نمایند. در این مطالعه از طریق ابزارهای بیوانفورماتیکی، ۳۲ ژن *HSP60* در ژنوم سویا شناسایی شد که روی ۱۴ کروموزوم توزیع شده اند. بیشتر این پروتئین ها آب دوست، اسیدی، ناپایدار با شاخص آلیفاتیک بالا هستند. درخت تکاملی، پروتئین های *HSP60* سویا، آرابیدوپسیس و برنج را بر مبنای جایگاه سلولی در سه گروه اصلی تقسیم بندی نمود. پروتئین های واقع در زیرگروه های مختلف از نظر ساختار ژنی، موتیف های حفاظت شده، فاز اینترون و ساختار سه بعدی از حفاظت شدگی بالایی برخوردار بوده که این امر می تواند بیانگر شباهت های کارکردی آن ها در زیرگروه های مختلف باشد. چندین عنصر تنظیمی سیس پاسخ گو به تنش ها، رشد و نمو و هورمون ها در پروموتور ژن های *GmHSP60* یافت شد که بیانگر نقش آن ها در رشد و نمو و پاسخ گیاه به تنش های محیطی می باشد. تجزیه و تحلیل هستی شناسی ژن (*GO*)، پیش بینی کرد که ژن های *GmHSP60* در پاسخ به تنش های مختلف، مسئول تاخوردگی و تاخوردگی مجدد پروتئین به روشی وابسته به *ATP* هستند. بررسی الگوی ترانسکریپتوم (*RNA-Seq*) نشان داد که بیشتر ژن های *GmHSP60* دارای بیان بالایی در پاسخ به تنش های شوری، خشکی، سرما، گرما، غرقاب و کمبود مواد غذایی بودند که بیانگر نقش آنها در افزایش تحمل سویا به تنش های غیرزیستی می باشد. به طور کلی، این یافته ها اطلاعات مفیدی را برای درک بهتر کارکرد ژن های *GmHSP60* در سویا فراهم آورده و راه را برای استفاده از ژن های خانواده چاپرونین برای دستیابی به تحمل گیاهان در برابر تنش های غیرزیستی تسهیل می نمایند.

### واژه های کلیدی

پروتئین شوک حرارتی، چاپرونین، ساختار سه بعدی، عناصر تنظیمی سیس، هستی شناسی ژن.

نویسنده مسئول:

سمیرا محمدی

رایانامه: s.mohamadi@stu.sanru.ac.ir

استناد به این مقاله:

محمدی، سمیرا (۱۴۰۲). شناسایی ژن های خانواده *HSP60* در گستره ژنوم سویا و بررسی کارکردی آن ها در پاسخ به تنش های غیرزیستی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۳)، ۲۸-۱۱.

مورد نیاز هستند. آنها در آرکتی‌ها، یوباکتری‌ها و یوکاریوت‌ها وجود داشته و تاخوردگی پروتئین، تاخوردگی مجدد، تجمع و انتقال به کلروپلاست و میتوکندری را تسهیل می‌کنند (Balchin et al., 2016; Hartl et al., 2011). کمپلکس‌های پروتئینی الیگومری ساختارهای دوحلقه‌ای را تشکیل داده و در ترکیب کارکردی پروتئین، تاخوردگی پروتئین‌های دناتوره شده و تازه سنتز شده از طریق هیدرولیز ATP مشارکت می‌کنند (Ditzel et al., 2013; Saibil et al., 1998). تاکنون دو نوع چاپرونین، نوع I در باکتری‌ها (به نام GroEL)، پلاستیدها (HSP60) و میتوکندری‌ها (Hsp60)، و نوع II در آرکتی‌ها و سیتوزول یوکاریوتی (CCT/TriC)، با ساختار کریستالی مشخص و حفاظت شده شناسایی شده‌اند (Braig et al., 1994; Ditzel et al., 2001; Hill & Hemmingsen, 1998). در گیاهان، ژنوم هسته‌ای، همولوگ‌های چاپرونین میتوکندری و پلاستییدی را کد می‌کند (Hill & Hemmingsen, 2001; Peng et al., 2011). GroEL در *Escherichia coli* و HSP60 میتوکندری حاوی ۱۴ زیرواحد یکسان بوده، در حالی که HSP60 پلاستید شامل دو زیرواحد مجزای  $\alpha$  و  $\beta$  می‌باشد (Martel et al., 1999; Nishio et al., 1999).

HSP60 در کلروپلاست‌های گیاهی و *E. coli*، از آنزیم روبیسکو به عنوان یک پروتئین اصلی تثبیت کننده CO<sub>2</sub>، محافظت می‌نماید (Hemmingsen et al., 1988; Wang et al., 2004). مشاهده شده است که تاخوردگی زیرواحد‌های RbcL گیاهی توسط چاپرونین HSP60 و همچنین کوفاکتور آن HSP20 انجام می‌شود (Wang et al., 2004; Wilson & Hayer-Hartl, 2018). زمانی که چاپرونین کلروپلاست و فاکتورهای کمکی در سویه *E. coli* بیش بیان شد، آنزیم عملکردی گیاهی روبیسکو مشاهده شد (Wilson & Hayer-Hartl, 2018). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که که چاپرونین‌ها با هم همکاری می‌کنند و نقش‌های حیاتی در بیان کارکردی پروتئین‌های کدشده توسط ترانس‌ژن‌ها دارند. علاوه بر این، HSP60 نقش مهمی در متابولیسم RNA، حفاظت و پردازش RNA نیز ایفا می‌نماید (Ruggero et al., 1998).

اگرچه عملکرد بیولوژیکی پروتئین‌های HSP60 در پاسخ به تنش در چند گیاه از جمله ذرت، سورگوم و فلفل مشخص شده است (Haq et al., 2019; Nagaraju et al., 2021; Prasad et al., 1990). با این حال، عملکردهای خاص ژن‌های

## مقدمه

گیاهان با چالش‌های محیطی اجتناب‌ناپذیری مانند تنش‌های زیستی و غیرزیستی مواجه هستند که رشد و عملکرد آنها را به شدت محدود می‌کنند (Vaughan et al., 2018). تنش‌های غیرزیستی بازدارنده‌ترین عامل و باعث کاهش ۷۰ درصدی عملکرد در گیاهان زراعی می‌شوند (Mantri et al., 2012). برای مقابله با تنش‌های محیطی، گیاهان مکانیسم‌های مختلفی از جمله مکانیسم‌های مورفولوژیکی (جهت‌یابی برگ)، آناتومیکی (هدایت روزه‌ای و افزایش بلوغ برگ)، فنولوژیکی (تغییرات در مراحل نمو)، فیزیولوژیکی (هدایت هیدرولیکی ریشه و فتوسنتز)، متابولیکی (تجمع اسمولیت‌ها)، تعادل هورمونی (آبسزیک‌اسید، اتیلن و سالیسیلیک‌اسید) و متابولیت‌های ثانویه (ایزوپروپانوئید، فلاونوئید، آنتوسیانین و لیگنین) را توسعه داده‌اند (Nagaraju et al., 2021). علاوه بر این مکانیسم‌ها، گیاهان باید تنش را در سطوح سلولی و مولکولی تشخیص داده و به آن پاسخ دهند، تا بتوانند با بازدارندگی بیان پروتئین‌های طبیعی، بیان پروتئین‌های مرتبط با تنش را القاء نمایند (Pareek et al., 2010). به طور کلی تنش‌های غیرزیستی منجر به تجمع پروتئین‌هایی می‌شوند که متعاقباً می‌توانند باعث اختلال در عملکرد متابولیکی گیاه شوند. بنابراین، برای بقا در شرایط تنش، حفظ ترکیب طبیعی پروتئین‌ها و در عین حال کاهش تجمع پروتئین‌های غیرطبیعی برای گیاهان ضروری است. برای غلبه بر چنین مشکلی، گیاهان پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) (ها) به نام چاپرون‌های مولکولی تولید می‌کنند که در تحمل به تنش‌های غیرزیستی و زیستی نقش دارند (Guo et al., 2016; Vierling, 1991). آنها به عنوان پروتئین‌های چندمنظوره عمل نموده و هم‌مستو سازی سلولی را با تاخوردگی، انتقال و تجزیه پروتئین در شرایط تنش حفظ می‌کنند (Vierling, 1991). HSPها بر اساس وزن مولکولی خود به پروتئین‌های شوک حرارتی ۱۰۰ کیلودالتونی (HSP100)، HSP90، HSP70، HSP60، HSP40، HSP20 و HSP10 تقسیم‌بندی می‌شوند (Wang et al., 2004; Gupta et al., 2010).

چاپرونین‌های HSP60 برای بقای سلول‌ها در تمام شرایط رشد ضروری به نظر می‌رسند، چون برای تاخوردگی کارآمد پروتئین‌های متعددی که واسطه عملکردهای حیاتی سلولی بوده،

HSP60 مشاهده شد (Hsu et al., 2019). در میان اعضای خانواده ژنی HSP60 در آرابتیدوپسیس، ژن‌های *AtHSP60α1*، *AtHSP60β1* و *AtHSP60β2* در مقایسه با سایر اعضا، تحت تنش گرمایی به شدت القاء شدند (Weiss et al., 2009). بیش‌بیان ژن‌های HSP60 و HSP10 در *E. coli* و مخمر، تحمل آن‌ها را در برابر تنش‌های اسمزی و شوری بالا نشان داد (Wang et al., 2004).

Kim و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که بیشتر اعضای ژن‌های HSP60 در کاهو تحت تنش‌های اشعه ماوراء بنفش و نور با شدت بالا، افزایش بیان نشان دادند (Kim et al., 2021). آنالیز بیان ژن‌های HSP60 سورگوم در بافت‌های مختلف نشان داد که بیشتر ژن‌های *SbHSP60* به‌طور یکنواخت در برگ بیان می‌شوند، در حالی که بیان متوسطی در بافت‌های ریشه مشاهده شد. علاوه بر این، بیشتر ژن‌های انتخابی *SbHSP60* بیشترین میزان بیان را تحت تنش‌های خشکی و شوری و به دنبال آن تنش سرما نشان دادند (Nagaraju et al., 2021). Haq و همکاران (۲۰۱۹) در مجموع ۱۶ ژن HSP60 را در فلفل شناسایی نموده و نتیجه گرفتند که این ژن‌ها در پاسخ دفاعی گیاه در برابر گرما و سایر تنش‌های غیرزیستی نقش دارند. این پروتئین‌ها به‌عنوان لیپو-چاپرونین عمل نموده و در پایداری غشاء و تاخوردگی مجدد، مشارکت می‌کنند، و در نهایت از تجمع حرارتی برگشت‌ناپذیر جلوگیری می‌نمایند (Haq et al., 2019).

تورهان و همکاران (۲۰۱۶)، افزایش بیان ژن HSP60 را در گوجه فرنگی پیوندی تحت تنش گرمایی نشان دادند (Turhan et al., 2016). در حالی که افزایش بیان ژن *ATIG55490* در آرابتیدوپسیس و همولوگ آن *PtHSP60-33* در صنوبر تحت تنش شوری مشاهده شد (Taj et al., 2010; Yer et al., 2018). این مطالعات بیانگر دخالت ژن‌های HSP60 در تحمل به تنش‌های مختلف می‌باشد.

HSP60 کلروپلاستی در آرابتیدوپسیس، افزایش بیان تحت تنش‌های دمایی بالا و خشکی نشان داد (Xu & Huang, 2010). در بررسی Kim و همکاران (۲۰۱۳)، مشخص شد که *OsHSP60α1* زیرواحد 60α چاپرونین پلاستید را کد می‌نماید که برای تاخوردگی پروتئین rbcL ضروری است (S.-R. Kim et al., 2013). این امر اهمیت چاپرونین‌ها را در حفاظت از پروتئین استنباط می‌نماید.

در مجموع، مطالعات فوق بیانگر نقش متنوع ژن‌های HSP60 در نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های محیطی می‌باشد. از

HSP60 در افزایش تحمل به تنش‌های غیرزیستی در سویا مبهم باقی مانده است.

سویا (*Glycine max* L.) از نظر اقتصادی و غذایی یکی از مهم‌ترین محصولات در جهان محسوب می‌شود. این محصول، ۶۱ درصد از کل تولید دانه‌های روغنی جهان در سال ۲۰۲۲ را تشکیل می‌دهد (<http://soystats.com/international-world-oilseed-production/>). این گیاه، نه تنها پروتئین گیاهی و روغن خوراکی، بلکه اسیدهای آمینه ضروری برای انسان و حیوانات را نیز فراهم می‌نماید (Zhang et al., 2015). افزایش عملکرد سویا و محتوای پروتئین دانه بدون به خطر انداختن روغن از اهداف اصلی اصلاح سویا بوده است. با این حال، تولید سویا توسط خشکی، شوری و سایر تنش‌های زیست‌محیطی تهدید می‌شود. بنابراین، در این مطالعه با توجه به اهمیت پروتئین‌های HSP60 در پاسخ به تنش، آنالیز جامعی از این خانواده ژنی در گیاه سویا انجام شد. با استفاده از برخی ابزارهای بیوانفورماتیکی، تحلیل ساختارهای ژنی، توزیع این ژن‌ها روی کروموزوم‌های مختلف، روابط تکاملی، ویژگی‌های فیزیوشیمیایی و موتیف‌های حفاظت‌شده آنها مورد مطالعه قرار گرفت. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن<sup>۱</sup> (GO) ژن‌های *GmHSP60* و عناصر تنظیمی سیس<sup>۲</sup> در پروموتور ژن‌ها صورت گرفت. شبکه برهم‌کنش پروتئین - پروتئین و ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های HSP60 پیش‌بینی شدند و در نهایت، آنالیز الگوهای بیان ژن‌های *GmHSP60* تحت تنش‌های غیرزیستی انجام شد. یافته‌های این مطالعه مبنایی برای مطالعات آینده در جهت کشف عملکرد ژن‌های HSP60 در افزایش تحمل گیاه سویا در برابر تنش‌های غیرزیستی خواهد بود.

## پیشینه پژوهش

مطالعات متعددی نشان داده است که پروتئین‌های HSP60 نقش‌های مهمی در فرآیند تحمل به تنش ایفا می‌نمایند. به‌عنوان مثال، مشخص شده است که پروتئین‌های HSP60 نقش حیاتی در تنظیم نموی، بیوژنز میتوکندری، تحمل به تنش گرمایی و سرهم‌بندی ساختارهای پروتئینی الیگومری ایفا می‌نمایند (Prasad & Stewart, 1992). در بررسی Hsu و همکاران (۲۰۱۹) در آرابتیدوپسیس، پیرایش RNA میتوکندری به‌واسطه

1. Gene ontology  
2. Cis-regulatory element

این روش، شناسایی و بررسی عملکردی خانواده ژنی *HSP60* که پایه‌ای جهت درک مکانیسم مولکولی آن در سیگنال‌دهی تنش است، ضروری به نظر می‌رسد.

### روش‌شناسی پژوهش

#### شناسایی و آنالیز توالی خانواده ژنی *HSP60* در سویا

ابتدا توالی کامل ژنوم سویا از پایگاه اطلاعاتی Phytozome v13 ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net))، دانلود شد. برای جمع‌آوری توالی‌های آمینواسیدی خانواده ژنی *HSP60* سویا، ابتدا مشخصات HMM دمین اختصاصی Cpn60\_TCP1 (PF00118) از پایگاه اطلاعاتی Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>)، دانلود و سپس به‌عنوان query در جستجوی BLASTP ( $P=0.001$ ) در پایگاه اطلاعاتی ژنوم سویا ارسال شد (Finn et al., 2015). تمام توالی‌های پروتئینی به‌دست آمده جهت حضور دمین Cpn60\_TCP1 توسط پایگاه InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) مورد بررسی قرار گرفتند (Jones et al., 2014).

در نهایت، پروتئین‌های غیر تکراری و دارای دمین Cpn60\_TCP1 با وزن مولکولی بین ۵۰ تا ۶۹ کیلو دالتون به‌عنوان پروتئین‌های خانواده ژنی *HSP60* سویا شناسایی شدند (Haq et al., 2019).

#### تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها

خواص فیزیوشیمیایی مانند تعداد اسید آمینه، وزن مولکولی (MW)، نقطه ایزوالکتریک (pI)، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک، و شاخص آبگریزی (GRAVY) پروتئین‌های *GmHSP60* با استفاده از ابزار محاسبه  $pI / Mw$  از ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>) محاسبه شدند (Gasteiger et al., 2005).

#### تعیین جایگاه سلولی و موقعیت کروموزومی

برنامه آنالیز WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) برای پیش‌بینی جایگاه سلولی پروتئین‌های *GmHSP60* مورد استفاده قرار گرفت (Horton et al., 2007). تصویر موقعیت کروموزومی ژن‌های *GmHSP60* با استفاده از نرم‌افزار MapChart ترسیم شد (Voorrips, 2002).

#### هم‌ردیفی چندگانه و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

در این مطالعه، جهت گروه‌بندی ژن‌های *HSP60* سویا دو درخت فیلوژنتیک ترسیم شد. درخت اول فقط شامل توالی‌های پروتئینی *HSP60* سویا و دیگری شامل توالی‌های *HSP60* آرکیدوپسیس و برنج بود. توالی‌های پروتئینی *HSP60* آرکیدوپسیس و برنج به ترتیب از پایگاه اطلاعاتی TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) و RGAP (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) به‌دست آمدند (Lamesch et al., 2012; Kawahara et al., 2013). ابتدا آنالیز هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های پروتئینی *HSP60* با نرم‌افزار ClustalW انجام شد (Thompson et al., 2003). درخت‌های فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7.0 بر مبنای روش اتصال همسایه<sup>۱</sup> (NJ) با آزمون بوت‌استرپ<sup>۲</sup> با تکرار ۱۰۰۰ برای اطمینان از صحت گروه‌بندی ترسیم شد (Kumar et al., 2016).

#### تجزیه و تحلیل ساختار ژنی و شناسایی موتیف‌های حفاظت شده

برای بررسی تنوع و ساختار اعضای خانواده ژنی *GmHSP60*، با استفاده از برنامه GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) ساختار اگزون - اینترون با مقایسه توالی CDS نسبت به DNA ژنومی مربوط به هر ژن، ترسیم شد (Hu et al., 2015). علاوه بر این، توالی‌های آمینواسیدی آنها تحت آنالیز موتیف و پیش‌بینی دمین با برنامه MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme/>) قرار گرفتند (Bailey et al., 2009). پارامترهای مورد استفاده شامل شناسایی حداکثر ۲۰ موتیف، و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب ۶ و ۵۰ اسید آمینه بود. سپس مستندسازی<sup>۳</sup> آن‌ها در پایگاه اطلاعاتی InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) مورد بررسی قرار گرفت.

#### تجزیه و تحلیل توالی پروموتور ژن‌های *GmHSP60*

تجزیه و تحلیل عناصر تنظیمی سیس در پروموتور ژن‌های *GmHSP60* به درک اطلاعات مربوط به تنظیم بیان ژن کمک

1. Neighbor-Joining  
2. Bootstrap  
3. Annotation

*HSP60* برنج و آرآبیدوپسیس، ۵۲ پروتئین *HSP60* در پایگاه اطلاعاتی ژنوم سویا شناسایی شدند. علاوه بر این، بر اساس ابزار InterProScan، ۲۰ توالی انتخابی با وزن مولکولی بیشتر از ۶۹ کیلودالتون و کمتر از ۵۰ کیلودالتون و بدون دمین Cpn60\_TCP1، حذف شدند. در نهایت ۳۲ ژن *HSP60-1* تا *GmHSP60-32* نام‌گذاری شدند (جدول ۱).

تعداد چارونین‌ها در گیاهان متفاوت است، به‌عنوان مثال ۲۹ پروتئین در آرآبیدوپسیس (Hill & Hemmingsen, 2001)، ۲۹ مورد در برنج (W. Hu *et al.*, 2009)، ۲۰ مورد در ارزن دم‌روباهی (Singh *et al.*, 2016)، ۴۹ مورد در صنوبر (Yer *et al.*, 2018)، ۱۶ مورد در لفل (Hsu *et al.*, 2019) و ۳۰ مورد در سورگوم (Nagaraju *et al.*, 2021) گزارش شده است.

طول پروتئین‌های این خانواده از ۵۱۱ (GmHSP60-8) تا ۶۰۵ (GmHSP60-1 و GmHSP60-3) اسیدآمینه متفاوت بود. وزن مولکولی پیش‌بینی شده نیز بین ۵۵/۱۸ (GmHSP60-8) تا ۶۵/۷۶ (GmHSP60-3) کیلودالتون متغیر بود. شاخص آلیفاتیک نیز بین ۹۵/۳۲ (GmHSP60-4) تا ۱۱۴/۸۶ (GmHSP60-6) متغیر بود. نقاط ایزوالکتریک پیش‌بینی شده (pI) بین ۵/۲۵ (GmHSP60-2) و ۹/۰۷ (GmHSP60-3) بود. در حالی که شاخص ناپایداری ۳۰ پروتئین از ۳۲ پروتئین *GmHSP60* (۹۳/۷۵ درصد) کمتر از ۴۰ پیش‌بینی شده و پروتئین پایدار محسوب می‌شوند. شاخص آب‌گریزی (GRAVY) ۸۷/۵ درصد پروتئین‌های *HSP60* منفی بوده، که نشان می‌دهد بیشتر پروتئین‌های *HSP60* سویا آب‌دوست هستند (جدول ۱).

بیشتر این پروتئین‌ها آب‌دوست، اسیدی، ناپایدار با شاخص آلیفاتیک بالاتر بوده که بیانگر ویژگی‌های بارز پروتئین‌های مرتبط با تنش هستند (Rao *et al.*, 2008).

مکان‌یابی پروتئین‌های *HSP60* سویا نشان داد که جایگاه سلولی عمده این پروتئین‌ها، سیتوپلاسم است. همچنین جایگاه سلولی برخی میتوکندری، کلروپلاست و هسته پیش‌بینی شد (جدول ۱). وجود تنوع مکانی برای این پروتئین‌ها احتمالاً نشان‌دهنده نقش‌های کارکردی متنوع این ژن‌ها در فرآیندهای مختلف سلولی می‌باشد.

می‌نماید. بنابراین، با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Phytozome v13، ۱۵۰۰ جفت‌باز بالا دست کدون شروع (ATG) ژن‌ها به‌عنوان توالی پروموتور در نظر گرفته شده و شناسایی عناصر تنظیمی سیس با استفاده از PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcar>) انجام گردید (Lescot *et al.*, 2002). برای انجام تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) نیز از نرم‌افزار Blast2GO (<http://blast2go.com/>) استفاده شد (Conesa & Götz, 2008).

**پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی و شبکه برهم‌کنش پروتئین‌ها**  
ساختارهای سه‌بعدی پروتئین‌های *GmHSP60* با استفاده از برنامه Phyre2 ([sbj.bio.ic.ac.uk/phyre2/](http://sbj.bio.ic.ac.uk/phyre2/)) پیش‌بینی شدند (Kelley *et al.*, 2015). میان‌کنش‌های عملکردی و فیزیکی بین پروتئین‌های *HSP60* سویا با استفاده از پایگاه اطلاعاتی STRING (<http://string-db.org/>) با شاخص حداقل امتیاز متعامل ۰/۴ ترسیم شد (Szkarczyk *et al.*, 2019). سپس با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape v3.10.1 (<http://cytoscape.org/>) و به کمک پلاگین‌های Cytohubba و ClusterVis شبکه برهم‌کنش پروتئین‌ها تجزیه و تحلیل شد (Shannon *et al.*, 2003).

### تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های *GmHSP60* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

برای تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن‌های *HSP60* سویا در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی شامل شوری، خشکی، سرما، گرما، غرقاب و کمبود مواد غذایی از داده‌های RNA-Seq (<http://ipf.sustech.edu.cn/pub/soybean/>) استفاده شد. داده‌های بیانی FPKM دریافتی جهت نرمال‌سازی به‌صورت  $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$  تبدیل و نمودار Heatmap توسط نرم‌افزار CIMminer (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/home.do/>) ترسیم شد (Scherf *et al.*, 2000).

### یافته‌های پژوهش

#### شناسایی اعضای خانواده ژنی *HSP60* در سویا

بر مبنای پروفایل HMM دمین حفاظت‌شده Cpn60\_TCP1 (PF00118) و الگوریتم BLASTP توالی‌های پروتئینی



**جدول ۱.** خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌های HSP60 در سویا. تعداد اسیدآمینه، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، شاخص

آلیفاتیک و متوسط هیدروپاتی کل پروتئین‌ها با استفاده از ابزار Expasy -ProtParam برآورد و جایگاه سلولی پروتئین‌ها نیز با استفاده از برنامه WoLF PSORT

پیش‌بینی شد

نام ژن Gene name	شماره دسترسی ژن Gene ID	طول پروتئین Protein length (aa)	وزن مولکولی Molecular weight (kD)	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	شاخص ناپایداری Instability index	شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	متوسط هیدروپاتی کل GRAVY	جایگاه سلولی Subcellular localization
GmHSP60-1	Glyma.01G069500	605	65.69	8.99	-0.160	35.90	98.15	Chloroplast
GmHSP60-2	Glyma.02G071900	545	58.59	5.25	-0.065	31.24	96.28	Cytoplasm
GmHSP60-3	Glyma.02G126300	605	65.76	9.07	-0.182	38.27	96.21	Chloroplast
GmHSP60-4	Glyma.02G273200	560	60.27	6.19	-0.082	34.33	95.32	Cytoplasm
GmHSP60-5	Glyma.05G165500	545	59.06	6.09	-0.021	29.70	104.18	Cytoplasm
GmHSP60-6	Glyma.05G242700	533	57.55	6.85	0.141	34.99	114.86	Nucleus
GmHSP60-7	Glyma.07G009600	574	61.18	7.13	-0.102	25.26	101.93	Mitochondria
GmHSP60-8	Glyma.07G149200	511	55.18	7.19	0.118	36.91	114.66	Nucleus
GmHSP60-9	Glyma.07G221100	587	62.64	5.96	0.117	33.70	106.01	Chloroplast
GmHSP60-10	Glyma.08G050100	533	57.63	6.85	0.126	36.31	114.13	Nucleus
GmHSP60-11	Glyma.08G123100	545	59.09	5.98	-0.020	29.95	104.55	Cytoplasm
GmHSP60-12	Glyma.08G175900	592	62.84	5.85	-0.084	35.28	101.15	Chloroplast
GmHSP60-13	Glyma.08G192700	574	61.25	6.04	-0.116	26.61	100.40	Mitochondria
GmHSP60-14	Glyma.08G364000	535	58.95	5.60	-0.159	33.47	99.64	Cytoplasm
GmHSP60-15	Glyma.09G158200	554	60.25	5.92	-0.125	39.91	102.51	Cytoplasm
GmHSP60-16	Glyma.10G127800	575	61.09	5.99	-0.066	24.59	101.46	Mitochondria
GmHSP60-17	Glyma.10G193200	577	61.43	5.75	-0.085	27.57	100.42	Mitochondria
GmHSP60-18	Glyma.11G185500	527	57.08	5.55	-0.035	34.11	101.48	Cytoplasm
GmHSP60-19	Glyma.11G195900	593	63.62	5.28	-0.140	28.79	102.36	Chloroplast
GmHSP60-20	Glyma.11G244700	535	59.20	5.60	-0.184	41.25	97.72	Cytoplasm
GmHSP60-21	Glyma.12G078100	584	61.70	5.29	-0.059	28.08	105.12	Chloroplast
GmHSP60-22	Glyma.12G087300	527	57.10	5.50	-0.029	33.60	101.48	Cytoplasm
GmHSP60-23	Glyma.14G043400	560	60.25	6.19	-0.087	36.13	95.34	Cytoplasm
GmHSP60-24	Glyma.15G250500	591	62.84	5.72	-0.076	32.72	101.64	Chloroplast
GmHSP60-25	Glyma.16G153200	545	58.47	5.31	-0.069	31.36	95.91	Cytoplasm
GmHSP60-26	Glyma.16G208700	554	60.19	5.86	-0.091	38.46	102.33	Cytoplasm
GmHSP60-27	Glyma.18G012400	535	59.28	5.60	-0.185	40.39	97.72	Cytoplasm
GmHSP60-28	Glyma.18G298100	535	59.02	5.68	-0.161	34.52	99.83	Cytoplasm
GmHSP60-29	Glyma.20G019400	589	62.89	7.02	0.071	34.14	105.48	Chloroplast
GmHSP60-30	Glyma.20G079300	575	61.02	6.38	-0.044	25.17	102.99	Mitochondria
GmHSP60-31	Glyma.20G197100	575	61.25	5.74	-0.082	26.82	100.77	Mitochondria
GmHSP60-32	Glyma.20G215100	557	60.76	5.97	-0.151	38.37	99.66	Cytoplasm

### مکان‌یابی کروموزومی ژن‌های *GmHSP60*

بر اساس پایگاه اطلاعاتی ژنوم سویا، ۳۲ ژن *HSP60* سویا روی ۱۴ کروموزوم قرار گرفته‌اند (شکل ۱). بیشترین تعداد ژن‌های *GmHSP60* به تعداد ۵ ژن روی کروموزوم شماره ۸ قرار دارد. پس از آن، کروموزوم شماره ۲۰ با چهار ژن دارای بیشترین تعداد ژن است. سه ژن *GmHSP60* روی هر یک از کروموزوم‌های شماره ۲، ۷ و ۱۱ قرار دارد. کروموزوم‌های شماره ۵، ۱۰، ۱۲، ۱۶ و ۱۸ هر کدام شامل دو ژن بوده و کروموزوم‌های شماره ۱، ۹، ۱۴ و ۱۵ دارای یک ژن *GmHSP60* هستند (شکل ۱).

### مطالعه روابط تکاملی و گروه‌بندی خانواده ژنی *HSP60*

سویا

توسعه ژنومیکس مقایسه‌ای امکان تجزیه و تحلیل خانواده‌های

پروتئینی یکسان را در میان گونه‌های مختلف فراهم آورده است. درخت فیلوژنتیکی بر مبنای روش اتصال همسایه (NJ) با استفاده از ۷۰ توالی پروتئینی *HSP60* از گونه‌های سویا، آرابیدوپسیس و برنج ترسیم شد تا روابط تکاملی بین این پروتئین‌ها آشکار شود (شکل ۲). درخت تکاملی پروتئین‌ها را بر مبنای جایگاه سلولی در سه گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود. بدین صورت که پروتئین‌های *HSP60* فعال در هسته یا سیتوپلاسم در گروه اول واقع شدند. در گروه‌های دوم و سوم نیز به‌ترتیب، پروتئین‌های فعال در میتوکندری و کلروپلاست قرار گرفتند. در این بررسی از ۷۰ پروتئین *HSP60*، ۳۸ پروتئین در گروه اول، ۱۲ پروتئین در گروه دوم و ۲۰ پروتئین در گروه سوم قرار گرفت. این نحوه گروه‌بندی با مطالعات قبلی در ارزن دم روباهی و فلفل مطابقت دارد ( Haq

ژن‌های *GmHSP60-16*، *GmHSP60-17*، *GmHSP60-30* و *GmHSP60-31* مشاهده شد.

یکی از ویژگی‌های جالب خانواده *GmHSP60* تغییرپذیری آن‌ها در فاز اینترون است. اینترون‌ها بر اساس اختلال در آخرین کدون یک اگزون، به سه نوع تقسیم می‌شوند. مرحله اول فاز صفر نام دارد که در آن اینترون بعد از نوکلئوتید سوم کدون درج شده و کدون را مختل نمی‌کند. مرحله دوم فاز اول نام دارد که در آن اینترون بین باز اول و دوم کدون درج می‌شود. در نهایت، فاز دوم، جایی که اینترون بین باز دوم و سوم یک کدون درج می‌شود (Kim et al., 2021). به جز سه ژن فاقد اینترون، بقیه ژن‌ها حداقل دارای چهار فاز اینترون صفر و سه فاز اینترون یک هستند. وجود تفاوت مشاهده‌شده در تعداد و فاز اینترون برخی از ژن‌ها می‌تواند به دلیل حذف یا به‌دست آوردن اینترون طی تکامل بوده و احتمالاً موجب ایجاد یک نقش کارکردی اختصاصی برای آن‌ها شده است (Azizi & Zare, 2022).

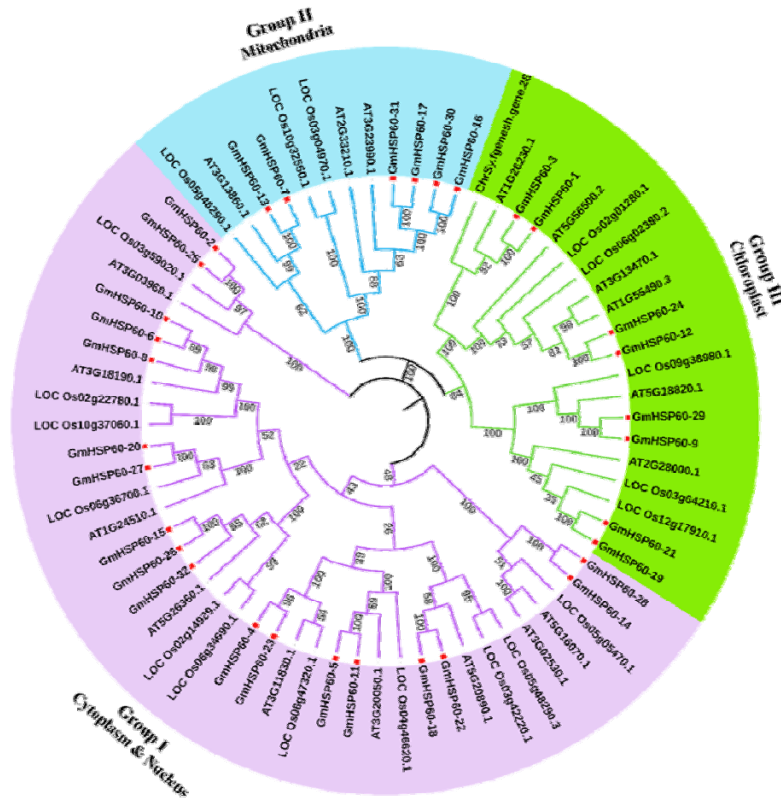
(et al., 2019; Singh et al., 2016).

### شناسایی ساختار اگزون - اینترون ژن‌های *GmHSP60*

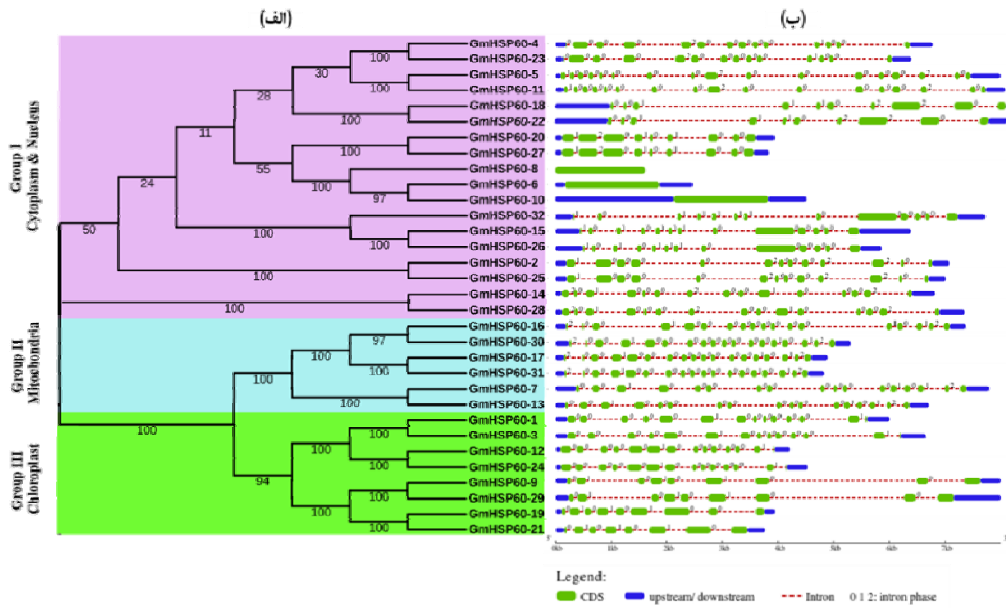
بررسی ساختار ژنی می‌تواند شواهد بیشتری جهت تأیید روابط فیلوژنتیکی ارائه نماید. زیرا وجود یا عدم وجود اینترون فرآیند مهمی در تکامل ژنوم و یک مقیاس تطبیقی برای تکامل گونه می‌باشد (Moore & Purugganan, 2003). در این بررسی، ساختار اگزون - اینترون ژن‌های *HSP60* در سویا با استفاده از پایگاه GSDS، ترسیم شد. خانواده ژنی *HSP60* سویا بر اساس درخت فیلوژنتیکی و بر مبنای جایگاه سلولی به سه گروه تقسیم بندی شدند (شکل ۳. الف). به طوری که ژن‌های گروه اول، دوم و سوم به ترتیب در سیتوپلاسم یا هسته، میتوکندری و کلروپلاست قرار دارند. همان‌طور که در شکل ۳. ب نشان داده شده است تعداد اینترون‌ها در محدوده صفر تا ۱۷ اینترون متغیر می‌باشد. اگرچه هیچ اینترونی در ژن‌های *GmHSP60-6*، *GmHSP60-8* و *GmHSP60-10* یافت نشد، با این حال، ۱۷ اینترون در



شکل ۱. جایگاه ژن‌های *HSP60* روی کروموزوم‌های سویا. شماره کروموزوم‌ها در بالای هر کروموزوم نوشته شده است. مقیاس ستونی، طول کروموزوم‌های سویا را بر حسب مگا جفت‌باز نشان می‌دهد.



**شکل ۲.** درخت فیلوژنتیکی خانواده ژنی *HSP60* در سویا، آراییدوپسیس و برنج. درخت فیلوژنتیکی به کمک نرم‌افزار MEGA 7.0 با استفاده از توالی کامل پروتئین‌ها توالی آمینواسیدی بر مبنای روش اتصال همسایه با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شد. گروه‌های مختلف با رنگ‌های مجزا نشان داده شده‌اند. مقادیر بوت استرپ روی شاخه‌ها نشان داده شده است.

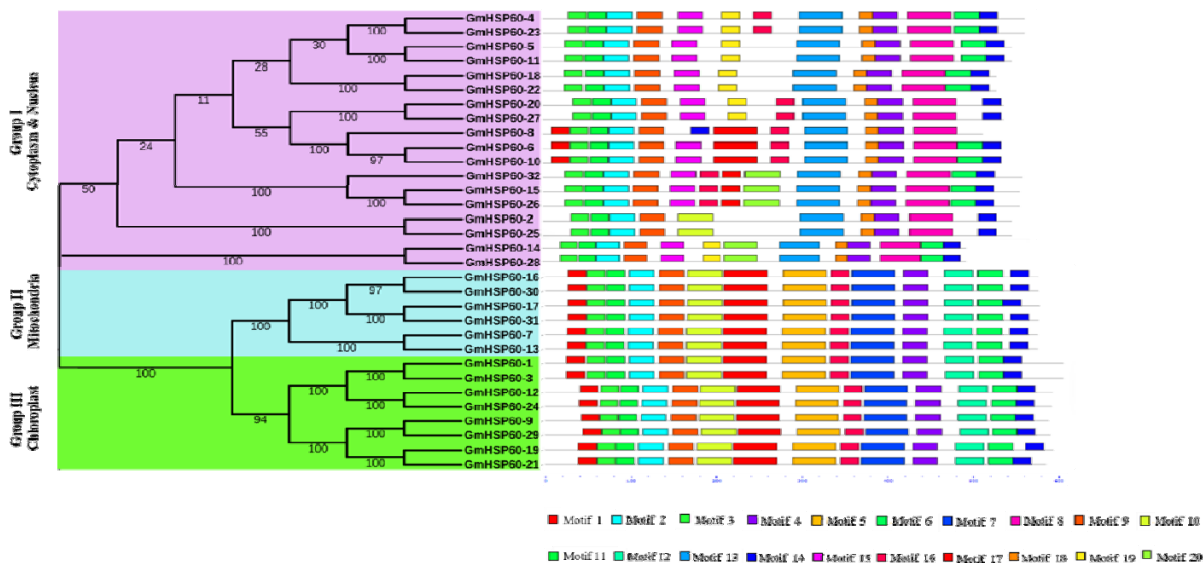


**شکل ۳.** روابط فیلوژنتیکی و ساختار اگزون - اینترون ژن‌های *HSP60* سویا. (الف) روابط فیلوژنتیکی: با استفاده از توالی آمینواسیدی ۳۲ پروتئین *HSP60* سویا، درخت فیلوژنتیکی به کمک نرم‌افزار MEGA 7.0 بر مبنای روش اتصال همسایه با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شد. (ب) ساختار اگزون - اینترون. جعبه‌های سبز نمایانگر اگزون و نقطه چین‌های قرمز نمایانگر اینترون‌ها هستند. مناطق ترجمه نشده (UTR) بالادست و پایین دست با جعبه‌های آبی نشان داده شده‌اند. اعداد ۰، ۱ و ۲ نشان‌دهنده فازهای اینترون هستند. اندازه اگزون و اینترون را می‌توان با استفاده از مقیاس موجود در پایین تخمین زد. نام گروه‌ها (اول و دوم) نیز با فونت سیاه مشخص شده است.

شناسایی شده با استفاده از InterPro، موتیف‌های ۲، ۸ و ۱۳ به‌عنوان دمین Cpn60\_TCP1 پیش‌بینی شدند (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، نوع، ترتیب و تعداد موتیف‌های گروه‌های دوم و سوم مشابه بودند، اما با پروتئین‌های گروه اول تفاوت داشتند. مطابق با گزارش‌های قبلی، موتیف‌ها به‌طور قابل توجهی در گروه‌های مختلف، حفاظت شده هستند (Singh et al., 2016; Zhang et al., 2015).

## شناسایی موتیف‌های حفاظت شده پروتئین‌های GmHSP60

جهت بررسی بیشتر و مشخص کردن میزان تشابه و تفاوت توالی پروتئین‌های *HSP60* در سویا از نرم افزار MEME استفاده شد. بر این اساس، ۲۰ موتیف حفاظت شده با طول بین ۱۵ تا ۵۰ آمینواسید شناسایی شد. موتیف‌های ۲، ۳، ۴، ۶، ۹ و ۱۱ در تمامی پروتئین‌ها یافت شد (شکل ۴). با مستندسازی موتیف‌های



شکل ۴. روابط فیلوژنتیکی و بررسی موتیف‌های حفاظت شده پروتئین‌های *HSP60* سویا. ۲۰ موتیف حفاظت شده در پروتئین‌های *GmHSP60* با استفاده از برنامه MEME شناسایی شد. خطوط خاکستری توالی‌های حفاظت نشده را نشان می‌دهند و هر موتیف با جعبه‌های رنگی که در پایین شکل توضیح داده شده، نشان داده شده‌اند. طول پروتئین و موتیف را می‌توان با استفاده از مقیاس موجود در پایین شکل تخمین زد.

جدول ۲. مشخصات موتیف‌های شناسایی شده در پروتئین‌های *GmHSP60* توسط برنامه MEME

موتیف	طول موتیف	توالی موتیف	E-value	مستندسازی
Motif	Motif length	Motif sequence		Annotation
1	50	DGKSLNELEVVEGMKLDGRGYISPYFVTNQKKQKVELENPKILIHDKKIS	2.2e-344	-
2	29	NPAAKLLVZVAKAQBDEAGDGTFTTVVLA	9.4e-338	Cpn60_TCP1 domain
3	21	GVKAVADAVKTTLGPKGMBKM	1.5e-249	-
4	29	ELDEKKRRLHDALNATKAAVEEGIVVGGG	5.4e-286	-
5	50	LIIAEDVESEALATLILNKLKRGGLKVAAIKAPGFGERRKALLQDJAILTG	8.8e-312	-
6	29	ANLGYBAATGEYEDMVEAGIIDPLKVKRC	1.0e-228	-
7	50	DDTTILDDASTKKAIEERVEQJRKAJENSTSDYDKEKLQERJAKLSGGVA	1.7e-242	-
8	50	ALAKTLPGKEQLAIEAFAEALVIPRTLAENAGLBAIEIITALRAEHAKG	2.2e-278	Cpn60_TCP1 domain
9	29	GEKLVAAGIHPTVJIRGIEKAVRAAVEEL	1.4e-201	-
10	41	RMISTSEEIAAVASISAGNEREIGELIAEAMEKVGKEGVIT	7.8e-195	-
11	21	DSSGDPKVTNDGVTILKEIEL	3.0e-191	-
12	33	ZKIGADIIQNALKAPVKTIASNAGVEGAVVVEK	1.2e-156	-
13	50	DDLALHYLAKAGILAIRVRKDELERIAKATGGVIVNRFDELEPEKLGVA	4.4e-205	Cpn60_TCP1 domain
14	21	AJLTATEAACMILRVDDIIVP	3.8e-086	-
15	29	LJKCAKTTLSSKJVSQDKDLLADLAVDAV	3.9e-095	-
16	21	ELGLTLEKVDSEMLGTAKKVT	9.4e-070	-
17	21	SSRNASAKDIKFGVDARAAML	8.9e-065	-
18	15	MGKACTILLRGANDH	1.9e-049	-
19	21	RDSFLVEGIVLDKGISHPGMP	6.9e-036	-
20	41	PYIILLDVPLEYKKGENTNAELLKEEDWSLLKMEEEYIE	7.8e-046	-

### تجزیه و تحلیل توالی پروموتور ژن‌های *GmHSP60*

تجزیه و تحلیل عناصر سیس، روشی مؤثر جهت پیش‌بینی مکانیسم‌های تنظیمی در مرحله رونویسی است (Mohammadi *et al.*, 2022). با تجزیه و تحلیل پروموتورها، عناصر تنظیمی سیس پاسخ‌گو به تنش‌های زیستی و غیرزیستی (خشکی، شوری، گرما، سرما، نور)، عناصر سیس اختصاصی پاسخ‌گو به فیتوهورمون‌ها و مرتبط با رشد و نمو در نواحی پروموتور شناسایی شدند (شکل ۵). عناصر Box4، MYC، ARE و MYB در بین عناصر غیرزیستی پاسخ‌گو به تنش غالب بودند، به طوری که به ترتیب در ۱۰۰، ۹۷، ۸۸ و ۸۱ درصد پروموتور ژن‌های *GmHSP60* یافت شدند. عناصر تنظیمی سیس پاسخ‌گو به تنش‌های پاتوژن و آسیب‌های مکانیکی در نواحی پروموتوری ۷۵ درصد از ژن‌های *GmHSP60* مشاهده شد. علاوه بر این، ۵۶ درصد از ژن‌ها دارای عناصر تنظیمی سیس پاسخ‌گو به تنش‌های گرما، pH

پایین، کمبود مواد مغذی و تنش اسمزی در نواحی پروموتور خود بودند. عناصر TC-rich repeats (دفاعی و پاسخ‌گو به تنش) و LTR (پاسخ‌گو به دمای پایین) به ترتیب در ۵۳ و ۲۸ درصد از پروموتورهای ژن‌ها مشاهده گردید. بیشتر ژن‌های *GmHSP60* دارای عناصر تنظیمی ERE (۲۴ ژن، عنصر سیس پاسخ‌گو به اتیلن)، ARBE (۱۷ ژن، عنصر سیس پاسخ‌گو به آبسیزیک‌اسید)، CGTCA-motif و TGACG-motif (۱۲ ژن، عنصر تنظیمی پاسخ‌گو به جاسمونیک‌اسید) بودند (شکل ۵).

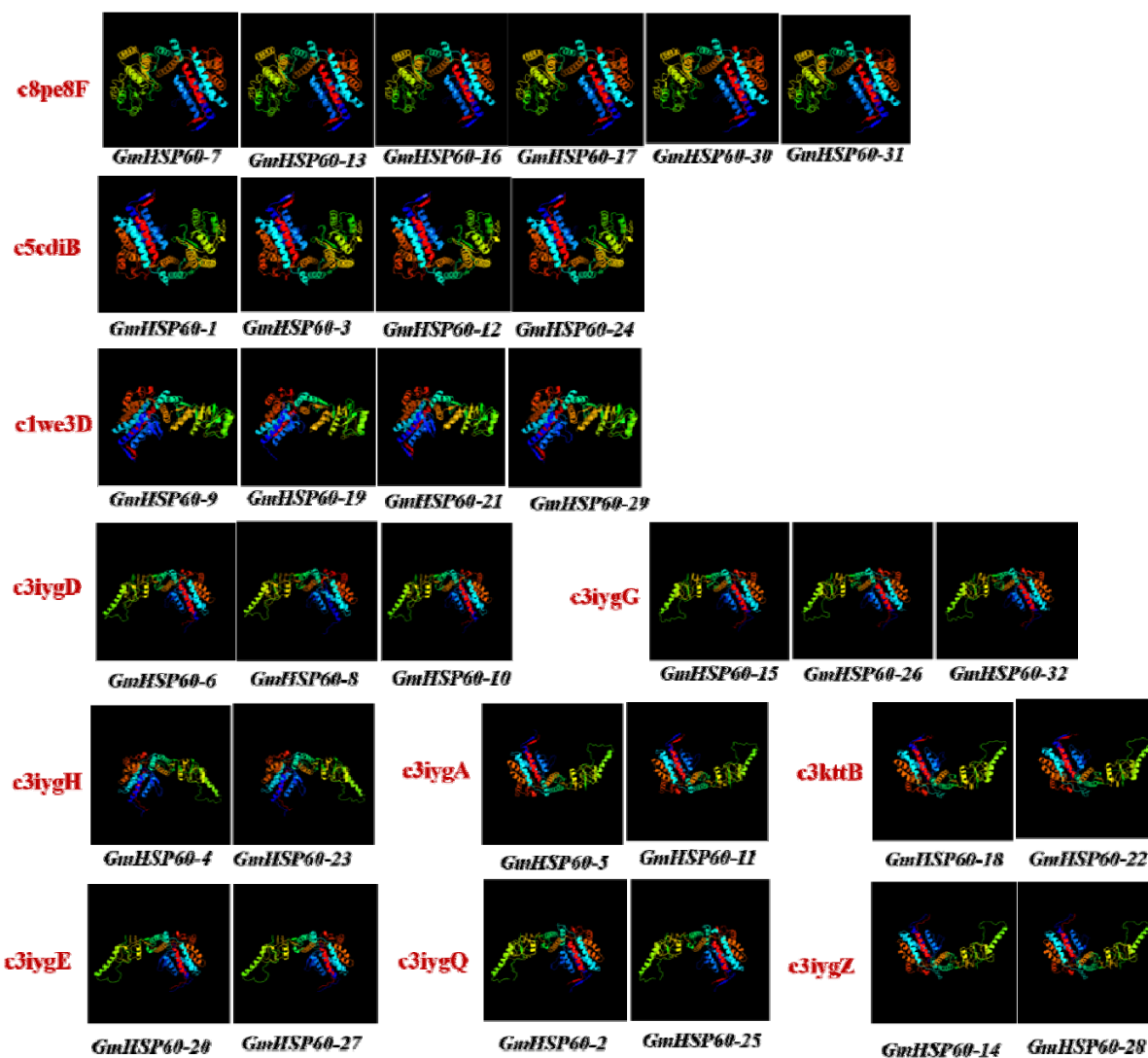
تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های خانواده *GmHSP60* نشان داد که آن‌ها ممکن است با تحمل به تنش‌های غیرزیستی و زیستی همراه با سایر عناصر پاسخ‌گو به رشد مرتبط باشند. وجود عناصر پاسخ‌گو به ABA در نواحی پروموتور نشان می‌دهد که این ژن‌ها ممکن است در مسیر وابسته به ABA فعالیت داشته باشند که بیانگر نقش HSP60 در تنش‌های متعدد می‌باشد (Nagaraju *et al.*, 2021).

	Plant growth and development						Phytohormones responsiveness										Biotic/abiotic stress																				
	CAT-box	GCN4_motif	Myb-binding site	O2-site	CCGTCC motif	ctrcadian	ABRE	ABRE3a	AuxRR-core	TGA-element	TCA-element	CGTCA-motif	TCACC-motif	GARE-motif	P-box	ERE	G-Box	Box 4	I-box	TCT-motif	WUN-motif	W box	WRE3	TC-rich repeats	AP-1	ARE	STRE	LTR	as-1	MBS	DRE core	MYC	MYB				
GmHSP60-1											2	2			1	2	6			2	1		1		4						3	4	4				
GmHSP60-2	1									1						3	1			2	1		1		1		1					2	2	3			
GmHSP60-3							1									1	2	6		1				1		2		2					2	3	3		
GmHSP60-4							3				1	1			1		2	3		2			1		2	1			1				3	1	1		
GmHSP60-5							2		1							4	2	3		1				1		2							3	1	1		
GmHSP60-6		1	1													5	2			2					2	2	1						1	4	4		
GmHSP60-7		2				2	1									1	1			1			1		1	2						1	1	2	2		
GmHSP60-8			2				3	2								3	5		1					1		5	2						7		7		
GmHSP60-9	1								1							1	1		1		2			3		2					1	5		5	5		
GmHSP60-10							2		1	1	3	3			3	1	2			3			1	1	1		1		3	1		1	4	4	4		
GmHSP60-11	1										1	1				8	1	3	1		2				1	2	1	1				3	2	2	2		
GmHSP60-12			1				1				1	1	1			1	2	1	1	1	1			1					1	1	1	1	2	2	5	5	
GmHSP60-13											1	1				4		5		2			1	1	2	1	1	1	1	1			1	1	1	1	
GmHSP60-14									2	1	1	2	2			1	2			3					1	1	1	1	2				5	3	3	3	
GmHSP60-15									1							3	1		4		1				1	1	1	1	1				1	1	1	1	
GmHSP60-16							3		1							1	3	1		2	1				1	1	1						4	2	2	2	
GmHSP60-17	1						1								1	2	2	2	1		1		2		1	1	1	1	2				3	1	1	1	
GmHSP60-18			2		1												1						2	1	1	1	2						4	3	3	3	
GmHSP60-19							1	1			2					1	2	2	1	1		2			2	2				1			3	3	3	3	
GmHSP60-20	1		1				2	1			1	2	1	3	1		3	1		1	2	1		2		5	1					1	2	1	2	2	
GmHSP60-21		1	1				2							1		2		4			1		1	2		2						2	4	3	3	3	
GmHSP60-22			1	1							1					1								1	1	1	1						5	1	1	1	
GmHSP60-23			1				2	1				1	1				3	2		1	1			1	1								5	2	2	2	
GmHSP60-24	1						1									2	2	1	1		2			1	1	2		1				2	2	1	1	1	
GmHSP60-25	1															2	3	3		1	3			1	2	1							1	1	1	1	
GmHSP60-26											1	1				3	4	1						1										3	3	3	3
GmHSP60-27			1						1		2						3				1		1		1								5	2	2	2	
GmHSP60-28							1			2						1	1	3			2			1		3	3			1			2	2	2	2	
GmHSP60-29		1	2				6							1		2	2			2				1		3				2	1	1	2	2	2	2	
GmHSP60-30							2	1	1								1	1	1	1	1	1			1	1	1						7	2	2	2	
GmHSP60-31							1	1								2	1	5			1			1		1	1	1					5	1	1	1	
GmHSP60-32			1				1									1	1	1			2				1	1	1	1					1	2	2	2	

شکل ۵. شناسایی عناصر تنظیمی سیس در پروموتور ژن‌های *HSP60* سویا. تجزیه و تحلیل تعداد عناصر تنظیمی سیس با استفاده از برنامه

PlantCARE انجام شد. رنگ‌ها و اعداد مختلف، تعداد عناصر مختلف موجود در پروموتور ژن‌های *GmHSP60* را نشان می‌دهد.





شکل ۷. پیش‌بینی ساختارهای سه‌بعدی پروتئین‌های HSP60 سویا. برنامه Phyre2 برای تولید مدل‌های پروتئینی استفاده شد که با رنگ‌های مختلف در جهت انتهای آمینی به کربوکسیلی نشان داده شده‌اند. نام الگوی مربوط به هر زیرگروه با رنگ قرمز نشان داده شده است.

ژن‌ها در شبکه است (Saraei *et al.*, 2021). خوشه‌بندی شبکه با استفاده از الگوریتم MCODE نشان داد که این شبکه پروتئینی دارای دو خوشه می‌باشد که خوشه اول و دوم به ترتیب از ۱۶ و ۱۸ پروتئین (گره) تشکیل شده است (شکل ۸ الف). پروتئین‌های GmHSP60-2، GmHSP60-5، GmHSP60-11، GmHSP60-18، GmHSP60-22 و GmHSP60-25 بر اساس بیشترین ارتباط با سایر پروتئین‌ها، به عنوان هاب<sup>۳</sup> شناسایی شدند که با رنگ قرمز نشان داده شده‌اند (شکل ۸ ب). این امر نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین‌ها در سیگنال‌دهی پاسخ به شرایط مختلف محیطی است.

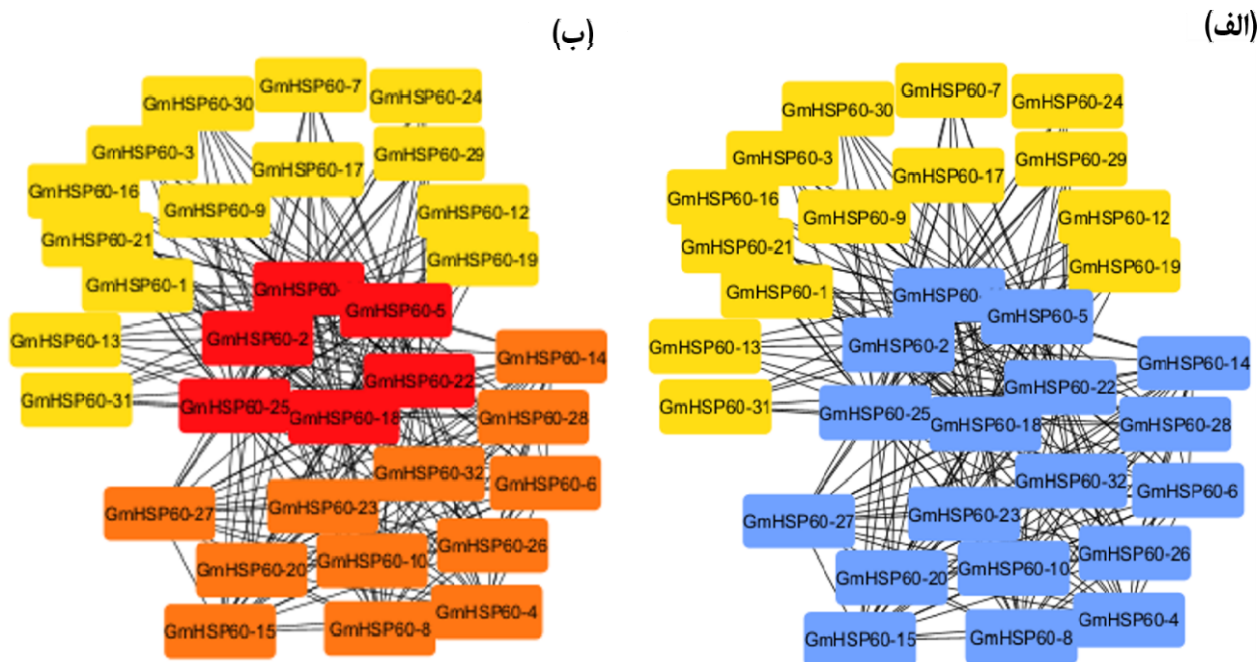
### شبکه برهم‌کنش پروتئین - پروتئین بین پروتئین‌های

#### GmHSP60

شبکه برهم‌کنش پروتئین - پروتئین با استفاده از پایگاه اطلاعاتی STRING ترسیم شد و سپس به کمک نرم‌افزار Cytoscape با استفاده از برنامه‌های Cytohubba و ClusterVis آنالیز شبکه صورت گرفت. در تعریف شبکه پروتئینی، هر پروتئین یک گره<sup>۱</sup> و هر خط ارتباطی، یک یال<sup>۲</sup> نامیده می‌شود. بنابراین هرچه تعداد گره‌ها در شبکه بیشتر باشد، نشان‌دهنده این امر است که در شبکه پروتئینی مورد بررسی ژن‌های بیشتری نقش دارند و هرچه تعداد یال‌های میان ژن‌ها بیشتر باشد، به معنای ارتباط تنگاتنگ میان

1. Node  
2. Edge

3. Hub



**شکل ۸.** شبکه برهم کنش پروتئین - پروتئین بین پروتئین‌های *HSP60* سویا. شبکه برهم کنش پروتئین - پروتئین بین پروتئین‌های *GmHSP60* با استفاده از پایگاه اطلاعاتی STRING استخراج و به کمک نرم‌افزار Cytoscape تجزیه و تحلیل شد. مستطیل‌های رنگی نشان‌دهنده گره‌ها و خطوط نمایانگر یال‌ها هستند. الف) خوشه‌بندی شبکه: مستطیل‌های آبی و زرد به ترتیب پروتئین‌های واقع در خوشه‌های اول و دوم را نشان می‌دهند. ب) تجزیه و تحلیل شبکه: پروتئین‌های واقع در مستطیل‌های قرمز به‌عنوان هاب (بیشترین ارتباط با سایر پروتئین‌ها) شناسایی شدند.

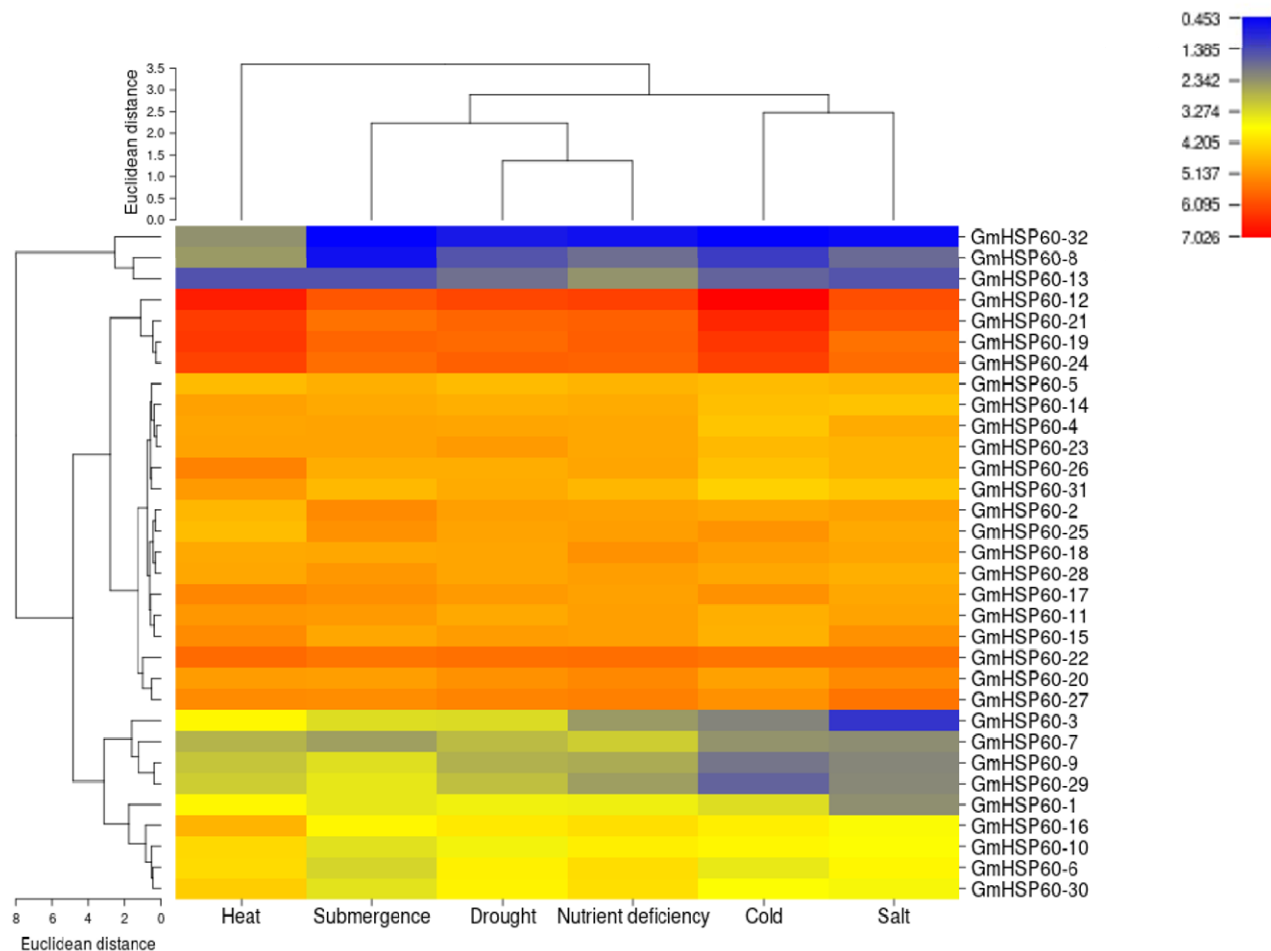
تمام تنش‌های مورد مطالعه بود. پایین‌ترین بیان در پاسخ به تنش‌ها نیز در ژن‌های *GmHSP60-8*، *GmHSP60-13* و *GmHSP60-32* مشاهده شد. بنابراین، احتمالاً این ژن‌ها در شرایط زیستی و نموی متفاوتی بیان شده و بنابراین نقش کارکردی در پاسخ به تنش‌های مورد مطالعه ندارند (Azizi & Zare, 2022).

گزارش‌های قبلی نیز حاکی از مشارکت پروتئین‌های *HSP60* در چندین فرآیند بیولوژیکی از جمله نمو گیاه و تحمل به تنش‌های غیرزیستی می‌باشد. به‌عنوان مثال، *HSP60* کلروپلاستی آرابیدوپسیس نه تنها تحت شرایط طبیعی، بلکه به محرک‌های دمای بالا و خشکی نیز پاسخ می‌دهد (Xu & Huang, 2010). بررسی الگوی بیان ژن‌های خانواده *HSP60* در سورگوم و فلفل نیز نشان‌دهنده القاء بیان این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی می‌باشد (Haq et al., 2019; Nagaraju et al., 2021). این امر می‌تواند بیانگر تشابه مکانیسم کارکردی ژن‌های *HSP60* در پاسخ گیاهان مختلف به تنش‌ها باشد.

### الگوی بیان ژن‌های *GmHSP60* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

تجزیه و تحلیل الگوی بیان خانواده ژنی می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد عملکرد آن‌ها فراهم آورد (Mao & Chen, 2012). به‌منظور درک بهتر کارکرد ژن‌های *HSP60* در سویا، الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی شامل شوری، خشکی، سرما، گرما، غرقاب و کمبود مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از داده‌های ترانسکریپتوم سویا، یک نمودار Heatmap در مقیاس  $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$  ترسیم شد (شکل ۹). همان‌گونه که در نمودار Heatmap نشان داده شده است، بیشتر ژن‌های *GmHSP60* بیان بالایی در پاسخ به تنش‌های مورد مطالعه نشان داده‌اند که این امر نشان‌دهنده وجود همپوشانی و هماهنگی آن‌ها در پاسخ به شرایط مختلف تنش‌های غیرزیستی است. همچنین این امر می‌تواند بیانگر نقش مهم این ژن‌ها در پاسخ سویا به سرما، گرما، خشکی، شوری، غرقاب و کمبود مواد غذایی باشد. بالاترین بیان مربوط به ژن‌های *GmHSP60-12*، *GmHSP60-19*، *GmHSP60-21* و *GmHSP60-24* تحت





**شکل ۹.** پروفایل بیانی ژن‌های *HSP60* سویا در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی. نمایش Heatmap، میزان تغییر بیان ژن‌های *GmHSP60* را در پاسخ به تنش‌های گرما، سرما، شوری، خشکی، غرقاب و کمبود مواد غذایی نشان می‌دهد. نوار راهنما شدت بیان ژن‌ها را نشان می‌دهد که از رنگ آبی برای بیان کم تا قرمز برای بیان بالا استفاده شده است.

خانواده ژنی در تاخوردگی و تاخوردگی مجدد پروتئین به روشی وابسته به ATP در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش دارند. از سوی دیگر الگوی بیانی ژن‌ها نشان داد که بیشتر ژن‌های *GmHSP60* دارای بیان بالایی در پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی، سرما، گرما، غرقاب و کمبود مواد غذایی بودند که این امر نشان‌دهنده وجود همپوشانی و هماهنگی آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی است. این یافته‌ها اطلاعات ما در مورد خانواده ژنی *GmHSP60* و عملکرد آن‌ها در تحمل گیاه سویا به تنش‌های محیطی افزایش داده و می‌تواند جهت غربالگری و استفاده از ژن‌های با بیان بالا نظیر *GmHSP60-12*، *GmHSP60-19*، *GmHSP60-21* و *GmHSP60-24* در تولید گیاهان تراریخته با هدف تولید گیاهان متحمل به تنش‌های غیرزیستی مختلف مفید باشد.

### نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در این مطالعه ۳۲ ژن *HSP60* در ژنوم سویا شناسایی شد که بر اساس همولوژی با پروتئین‌های *HSP60* در آرآبیدوپسیس و برنج در ۳ گروه اصلی طبقه‌بندی شدند. پروتئین‌های واقع در زیرگروه‌های مختلف از نظر ساختار ژنی، موتیف‌های حفاظت‌شده، فاز اینترون، جایگاه سلولی، ساختار سه‌بعدی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی از حفاظت‌شدگی بالایی برخوردار بوده که این امر می‌تواند بیانگر شباهت‌های کارکردی آن‌ها در زیرگروه‌های مختلف باشد. وجود عناصر تنظیمی پاسخ‌گو به تنش‌ها، رشد و نمو و هورمون‌ها با فراوانی متفاوت نظیر ERE، MYB، MYC و LTR می‌تواند حاکی از نقش آن‌ها در رشد و نمو گیاه و همچنین تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی باشد. بر اساس تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO)، مشخص شد که این

## References

- Abbas, M., Li, Y., Elbaiomy, R. G., Yan, K., Ragauskas, A. J., Yadav, V., Soaud, S. A., Islam, M. M., Saleem, N., & Noor, Z. (2022). Genome-wide analysis and expression profiling of *SIHsp70* gene family in *Solanum lycopersicum* revealed higher expression of *SIHsp70-11* in roots under Cd<sup>2+</sup> stress. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 27(6), 186.
- Azizi, S., & Zare, N. (2022). Genome-wide identification and functional analysis of *lipoxxygenase (LOX)* gene family in some *Fabaceae* species using bioinformatics methods. *Crop Biotechnology*, 11(37), 77-97.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37, 202-208.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, 353(6294), aac4354.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., & Sigler, P. B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*, 371(6498), 578-586.
- Conesa, A., & Götz, S. (2008). Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 619832.
- Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Stetter, K. O., Huber, H., Huber, R., & Steinbacher, S. (1998). Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell*, 93(1), 125-138.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., & Sangrador-Vegas, A. (2015). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44, 279-285.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In J. M. Walker (Ed.), *The proteomics protocols handbook* (pp. 571-607). New York City, New York, United States: Humana Press.
- Guo, M., Liu, J. H., Ma, X., Luo, D. X., Gong, Z. H., & Lu, M. H. (2016). The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 114.
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences*, 86(11-12), 377-384.
- Haq, S. u., Khan, A., Ali, M., Gai, W.-X., Zhang, H. X., Yu, Q. H., Yang, S. B., Wei, A. M., & Gong, Z. H. (2019). Knockdown of *CaHSP60-6* confers enhanced sensitivity to heat stress in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Planta*, 250, 2127-2145.
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324-332.
- Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., & Ellis, R. J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*, 333(6171), 330-334.
- Hill, J. E., & Hemmingsen, S. M. (2001). *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 190.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35, 585-587.
- Hsu, Y. W., Juan, C. T., Wang, C. M., & Jauh, G. Y. (2019). Mitochondrial heat shock protein 60s interact with what's this factor 9 to regulate RNA splicing of *ccmFC* and *rpl2*. *Plant and Cell Physiology*, 60(1), 116-125.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Hu, W., Hu, G., & Han, B. (2009). Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. *Plant Science*, 176(4), 583-590.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., & Nuka, G. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., Ouyang, S., Schwartz, D. C., Tanaka, T., Wu, J., & Zhou, S. (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next

- generation sequence and optical map data. *Rice*, 6(1), 4.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858.
- Kim, S.-R., Yang, J.-I., & An, G. (2013). OsCpn60 $\alpha$ 1, encoding the plastid chaperonin 60 $\alpha$  subunit, is essential for folding of rbcL. *Molecules and Cells*, 35, 402-409.
- Kim, T., Samraj, S., Jiménez, J., Gómez, C., Liu, T., & Begcy, K. (2021). Genome-wide identification of heat shock factors and heat shock proteins in response to UV and high intensity light stress in lettuce. *BMC Plant Biology*, 21, 1-20.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., & Garcia-Hernandez, M. (2012). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1202-D1210.
- 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.
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., & Pang, E. (2012). Abiotic stress responses in plants: present and future. *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*, 1-19.
- Mao, D., & Chen, C. (2012). Colinearity and similar expression pattern of rice DREB1s reveal their functional conservation in the cold-responsive pathway. *PloS One*, 7(10), e47275.
- Martel, R., Cloney, L. P., Pelcher, L. E., & Hemmingsen, S. M. (1990). Unique composition of plastid chaperonin-60:  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptide-encoding genes are highly divergent. *Gene*, 94(2), 181-187.
- Mohammadi, S., Nematzadeh, G., Najafi Zarrini, H., & Hashemi-petroudi, S. (2022). Abiotic stress-related Cis-elements analysis in promoters of *Aeluropus littoralis* NAC genes. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 35(3), 632-648.
- Moore, R. C., & Purugganan, M. D. (2003). The early stages of duplicate gene evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15682-15687.
- Nagaraju, M., Kumar, A., Jalaja, N., Rao, D. M., & Kishor, P. (2021). Functional exploration of chaperonin (HSP60/10) family genes and their abiotic stress-induced expression patterns in *Sorghum bicolor*. *Current Genomics*, 22(2), 137-152.
- Nishio, K., Hirohashi, T., & Nakai, M. (1999). Chloroplast chaperonins: evidence for heterogeneous assembly of  $\alpha$  and  $\beta$  Cpn60 polypeptides into a chaperonin oligomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266(2), 584-587.
- Pareek, A., Sopory, S. K., & Bohnert, H. J. (2010). *Abiotic stress adaptation in plants* (Vol. 10). Berlin: Springer Dordrecht.
- Peng, L., Fukao, Y., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., & Shikanai, T. (2011). A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *PLoS Biology*, 9(4), e1001040.
- Prasad, T. K., Hack, E., & Hallberg, R. L. (1990). Function of the maize mitochondrial chaperonin hsp60: specific association between hsp60 and newly synthesized F1-ATPase alpha subunits. *Molecular and Cellular Biology*, 10(8):3979-3986.
- Prasad, T. K., & Stewart, C. R. (1992). cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. *Plant Molecular Biology*, 18, 873-885.
- Rao, P. K., Roxas, B. A., & Li, Q. (2008). Determination of global protein turnover in stressed mycobacterium cells using hybrid-linear ion trap-fourier transform mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(2), 396-406.
- Ruggero, D., Ciammaruconi, A., & Londei, P. (1998). The chaperonin of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is an RNA-binding protein that participates in ribosomal RNA processing. *The EMBO Journal*, 17(12), 3471-3477.
- Saibil, H. R., Fenton, W. A., Clare, D. K., & Horwich, A. L. (2013). Structure and allostery of the chaperonin GroEL. *Journal of Molecular Biology*, 425(9), 1476-1487.
- Saraei, F., Amini, K., Haddadi, A., & Larypoor, M. (2021). In search of *Zrt1* gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae* under different concentrations of zinc in medium. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(3), 397-411.
- Scherf, U., Ross, D.T., Waltham, M., Smith, L.H., Lee, J.K., Tanabe, L., Kohn, K.W., Reinhold, W.C., Myers, T.G., & Andrews, D.T. (2000). A gene

- expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature Genetics*, 24(3), 236-244.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504.
- Singh, R. K., Jaishankar, J., Muthamilarasan, M., Shweta, S., Dangi, A., & Prasad, M. (2016). Genome-wide analysis of heat shock proteins in C4 model, *foxtail millet* identifies potential candidates for crop improvement under abiotic stress. *Scientific Reports*, 6(1), 32641.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., & Bork, P. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607-D613.
- Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., & Kumar, A. (2010). MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling & Behavior*, 5(11), 1370-1378.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2003). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*, 1, 2-3.
- Tran, L.-S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell*, 16(9), 2481-2498.
- Turhan, E., Ergin, S., Aydoğan, C., & Ozturk, N. (2016). Influence of grafting on heat shock proteins of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) plants under heat stress. *Journal of Biotechnology*(231), S27.
- Vaughan, M. M., Block, A., Christensen, S. A., Allen, L. H., & Schmelz, E. A. (2018). The effects of climate change associated abiotic stresses on maize phytochemical defenses. *Phytochemistry Reviews*, 17, 37-49.
- Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 579-620.
- Voorrips, R. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1), 77-78.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244-252.
- Weiss, C., Bonshtien, A., Farchi-Pisanty, O., Vitlin, A., & Azem, A. (2009). Cpn20: siamese twins of the chaperonin world. *Plant Molecular Biology*, 69, 227-238.
- Wilson, R. H., & Hayer-Hartl, M. (2018). Complex chaperone dependence of Rubisco biogenesis. *Biochemistry*, 57(23), 3210-3216.
- Xu, C., & Huang, B. (2010). Comparative analysis of drought responsive proteins in *Kentucky bluegrass* cultivars contrasting in drought tolerance. *Crop Science*, 50(6), 2543-2552.
- Yer, E. N., Baloglu, M. C., & Ayan, S. (2018). Identification and expression profiling of all *Hsp* family member genes under salinity stress in different poplar clones. *Gene*, 678, 324-336.
- Zhang, J., Liu, B., Li, J., Zhang, L., Wang, Y., Zheng, H., Lu, M., & Chen, J. (2015). *Hsf* and *Hsp* gene families in *Populus*: genome-wide identification, organization and correlated expression during development and in stress responses. *BMC Genomics*, 16(1), 1-19.
- Zhang, L., Zhao, H. K., Dong, Q. I., Zhang, Y. Y., Wang, Y. M., Li, H. Y., Xing, G. J., Li, Q. Y., & Dong, Y. S. (2015). Genome-wide analysis and expression profiling under heat and drought treatments of *HSP70* gene family in soybean (*Glycine max* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6, 773.

**ORIGINAL ARTICLE**

# Analysis of root proteome in wheat (Kavir variety) under drought stress

Samira Mardani Zonouz<sup>1</sup>, Mahmoud Toorchi<sup>1\*</sup>, Shaghayegh Aslzad<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

**Correspondence**

Mahmoud Toorchi  
Email: [mtoorchi@tabrizu.ac.ir](mailto:mtoorchi@tabrizu.ac.ir)

**How to cite**

Mardani Zonouz, S., Toorchi, M., & Aslzad, Sh. (2023). Analysis of root proteome in wheat (Kavir variety) under drought stress. *Crop Biotechnology*, 12(43), 29-41.

**Abstract**

Drought is one of the most important factors causing abiotic stress in plants. Wheat, as a vital crop, is extensively cultivated in regions that face water scarcity at least during one period of the year. Proteomic approach is one of the ways to identify proteins involved in plant tolerance to water stress. In order to investigate the effect of water deficit stress on the root proteome pattern of desert-tolerant wheat, an experiment was conducted in the form of a completely randomized design with seven replications. Root proteins were extracted by TCA/acetone method and the protein expression pattern was analyzed using two-dimensional electrophoresis. Potential proteins involved in the response to water deficiency were identified by comparing the protein expression patterns under water deficit stress with the expression pattern in control conditions. The results revealed significant differences in root weight and root length at a 5% probability level, indicating the detrimental effects of water stress on plant roots. The proteomic analysis identified 98 reproducible protein spots, of which 10 exhibited statistically significant changes, with eight spots showing increased expression and one showing decreased expression. These protein spots were identified based on their molecular weight (*MW*) and isoelectric point (*pI*) through database searches. The identified proteins were classified into various functional categories related to stress response, including protein synthesis and accumulation, oxidative stress, response and defense against stress and metabolic pathways.

**KEY WORDS**

Protein extraction, two-dimensional electrophoresis, expression pattern, isoelectric point.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://croptech.journals.pnu.ac.ir/>

نشریه علمی

## زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

# تجزیه پروتئوم ریشه گندم رقم کویر تحت تنش کمبود آب

سمیرا مردانی زنوز، محمود تورچی\*، شقایق اصل زاد

### چکیده

خشکی یکی از مهمترین عوامل ایجادکننده تنش غیرزیستی در گیاه محسوب می‌شود. گندم به عنوان یک گیاه زراعی مهم، اغلب در مناطقی کشت می‌شود که حداقل در دوره‌ای از سال با کم‌آبی مواجه است. یکی از راهکارهای شناسایی پروتئین‌های درگیر در تحمل گیاه به تنش کمبود آب رهیافت پروتئومیک است. به منظور بررسی اثر تنش کمبود آب بر الگوی پروتئوم ریشه گندم رقم متحمل کویر، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت تکرار انجام شد. استخراج پروتئین‌های ریشه به روش TCA/استون انجام و الگوی بیان پروتئینی با استفاده از الکتروفورز دوبعدی بررسی گردید. پروتئین‌های احتمالی درگیر در تنش کمبود آب با مقایسه الگوی بیان تحت تنش کمبود آب با الگوی بیان در شرایط کنترل شناسایی شد. نتایج نشان داد که اختلاف بین تیمارها برای صفات وزن تر ریشه و طول ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار ولی برای صفات وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی و وزن تر اندام هوایی از نظر آماری معنی‌دار نبود. بررسی الگوی بیان پروتئوم ریشه، ۹۸ نقطه پروتئینی تکرارپذیر را نشان داد که از میان آنها تعداد ۱۰ نقطه از لحاظ آماری دارای اختلاف بیان معنی‌دار بین شرایط کنترل و تنش بودند. از این تعداد هشت نقطه افزایش بیان و یک نقطه کاهش بیان را نشان دادند. این نقطه‌های پروتئینی بر اساس وزن مولکولی (Mw) و نقطه ایزوالکتریک (pI) با جستجو در بانک‌های اطلاعاتی شناسایی شدند. پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش در گروه‌های عملکردی مختلف قرار دارند. این گروه‌ها شامل سنتز و تجمع پروتئین، تنش اکسایشی، پاسخ و دفاع در برابر تنش و مسیرهای متابولیکی بودند.

### واژه‌های کلیدی

استخراج پروتئین، الکتروفورز دوبعدی، الگوی بیان، نقطه ایزوالکتریک.

گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

نویسنده مسئول:

محمود تورچی

رایانامه: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

استناد به این مقاله:

مردانی زنوز، سمیرا، تورچی، محمود و شقایق اصل‌زاد (۱۴۰۲). تجزیه پروتئوم ریشه گندم رقم کویر تحت تنش کمبود آب. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۳)، ۲۹-۴۱.

## مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) به عنوان یک گیاه زراعی شناخته شده، از زمان اهلی شدن تاکنون همواره مورد توجه بشر بوده و بیشترین سطح زیر کشت را در بین محصولات زراعی به خود اختصاص داده است. گندم به عنوان اصلی ترین غله در بسیاری از مناطق جهان، غذای عمده اکثر مردم را تشکیل می‌دهد (Shewry, 2009). با این وجود، اغلب مناطق تولید گندم در جهان در بخشی از فصل رشد با کمبود آب مواجه هستند. میزان تولید گندم طبق آخرین آمار سازمان خوار و بار جهانی سازمان ملل متحد در سال ۲۰۱۶ برابر با ۷۴۹ میلیون تن بود که این میزان در کشور ایران در همان سال حدود ۱۱/۱ میلیون تن بوده است. آمارها حاکی از کاهش تولید گندم هم در سطح جهان و هم در ایران است (Naghavi et al., 2015). دوره‌های با کمبود آب اغلب در چرخه‌ی زندگی گیاه، حتی در گیاهانی که خارج از نواحی خشک و نیمه خشک رشد می‌کنند مانند گیاهان جنگل‌های مناطق معتدله رخ می‌دهد (Wilson et al., 2001).

کمبود آب یکی از مهمترین عوامل تنش‌زای محیطی است که تولید محصولات کشاورزی را در مناطق خشک و نیمه‌خشک تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش قابل توجه عملکرد می‌شود. بطور کلی تنش کمبود آب زمانی اتفاق می‌افتد که آب قابل استفاده در خاک کاهش می‌یابد و شرایط اتمسفری نیز به کاهش میزان آب از طریق تبخیر و تعرق ادامه می‌دهد (Valizadeh-Kamran et al., 2017). تحمل به تنش کمبود آب در اکثر گیاهان دیده می‌شود اما از گونه‌ای به گونه‌ی دیگر و حتی درون افراد یک گونه متفاوت است. استراتژی گیاهان برای مقابله با خشکی معمولاً شامل ترکیبی از دو عمل اجتناب از تنش و تحمل تنش می‌باشد که بسته به ژنوتیپ متفاوت است (Nakayama, 2007). تحمل در برابر تنش‌های غیر زیستی بسیار پیچیده است و بستگی به اثر متقابل عوامل تنش‌زا و انواع مختلفی از فرآیندهای مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی دارد که طی رشد و نمو گیاه رخ می‌دهند (Razmjoo et al., 2008). کمبود آب فرآیندهای بیوشیمیایی متعدد شامل فتوسنتز، سنتز پروتئین و تجمع مواد محلول را تغییر می‌دهد. از جمله رایج‌ترین پاسخ‌ها به کمبود آب نشت الکترون از غشای تیلاکوئیدی در کلروپلاست، آسیب به کلروفیل، کاهش فتوسنتز، افزایش تولید  $H_2O_2$  و  $O_2^-$ ، پراکسیداسیون لیپیدی، اثرات منفی روی طویل شدن سلول، کاهش دسترسی سلول به آب و پسابیدگی (دهیدراسیون) است

(Qureshi et al., 2007). یکی از اولین رویدادهایی که تحت شرایط خشکی ادامه می‌یابد بسته شدن روزنه‌ها در پاسخ به انتقال اجزا شیمیایی سنتز شده در ریشه‌های دهیدراته (مثل اسید آبسزیک) می‌باشد. مطالعات نشان داده است که تغییرات بیان ژن در سطح رونویسی اغلب رابطه‌ای با تغییرات در سطح پروتئین ندارد. بنابراین مطالعه تغییرات پروتئوم گیاهان در پاسخ به تنش‌ها مهم و سودمند می‌باشد. بسیاری از پروتئین‌ها تحت تغییرات پس از ترجمه قرار می‌گیرند که قابل رهایی با تجزیه ترانسکریپتوم نیست (Kosová et al., 2011). گیاهان با القای تولید دسته‌ای از پروتئین‌های تنشی که موجود را از آسیب سلولی محافظت می‌کنند، به انواع تنش‌های محیطی پاسخ می‌دهند. بنابراین، با مطالعه الگوی پروتئوم، درک ساز و کار پاسخ به تنش کم آبی امکانپذیر است (Kamal et al., 2010). از آنجایی که پروتئین‌ها به طور مستقیم در پاسخ به تنش‌های محیطی درگیر هستند، تجزیه پروتئوم یک روش ایده‌آل شناسایی الگوی بیان و عملکرد پروتئین‌های مرتبط با تنش است. پروتئین‌ها نه تنها شامل آنزیم‌های کاتالیز کننده تغییرات در سطح متابولیت بلکه شامل فاکتورهای رونویسی و ترجمه نیز می‌باشند که پاسخ گیاه به تنش را در سطوح رونوشت و پروتئین تنظیم می‌کنند (Shahbazi et al., 2023). پروتئین‌ها عملکردهای سازگاری به تنش را جهت‌دهی می‌کنند که منجر به بروز تغییر در غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم سلولی، بعلاوه ترکیب اجزای داخل سلولی می‌شوند که در نهایت خصوصیات آنها مثل تمایل سیتوپلاسم سلولی به آب را تغییر می‌دهد. ژن‌های شناسایی شده توسط پروتئومیک می‌تواند در برنامه‌های اصلاح به کمک نشانگر و انتقال ژن برای بهبود تحمل به تنش مفید باشد (Kamal et al., 2010).

در این پژوهش به بررسی تاثیر کمبود آب بر پروتئوم ریشه گندم و نقش پروتئین‌ها در پاسخ به این تنش پرداخته می‌شود.

## روش‌شناسی پژوهش

### مواد گیاهی و روش انجام آزمایش

در این پژوهش از رقم گندم متحمل به تنش کمبود آب به نام "کویر" استفاده شد. بذور این رقم از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. رشد گیاهان در شرایط کنترل شده در محیط آزمایشگاه پروتئومیک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. برای اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی، تعداد ۱۰ بذر در گلدان‌های پلاستیکی استوانه‌ای با قطر ۱۰ سانتیمتر و ارتفاع

یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و هر ۱۵ دقیقه یکبار چند ثانیه به صورت دستی تکان داده شدند. پس از آن، نمونه‌ها با تنظیمات ۹۰۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ (Hermle z326 K) شدند. به هر نمونه ۱/۵ میلی‌لیتر محلول شستشو افزوده شد که ترکیب آن استون ۵۰ میلی‌لیتر و مرکاپتواتانول ۷۰ میکرولیتر می‌باشد. سپس نمونه‌ها به تنظیمات ۲۰۰۰ دور در دمای چهار درجه بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب پروتئینی حاصل درون هاون خشک و سپس خرد شد. ۱۰ میلی‌گرم از رسوب خشک وزن شد و به آن ۲۰۰ میکرولیتر بافر حلال افزوده شد. نمونه‌ها با استفاده از میله شیشه‌ای حدود ۵ دقیقه هم‌زده و سپس چند دقیقه ورتکس شدند. بعد از آن، نمونه‌ها با تنظیمات ۲۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ و سپس سوپرناتانت جمع‌آوری شدند. محلول پروتئینی آماده برای بارگذاری در برنامه الکتروفورز می‌باشد. در مرحله بعد، بافر حلال یک دوم با ترکیب یک به یک با آب دیونیزه به مقدار ۶۰ میکرولیتر تهیه شد. در نهایت، برای انجام الکتروفورز، نمونه‌ها در لوله‌های شیشه‌ای با اضافه کردن مواد مناسب و با تنظیمات مشخص به دستگاه الکتروفورز منتقل شدند و در برنامه تعریف شده برای دستگاه منبع برق، الکتروفورز اجرا گردید.

#### جدول ۱. ترکیب محلول استخراج پروتئین

مقدار	موارد مورد استفاده
۵ میلی‌لیتر	TCA 100%
۴۵ میلی‌لیتر	استون
۷۰ میلی‌لیتر	۲۰- مرکاپتواتانول
۵۰ میلی‌لیتر	حجم نهایی مورد استفاده

### الکتروفورز دو بعدی

#### الکتروفورز بعد اول

در الکتروفورز بعد اول، پروتئین‌ها بر اساس بارالکتریکی در میدان الکتریکی از یکدیگر جدامی‌شوند. برای تهیه ژل بعد اول از مواد آورده، پلی آکریل آمید ۳۰ درصد، پرسولفات آمونیوم (APS)، آمفولین‌ها با دو pH (۳-۱۰ و ۵-۸) و Nonidet P-40 با مقادیر مشخص استفاده شد. همچنین، از تترا اتیل متیلن دی آمین (TEMED) به عنوان غلیظ‌کننده برای رسیدن به شرایط ایده‌آل در الکتروفورز استفاده شد. الکتروفورز بعد اول با سه ولتاژ ۲۰۰ ولت به مدت نیم ساعت، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک

۱۵ سانتیمتر، حاوی ماسه شسته الک‌شده کاشته شد. دمای روز طی رشد ۲۵ و دمای شب ۱۹ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در معرض تابش نور خورشید با شدت نور حدود ۱۰۰۰ میکرومول بر متر بر ثانیه، و دوره روشنایی ۱۴ ساعت در شبانه روز قرار گرفتند (Torabian et al., 2018).

### طرح آزمایشی و نحوه اعمال تنش کمبود آب

آزمایش بصورت طرح کاملاً تصادفی با هفت تکرار انجام شد. آبیاری عادی و تنش کمبود آب تیمارهای آزمایش را تشکیل دادند. آبیاری گلدان‌های شاهد بصورت روزانه انجام شدند. تنش با قطع آبیاری در مرحله دوبرگی برای گلدان‌های تحت تنش بمدت هفت روز اعمال شد. پس از مشاهده علائم ظاهری تنش، بوته‌ها برای اندازه‌گیری صفات زراعی مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج پروتئین، نمونه‌های ریشه با احتیاط و با دقت شسته شده و برای استخراج عصاره پروتئینی استفاده گردید.

پس از اندازه‌گیری وزن تر بخش‌های هوایی، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت داخل آون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس وزن خشک بخش هوایی برحسب میلی‌گرم تعیین شد. برای اندازه‌گیری صفات مرتبط با ریشه گیاهان، ریشه‌ها از محل طوقه بریده شده و پس از شستشوی کامل خاک ریشه و خشک کردن آب سطحی آنها توسط کاغذ خشک‌کن، وزن آنها برحسب میلی‌گرم اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک ریشه‌ها، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت داخل آون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس وزن خشک آنها برحسب میلی‌گرم تعیین شد. طول ریشه‌ها با اندازه‌گیری میانگین طول ۱۰ ریشه تصادفی از هر گلدان از محل طوقه تا نوک ریشه برحسب سانتیمتر بوسیله خط‌کش تعیین گردید.

### استخراج پروتئین

ریشه‌های چندروزه پس از شستشوی کامل با قیچی بریده و ۰/۵ گرم از آن در هاون چینی خرد شدند. پس از خرد کردن، حدود ۰/۲ گرم پودر حاصله به تیوپ ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و به آن ۱/۸ میلی‌لیتر محلول استخراج افزوده شد که دارای TCA (تری کلرو استیک اسید) بود (جدول ۱). تیوب حاوی محلول استخراج و نمونه پودر شده به مدت یک دقیقه ورتکس شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه سونیکیت شد. نمونه‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگه داشته شدند سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در



سطوح تنش انجام‌شد. در نهایت نقاطی که تغییرات بیان معنی‌دار داشتند از بین کلیه نقطه‌ها مشخص و روند افزایشی و یا کاهش‌ی آنها طی تنش کمبود آب براساس شاخص IF مشخص شدند. نقاطی که دارای IF بالاتر از دو بودند نقطه‌های پروتئینی با افزایش بیان و نقاطی که IF کمتر از ۰/۵ داشتند به عنوان نقطه‌های پروتئینی با کاهش بیان معرفی شدند. شاخص IF براساس رابطه زیر محاسبه گردید:

$$IF = \frac{\text{درصد حجمی نقطه‌های پروتئینی در حالت تنش}}{\text{درصد حجمی نقطه‌های پروتئینی در حالت شاهد}}$$

برای شناسایی پروتئین‌ها، از پایگاه‌های اطلاعاتی اینترنتی مانند UniProt، ExPASy، Wheat proteomics، NCBI و مقالات منتشر شده استفاده‌شد. با مقایسه نقطه ایزوالکتریک ( $pI$ ) و وزن مولکولی ( $MW$ ) پروتئین‌های حاصل از این آزمایش با پروتئین‌های موجود در این داده‌ها پایگاه‌ها و مقالات پروتئین‌ها شناسایی شدند.

## یافته‌های پژوهش

### تجزیه و تحلیل صفات اندازه‌گیری شده

ابتدا آزمون نرمال بودن برای داده‌های صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه انجام شد و نتایج نشان داد که کلیه صفات دارای توزیع نرمال بودند. نتایج حاصل از آزمون  $t$  در جدول ۲ آمده‌است. اختلاف بین شرایط تنش برای صفات وزن تر ریشه، و طول ریشه از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد که نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین سطوح تنش از لحاظ این صفات است ولی برای صفات وزن خشک اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی و وزن خشک ریشه، معنی‌دار نشد. نمونه‌برداری در مراحل اولیه رشد دلیل معنی‌دار نشدن صفات وزن خشک اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی و وزن خشک ریشه است (جدول ۲).

**جدول ۲.** نتایج آزمون  $t$  برای صفات مورد مطالعه در گندم رقم

کوبر تحت تنش کمبود آب

وزن تر ریشه	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام هوایی	طول ریشه
۸/۴۰۳*	۱/۲۸	۰/۱۶	۰/۲۸۴	-۴/۹۵۵*
۱۳/۱۷	۷/۹۹	۱۰/۸۰	۳/۴۶	۵/۸۲

آماره  $t$       ضریب تغییرات (%)

\* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد.

ساعت انجام گردید. این مراحل به پروتئین‌ها اجازه می‌دهند تا بر اساس بار الکتریکی از یکدیگر جدا شده و تفکیک شوند.

## الکتروفورز بعد دوم

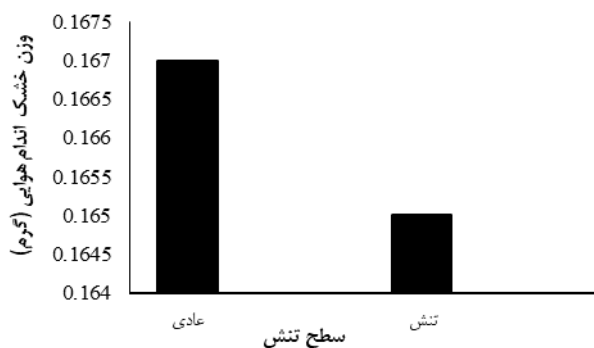
در الکتروفورز بعد دوم (SDS-PAGE)، پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی خود از یکدیگر جدا می‌شوند. این روش از یک ژل دو قسمتی تشکیل شده‌است که شامل یک ژل جداکننده و یک ژل نگهدارنده است. قبل از انجام الکتروفورز بعد دوم، ژل‌های بعد اول دو مرتبه در بافر SDS sample به مدت ۱۵ دقیقه شناور شدند تا متعادل سازی صورت گیرد. سپس این ژل‌ها روی ژل آکریل امید ۱۵ درصد برای تفکیک بر اساس وزن مولکولی قرار گرفتند. به ازای هر ژل، ۲۰۰ میکرولیتر از نشانگر آبی بروموفنول به بافر افزوده گردید. عملیات الکتروفورز با جریان ثابت به اندازه ۳۵ میلی‌آمپر برای هر ژل و به مدت زمان حدود ۳ ساعت انجام شد تا نشانگر آبی بروموفنول به انتهای ژل جداکننده برسد.

## رنگ آمیزی، تصویربرداری و تجزیه نقطه‌های پروتئینی

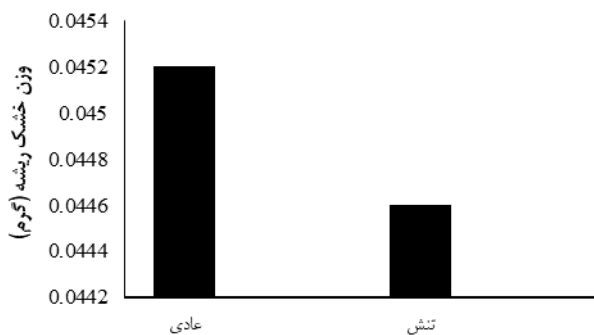
پس از پایان الکتروفورز بعد دوم، ژل نگهدارنده حذف و ژل‌های جداکننده در محلول تثبیت‌کننده قرار گرفتند سپس ژل‌ها با آب دیونیزه شسته شده و محلول نیترات نقره ریخته‌شد. پس از ۲۰ دقیقه، ژل‌ها به مدت ۳۰ ثانیه با آب دیونیزه شستشو داده شدند. سپس به ازای هر ژل ۳۰۰ میلی‌لیتر از محلول توسعه دهنده اضافه گردید. به محض مشاهده نقطه‌های پروتئینی روی ژل‌ها، رنگ‌آمیزی با ریختن محلول تمام‌کننده روی ژل‌ها متوقف شد.

برای تصویربرداری و تجزیه نقطه‌های پروتئینی، ابتدا از دستگاه اسکنر Bio Rad GS-800 برای تصویربرداری استفاده شد. نوع ماده (ژل) و نوع رنگ‌آمیزی (نیترات نقره) در نرم‌افزار Quantity one تنظیم شد. نقطه‌های پروتئینی شناسایی و وزن مولکولی آن‌ها محاسبه شد. پس از غربال‌گری داده‌ها و حذف نقاط ناخواسته، داده‌های کمی در فایل Excel ذخیره شد. برای تجزیه و تحلیل بیان نقطه‌های پروتئینی، تصاویر توسط نرم‌افزار PDQuest برای تمام تکرارها به طور همزمان استفاده شدند و نقطه‌های مشترک بین تکرارها شناسایی شدند. سپس نقاط بر اساس درصد حجمی در تنش‌های مختلف تجزیه شدند و نقاط با تغییرات بیان معنی‌دار مشخص شدند. پس از پایان نقطه یابی، درصد حجمی نقاط برای تکرارهای مختلف به دست آمد و تجزیه جداگانه براساس درصد حجمی هر نقطه در بین

نتایج متناقضی درباره اثر تنش کمبود آب روی وزن ریشه و تاج بدست آمده‌است. برخی نتایج حاکی از آن است که تنش کمبود آب وزن تاج و ریشه را کاهش می‌دهد. در مطالعه دیگری تنش کمبود آب باعث افزایش حجم و وزن خشک ریشه‌ها در برنج شده‌است (Toorchi *et al.*, 2009).



شکل ۲. وزن خشک اندام هوایی رقم کویر تحت آبیاری عادی و تنش کمبود آب



شکل ۳. وزن خشک ریشه رقم کویر تحت آبیاری عادی و تنش کمبود آب

### طول ریشه

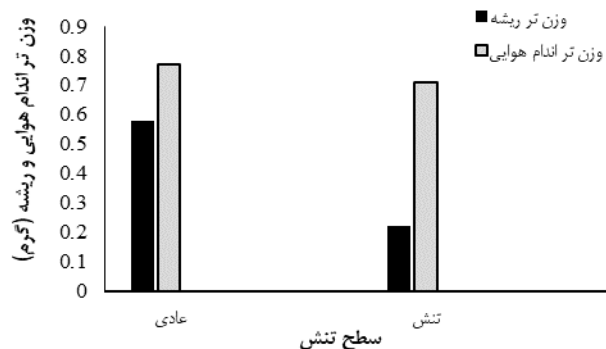
در این آزمایش طول ریشه در حالت تنش کاهش یافت. این کاهش از نظر آماری نسبت به شرایط شاهد معنی‌دار بود (شکل ۴) که نشان‌دهنده توانایی بالای این رقم در حفظ رشد ریشه در شرایط تنش است.

پژوهشگران گزارش کردند که تنش کمبود آب موجب کاهش طول ریشه می‌شود که این امر احتمالاً به دلیل کاهش فتوسنتز و انتقال مواد فتوسنتزی به ریشه‌ها می‌باشد که در نهایت رشد ریشه‌ها را محدود می‌کند (Toorchi *et al.*, 2009). تحت تنش کمبود

### اثر تنش کمبود آب بر صفات رشدی گیاه

#### وزن تر اندام هوایی و ریشه

وزن تر اندام هوایی و وزن تر ریشه، در شرایط تنش میانگین پایین‌تری نسبت به شاهد داشتند که نشان‌دهنده کاهش شدید میزان آب بافت در اثر تنش کم‌آبی است. تجزیه آماری داده‌ها نیز اختلاف معنی‌دار بین گیاه شاهد و تنش در مورد وزن تر ریشه را تأیید می‌کند (شکل ۱).



شکل ۱. میانگین وزن تر ریشه و اندام هوایی رقم کویر تحت آبیاری عادی و تنش کمبود آب

گزارشات مختلف حاکی از آن است که بخش هوایی گیاه حساسیت بیشتری به تنش کمبود آب دارد. خشکی و دمای بالا از طریق کاهش میزان فتوسنتز و افزایش تبخیر و تعرق باعث کاهش تولید ماده خشک گیاه می‌شود. همچنین تنش کمبود آب باعث کاهش رشد برگ و در نتیجه کاهش سطح برگ و فرآیند فتوسنتز شده و منجر به کاهش بیوماس گیاهی می‌گردد. گیل و همکاران (Gill *et al.*, 2003) در مطالعه تاثیر تنش اسمزی روی سورگوم نشان دادند که وزن تر و ارتفاع بوته در گیاهان تحت تنش کاهش می‌یابد.

#### وزن خشک اندام هوایی و ریشه

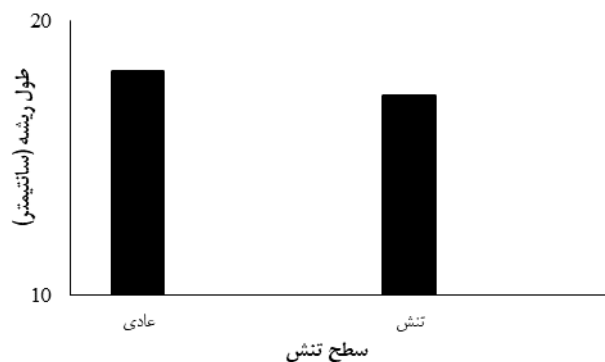
اختلاف معنی‌داری بین وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه در سطوح مختلف تیماری مشاهده‌نشده. هر چند میانگین این صفات تحت شرایط تنش کاهش یافت (شکل‌های ۲ و ۳).

به نظر می‌رسد که سنتز اسمولیت‌ها و سایر متابولیت‌ها برای مقابله با تنش کمبود آب منجر به افزایش بیوماس در گیاهان تحت تنش می‌شود. با در نظر داشتن نمونه‌برداری در مرحله گیاهچه‌ای این افزایش تا حدی بوده که گیاهان تحت تنش با حالت شاهد در میزان بیوماس از نظر آماری برابری کرده‌است.

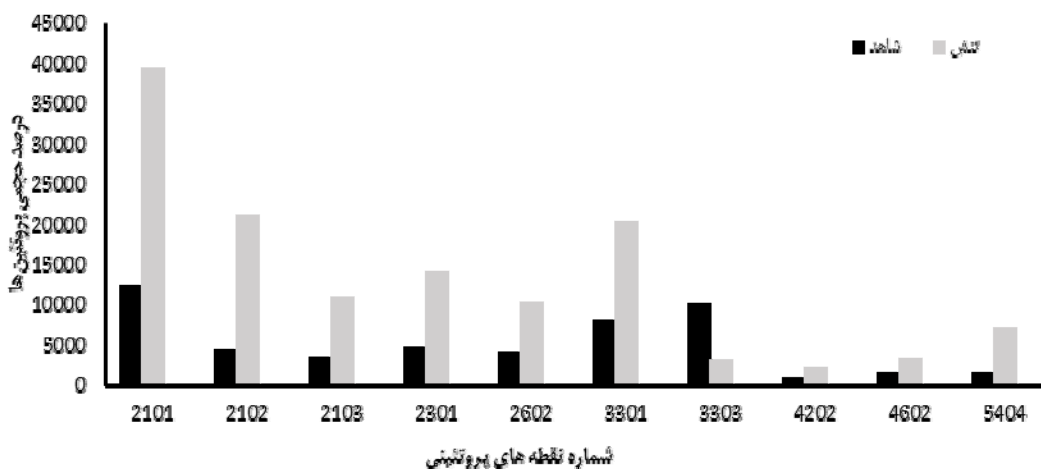
### تجزیه پروتئوم

بررسی تغییرات پروتئوم منجر به شناسایی ۹۸ نقطه پروتئینی تکرارپذیر شد. در مجموع تعداد ۱۰ نقطه تفاوت بیان نشان دادند که تعداد نقطه‌های دارای افزایش بیان معنی‌دار ۹ و نقطه‌های با کاهش بیان معنی‌دار برابر یک بود (شکل ۵). افزایش و کاهش بیان به ترتیب بوسیله فاکتور القا بزرگتر از دو یا کوچکتر از ۰/۵ تعیین شدند. شماره و میزان افزایش و کاهش بیان نقطه‌های انتخابی در جدول ۳ نشان داده شده‌است. موقعیت نقطه‌های شناسایی شده در روی ژل‌های اسکن شده در شکل ۶ نشان داده شده‌است. همچنین عملکرد این پروتئین‌ها بطور خلاصه در جدول ۴ آورده شده‌است. تنش‌های محیطی از جمله خشکی پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلفی را تحت تاثیر قرار می‌دهند و این پروتئین‌ها جزئی از متابولیسم‌ها و چرخه‌های حیاتی سلول می‌باشند.

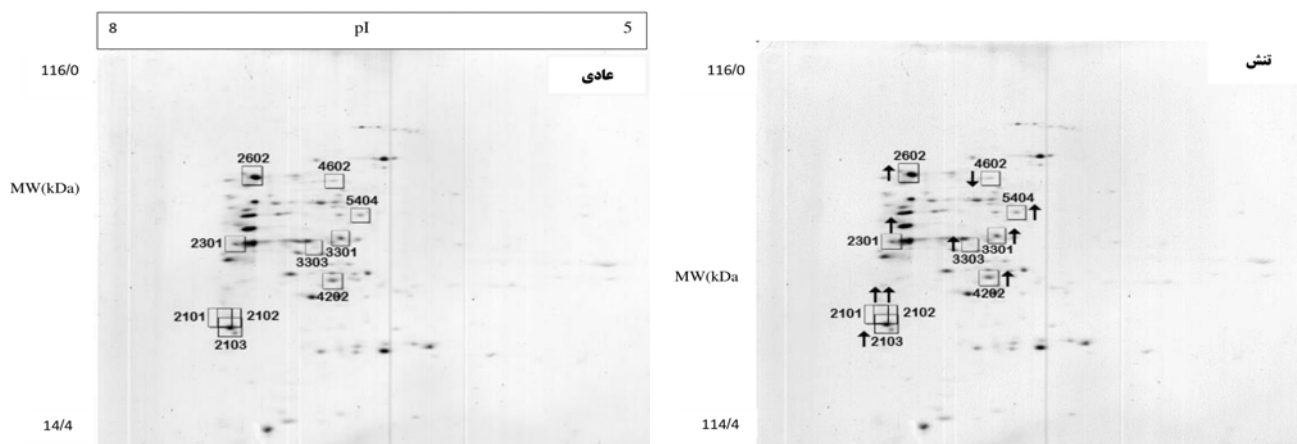
آب ریشه‌ها کمتر از اندام هوایی متاثر می‌شوند (Toorchi *et al.*, 2009). تحت تنش کمبود آب طول ریشه در ذرت کاهش، ولی در ارزن و سورگوم افزایش یافت، و همچنین همبستگی مثبتی بین طول ریشه و مقاومت به تنش کمبود آب در گیاهان سورگوم و ارزن مشاهده شد (Mohammadi *et al.*, 2007).



شکل ۴. میانگین طول ریشه رقم کویر تحت آبیاری عادی و تنش کمبود آب



شکل ۵. درصد حجمی پروتئین‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار تحت شرایط تنش کمبود آب و شاهد



شکل ۶. موقعیت نقطه‌های پروتئینی انتخابی روی ژل‌های الکتروفورز دوبعدی

## جدول ۳. نقش پروتئین‌های انتخابی در فعالیت‌های زیستی و نوع بیان آنها

شماره نقطه پروتئینی	نام پروتئین	نوع فعالیت	نوع بیان
۳۳۰۱	Peroxidase	متابولیسم	افزایش
۳۳۰۱	Enolase mRNA	متابولیسم	افزایش
۴۲۰۲	Malat dehydrogenase	سنتز اسیدامینه	افزایش
۲۶۰۲	HSP 70	پاسخ و دفاع در برابر تنش	افزایش
۵۴۰۴	Polyphenol oxidase	تنش اکسایشی	افزایش
۲۱۰۲	Caffeoyl-coA O-methyltransferase	پاسخ و دفاع در برابر تنش	افزایش
۲۱۰۳	Triosephosphate isomerase	متابولیسم	افزایش
۲۱۰۱	Phosphoglycerate mutase	متابولیسم	افزایش
۳۳۰۳	S-adenosylmethionin synthetase 1	متابولیسم	کاهش
۴۶۰۲	Beta-glucosidase	پاسخ و دفاع در برابر تنش	افزایش

## جدول ۴. مشخصات ۱۰ نقطه پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی‌دار در پاسخ به تنش کمبود آب

ردیف	شماره نقطه	نام پروتئین‌های شناسایی شده	تئوری		آزمایشی		عامل القا	شماره ثبت	گونه
			pI	MW	pI	MW			
۱	2301	Peroxidase	5/85	46/23	5/58	47/59	2/94	gi/474004599	<i>Triticum urartu</i>
۲	3301	Enolase mRNA	5/57	2/22	5/67	47/79	2/47	AY496909	<i>Glycine max</i>
۳	4202	Malat dehydrogenase	5/7	35/80	6/08	38/87	2/26	gi/3273828	<i>Triticum aestivum</i>
۴	2602	HSP 70	5/76	67/1	5/64	69/6	2/4	476003	<i>Hordeom vulgare</i>
۵	5404	Polyphenol oxidase	5/8	55/6	6/24	55/89	4/20	343489333	<i>Triticum aestivum</i>
۶	2102	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	5/30	28/6	5/55	28/35	3/1	Q41720	<i>Zinnia violacea</i>
۷	2103	triosephosphate isomerase	5/38	27/0	5/56	27/1	3/03	Q9FS79	<i>Triticum aestivum</i>
۸	2101	Phosphoglycerate mutase	5/43	30	5/54	32/37	3/1	32400802	<i>Triticum aestivum</i>
۹	3303	S-adenosylmethionin synthetase 1	5/61	43	5/99	46/29	0/3	gi 115589744	<i>Triticum monococcum</i>
۱۰	4602	Beta-glucosidase	6/01	69/34	6/1	69/58	2/07	Q1XIR9	<i>Triticum aestivum</i>

## شکل ۷. گروه‌های عملکردی پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش

کمبود آب

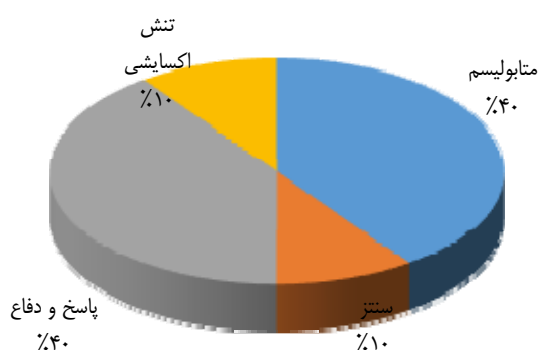
## پروتئین‌های درگیر در مسیرهای متابولیسمی

از بین پروتئین‌های شناسایی شده نقطه‌های ۲۱۰۱، ۲۱۰۳، ۳۳۰۱، ۳۲۰۱ در مسیرهای متابولیسمی گیاهان نقش دارند. پروتئین شماره ۲۱۰۱ مربوط به آنزیم فسفوگلیسرات موتاز می‌باشد که تحت تنش کمبود آب در ریشه‌های گندم افزایش یافت. فسفوگلیسرات موتاز یا PGM یک آنزیم گلیکولیزی است که باعث تبدیل گلیسرات-3 فسفات و گلیسرات-2 فسفات به یکدیگر می‌شود (Toorchi *et al.*, 2009). افزایش بیان این آنزیم ممکن است به تولید انرژی بیشتر مورد نیاز در فرآیندهای دفاعی متعدد کمک کند.

تحت تنش کمبود آب در گیاهچه‌های گندم برای دفاع از سلول در برابر رادیکال‌های آزاد از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی

## نقش پروتئین‌های شناسایی شده تحت تنش کمبود آب

پروتئین‌های انتخابی از نظر کارکردی به گروه‌های عملکردی مطابق شکل ۷ تقسیم‌بندی شدند.



پراکسیداز و کاتالاز به دو شکل متفاوت این ماده را از محیط دور می‌کنند و ثابت شده‌است که آنزیم پراکسیداز از عوامل مهم لیگنین سازی درختان بخصوص در مرحله آخر پلیمریزاسیون سه الکل اصلی (P-کوماریل، کونیفریل و سیناپین) است.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به سلول‌های گیاهی کمک می‌کنند که با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن، تحمل شرایط تنش را آسان‌تر کنند. برای کاهش این اثرات تخریبی، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز زیاد شده که نقش مهمی در پاکسازی رادیکال‌های آزاد خواهند داشت (Zhang et al., 2010). در این تحقیق مشخص گردید که تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز همزمان با افزایش تنش کمبود آب در مطالعه آگوسی و همکاران روی گیاه *Carthamus tinctorius* نیز مشاهده شد (Alguacil et al., 2006).

پروتئین شماره ۳۳۰۱: این نقطه پروتئینی احتمالاً مربوط به آنزیم انولاز می‌باشد که افزایش بیان نشان داده‌است. انولاز یکی از آنزیم‌های دخیل در فرآیند گلیکولیز است. این آنزیم در برابر بسیاری از تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری، کمبود آب، سرما، و تنش‌های غیرهوازی در انواع مختلفی از گیاهان پاسخ نشان می‌دهد. تحت شرایط تنش، فعالیت آنزیمی پروتئین‌ها تحت تاثیر قرار گرفته و متابولیسم‌های پایه و اساسی گیاه مختل می‌گردد (Michaletti et al., 2018).

بمنظور حفظ هموستازی در شرایط تنش، گیاهان نیاز دارند مکانیسم‌های دفاعی خود را تقویت کنند مانند مکانیسم‌های انتقال یون، مهار اکسیژن غیرفعال ROS و سنتز اسمولیت‌ها. این فرآیندها نیازمند انرژی فوق‌العاده زیاد هستند. تنظیم آنزیم‌های انولاز، تریوزفسفات ایزومراز UGPase برای ورود به مسیر تولید انرژی بسیار ضروری است. با اینکه فعالیت آنزیمی و فراوانی انولاز توسط تنش بسیار افزایش می‌یابد اما فراوانی پروتئین آن در ذرت به میزان ۱/۴ افزایش داشته‌است و در گیاه برنج نتایج کلی و قابل تعمیم نبوده‌است. مرویتز و همکاران افزایش بیان قطعه مربوط به انولاز را در ریشه گیاه تحت تنش کمبود آب گزارش دادند. آنزیم‌های متعددی در مسیرهای اساسی متابولیک سلولی از قبیل گلیکولیز و چرخه کربس (انولاز و تریوز فسفات ایزومراز) و بسیاری از پروتئین‌های دیگر مانند کافتات- متیل ترانسفراز مرتبط با لیگنینی شدن نسبت به تنش آبی از خود واکنش نشان می‌دهند (Merewitz et al., 2011).

آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و پروکسی ردوکسین استفاده شده و با تغییر بیان آنزیم‌های تریوزفسفات ایزومراز، فسفولگیسرات موتاز و ملات دهیدروژناز احتمالاً بخشی از انرژی مورد نیاز برای واکنش‌های سمیت‌زدایی از سلول فراهم می‌شود. افزایش بیان این آنزیم در گندم دوروم تحت تنش شوری و نیز در برنج تحت تنش سرما (Yan et al., 2006) گزارش شده‌است. همچنین در آزمایش کاروسو و همکاران کاهش بیان قطعه فسفولگیسرات موتاز در شرایط تنش کمبود آب در گندم مشاهده شده‌است (Caruso et al., 2009).

نقطه شماره ۲۱۰۳ که در گیاهان تحت تنش به میزان قابل توجهی افزایش نشان داد که مربوط به تریوزفسفات ایزومراز (TPI) است که یکی از آنزیم‌های مهم چرخه گلیکولیز می‌باشد. تنظیم تریوزفسفات ایزومراز، انولاز، UGPase و COX6b-1 احتمالاً برای شروع چرخه تولید انرژی ضروری باشد. واضح است که گیاهان این توانایی را دارند که در حین سنتز ساکارز میزان مصرف گلوکز را کاهش دهند و اینکار را با کاهش بیان UGPase انجام می‌دهند و بنابراین می‌توانند گلوکز بیشتری را در مسیر گلیکولیز فراهم کنند در صورتی که یکی از آنزیم‌های اساسی مثل تریوزفسفات ایزومراز افزایش بیان نشان می‌دهد.

دو نوع ایزوفریم از این آنزیم وجود دارد: ایزوفریم سیتوسولی و ایزوفریم کلروپلاستی، ایزوفریم پلاستی در چرخه کالوین دخیل است (Gao et al., 2011). به نظر می‌رسد که افزایش بیان آنزیم تریوز فسفات ایزومراز کلروپلاستی به علت نیاز به انرژی جهت سمیت‌زدایی و بازسازی آسیب‌های ناشی از تخریب اکسیداتیو است. گزارشات قبلی نیز افزایش بیان آنزیم مذکور را در برگ گندم نان تحت تنش شوری نشان دادند. افزایش یا کاهش بیان این آنزیم در گیاهان مختلف بسته به شرایط و مدت زمان اعمال تنش نتایج متفاوتی نشان داده‌است. برای مثال یوشیمورا و همکاران افزایش بیان آن را در هندوانه وحشی اعلام کردند (Yoshimura et al., 2008). در این آزمایش نیز بیان تریوزفسفات ایزومراز افزایش داشته‌است که نشان‌دهنده این است که گیاه تحت شرایط کم آبی، با این مکانیسم انرژی مورد نیاز خود را تامین می‌کند.

میزان بیان پروتئین شماره ۲۳۰۱ در گیاهان تحت تنش در این آزمایش به میزان قابل توجهی افزایش نشان داد. این نقطه آنزیم پراکسیداز شناخته‌شد. تحقیقات ثابت کرده‌است که در تمام فرآیندهای فیزیولوژیکی و تغییرات فنولوژیکی گیاه ماده سمی دهیدروژن پراکسید درباخت‌های گیاهی تولید می‌شود که دو آنزیم

داد. پروتئین‌های شوک حرارتی در مقابله با تنش گرمایی و همچنین تاخوردگی پروتئین‌ها نقش دارند. سلول‌های یوکاریوتی تحت شرایط استرس با سنتز گروهی از پروتئین‌ها تحت عنوان پروتئین‌های شوک حرارتی که در کنار متابولیت‌های دیگر تولید می‌کنند توانایی پاسخ به تحریکات بالقوه و مضر را دارند. در واقع پاسخ به شوک حرارتی واکنشی است که وقتی سلول‌ها و بافت‌های گیاهی در معرض استرس ناگهانی قرار می‌گیرند از خود نشان داده و شروع به بیان موقتی HSP ها می‌کنند. HSP70 چپرون مولکولی دخیل در تجمع پروتئین‌ها و بازکردن تاخوردگی آن‌ها تحت شرایط معمولی و تنش می‌باشد. این مولکول همچنین در واردات، جابجایی و تجزیه پروتئین‌ها دخیل است. پژوهشگران افزایش بیان انواع مختلفی از پروتئین‌های شوک حرارتی از جمله Hsp20، Hsp70، Hsp82، Hsp90 را در هندوانه وحشی تحت تنش کمبود آب نشان دادند (Demirevska et al., 2008). افزایش بیان Hsp70 را در گندم و در نیشکر اعلام کردند (Jangpromma et al., 2010).

نقطه ۴۶۰۲: این نقطه مربوط به آنزیم بتاگلوکوزیداز است. تحت شرایط خشکی گیاهان مکانیسم‌های دفاعی متعددی اتخاذ می‌کنند. آنزیم بتاگلوکوسیداز یکی از آنزیم‌هایی هست که پیوند گلیکوزیدی بین ترکیبات مختلف را می‌شکند در بسیاری از فعالیت‌های سلولی از جمله تجزیه پیوند دی‌ساکاریدها، الیگوساکاریدها، ترکیبات دیواره سلولی، فعال‌سازی هورمون‌های گیاهی از ترکیب غیرفعال گلیکوزیل شده و مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده نقش ایفا می‌کند (Caruso et al., 2009). گلوکوزیداز در حین جوانه‌زنی بذر به میزان زیادی تولید می‌شود تا مانع از بین رفتن ذخیره دانه هنگام هیدرولیز دیواره سلولی اندوسپرم گردد. بوداک و همکاران نشان دادند که افزایش میزان سنتز بتاگلوکوسیداز در حین تنش‌های اسمزی با تحمل گیاهان در برابر این تنش‌ها در ارتباط بوده و عاملی برای افزایش تحمل گیاه به تنش است (Budak et al., 2013). این آنزیم با رشد بافت گیاهی تحریک شده و باعث سازگاری گیاه در برابر تغییرات محیطی ناشی از کاهش پتانسیل آب سلول می‌شود (Mohammadi et al., 2007).

#### پروتئین‌های درگیر در تنش اکسایشی

نقطه شماره ۵۴۰۴: این نقطه مربوط به پلی‌فنول‌اکسیداز (کتگول‌اکسیداز) می‌باشد که افزایش بیان داشت. پروتئین مذکور در مهار گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارد. فعالیت پروتئین‌های آنتی‌اکسیداتیو به طریق افزایش بیان پروتئین‌های پلی‌فنول

پروتئین شماره ۳۳۰۳: این نقطه پروتئینی مربوط به آنزیم اس-آدنوزیل متیونین سنتاز (SAMS) می‌باشد که یکی از آنزیم‌های انتقال دهنده متیل و دخیل در مسیرهای بیولوژیکی از جمله متیلاسیون‌های مختلف و بیوسنتز اتیلن می‌باشد. بیان و همکاران افزایش بیان این آنزیم را تحت تنش سرما در برنج گزارش کرده‌اند. آنها نتیجه‌گیری کرده‌اند که افزایش بیان آنزیم آدنوزیل متیونین سنتاز موجب سنتز افزایش یافته اتیلن و تسریع پیری گیاه برای اجتناب از تنش کمبود آب می‌شود (Yan et al., 2006). کاروسو و همکاران نیز کاهش بیان این آنزیم را در شرایط تنش گزارش کرده‌اند (Caruso et al., 2009). مرویتز و همکاران افزایش بیان قطعه مربوط به آنزیم فوق را در گیاه جهش یافته و کاهش آن را در گیاه نرمال مورد آزمایش بیان کردند (Merewitz et al., 2011).

#### پروتئین‌های درگیر در پاسخ و دفاع در برابر تنش

نقطه شماره ۲۱۰۲ مربوط به O-methyltransferase گیاهان برای مقابله با عواقب تنش‌های محیطی دارای مکانیسم‌های بازسازی هستند که این بازسازی با سنتز مواد و پروتئین‌هایی همراه است. همچنین محتوای ساختاری دیواره سلولی ریشه نیز در این مرحله دچار تغییر می‌شود. از جمله این پروتئین‌ها، پروتئین‌های دخیل در سنتز لیگنین هستند. یکی از مهم‌ترین آنها Caffeoyl-CoA O-methyltransferase است که نقش کلیدی در سنتز مونولیگنولز دارد که به عنوان پیش ساز در ساخت لیگنین عمل می‌کند. این پروتئین و پراکسیدازهای نوع ۳ در هندوانه وحشی تحت تنش کمبود آب و در ذرت افزایش یافتند. افزایش ساختارهای سازنده لیگنین، باعث تقویت دیواره سلولی و مقاومت ریشه در برابر خشکی خاک می‌شود. همچنین اصلاح و بازسازی دیواره سلولی باعث می‌شود میزان آب تلف شده از سلول به حداقل ممکن برسد و دهیدراسیون انجام نگیرد، بنابراین به گیاه کمک می‌کند تا در برابر خشکی مقاومت داشته باشد. این پروتئین‌ها در هندوانه وحشی در مراحل ابتدایی اعمال تنش، کاهش داشتند ولی با افزایش مدت زمان تنش افزایش یافتند (Yoshimura et al., 2008). در این آزمایش نیز میزان بیان این پروتئین در گیاه تحت تنش افزایش بیان داشته است.

نقطه شماره ۲۶۰۲: این نقطه مربوط به پروتئین شوک حرارتی (HSP70) می‌باشد که در این آزمایش افزایش بیان نشان

حفظ فعالیت بالاتر چرخه تری‌کربوکسیلیک‌اسید و نیز سنتر بیشتر اسیدآمینها کمک می‌کند. افزایش فعالیت این آنزیم در برگ گندم نان (Wang *et al.*, 2008) و آراییدوپسیس (Ndimba *et al.*, 2005) تحت تنش کمبود آب مشاهده شده‌است. کاهش فعالیت این آنزیم در ابتدای اعمال تنش و افزایش آن در مراحل بعدی اعمال تنش در هندوانه وحشی (Yoshimura *et al.*, 2008) مشاهده‌گردید.

### نتیجه‌گیری و پیشنهادات

تفاوت معنی‌داری برای صفات وزن تر ریشه و طول ریشه در اثر تنش کمبود آب دیده‌شد که نشان‌دهنده اثرات زیانبار تنش روی ریشه گندم رقم کویر است. تجزیه پروتئوم ریشه رقم کویر به روش الکتروفورز دو بعدی تحت تنش کمبود آب منجر به شناسایی ۹۸ نقطه پروتئینی از طریق رنگ‌آمیزی با نیترات‌نقره شد. از این تعداد ۱۰ نقطه پروتئینی تغییرات بیان معنی‌داری از نظر آماری نشان دادند. ۹ نقطه پروتئینی افزایش بیان و یک نقطه کاهش بیان نشان دادند. پروتئین‌های شناسایی شده در بیوسنتر و متابولیسم پروتئین‌ها، پاسخ به تنش و دفاع نقش داشتند. الگوی تغییر بیان پروتئین‌های دخیل در تنش‌ها به خصوص تنش اکسایشی حاکی از افزایش فعالیت پروتئین‌های دخیل در مهار گونه‌های فعال اکسیژن است. پروتئین‌های دخیل در سنتر و تجمع پروتئین افزایش بیان داشتند و این می‌تواند نشانگر یکی از مهمترین مسیرهای مقابله با تنش کمبود آب در این رقم متحمل باشد.

اکسیداز و آلترناتیو اکسیداز افزایش یافته‌است. تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش کمبود آب موجب اختلال در انتقال الکترون فتوسنتزی از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست و میتوکندری و در نتیجه موجب تخریب سلول‌ها و بافت‌ها می‌شوند. آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز، هیدرولاسیون مونو‌فنول‌ها را به دی‌فنول‌ها کاتالیز می‌کند. همچنین این آنزیم اکسیداسیون دی‌فنول‌ها را به کوئینون‌ها که در پلیمریزاسیون رنگدانه‌ها نقش دارند کاتالیز می‌کند. تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش‌های محیطی از جمله تنش کمبود آب گزارش شده‌است.

### پروتئین‌های درگیر در سنتر اسیدآمین

نقطه ۴۲۰۲ متعلق به پروتئین مالات‌دهیدروژناز سیتوسولی است که تحت تنش کمبود آب در ریشه‌های گندم افزایش بیان یافت. آنزیم مالات‌دهیدروژناز واکنش تبدیل دوطرفه مالات به اگزالواستات و برعکس را کاتالیز می‌کند. این آنزیم در سیتوسول میتوکندری و پراکسیزوم، وابسته به  $NAD^+$  است. در سیتوسول آنزیم مالات‌دهیدروژناز وابسته به  $NAD^+$  واکنش تبدیل اگزالواستات به مالات را کاتالیز می‌کند، سپس مالات از طریق ناقل دکربوکسیلات وارد میتوکندری می‌شود و در آنجا وارد چرخه تری‌کربوکسیلیک‌اسید می‌شود. این امر باعث عملکرد بهتر این چرخه می‌شود. همچنین اگزالواستات به عنوان پیش ماده اسیدآمین در گیاهان عمل می‌کند (Kosová *et al.*, 2011). بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت مالات‌دهیدروژناز در

### References

- Alguacil, M., Caravaca, F., Diaz-Vivancos, P., Hernández, J., & Roldan, A. (2006). Effect of arbuscular mycorrhizae and induced drought stress on antioxidant enzyme and nitrate reductase activities in *Juniperus oxycedrus* L. grown in a composted sewage sludge-amended semi-arid soil. *Plant and Soil*, 279, 209-218.
- Budak, H., Akpinar, B. A., Unver, T., & Turktas, M. (2013). Proteome changes in wild and modern wheat leaves upon drought stress by two-dimensional electrophoresis and nanoLC-ESI-MS/MS. *Plant Molecular Biology*, 83, 89-103.
- Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2009). Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177(6), 570-576.
- Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., Vassileva, V., Vaseva, I., Grigorova, B., & Feller, U. (2008). Drought-induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. *Gen Appl Plant Physiol*, 34(1-2), 79-102.
- Gao, L., Yan, X., Li, X., Guo, G., Hu, Y., Ma, W., & Yan, Y. (2011). Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry*, 72(10), 1180-1191.
- Gill, P. K., Sharma, A. D., Singh, P., & Bhullar, S. S. (2003). Changes in germination, growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 40, 157-162.
- Jangpromma, N., Kitthaisong, S., Lomthaisong, K., Daduang, S., Jaisil, P., & Thammasirak, S. (2010). A proteomics analysis of drought stress-responsive proteins as biomarker for drought-

- tolerant sugarcane cultivars. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(2), 89-102.
- Kamal, A. H. M., Kim, K.-H., Shin, K.-H., Choi, J.-S., Baik, B.-K., Tsujimoto, H., Heo, H. Y., Park, C.-S., & Woo, S.-H. (2010). Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. *Australian Journal of Crop Science*, 4(3), 196-208.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., & Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74(8), 1301-1322.
- Merewitz, E. B., Gianfagna, T., & Huang, B. (2011). Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an ipt gene for cytokinin synthesis. *Journal of experimental botany*, 62(15), 5311-5333.
- Michaletti, A., Naghavi, M.R. Toorchi, M., Zolla, L. & Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific Reports* 8:5710. DOI:10.1038/s41598-018-24012-y
- Mohammadi, M., Kav, N. N., & Deyholos, M. K. (2007). Transcriptional profiling of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) roots identifies novel, dehydration-responsive genes. *Plant, Cell & Environment*, 30(5), 630-645.
- Nakayama, N. (2007). Response of growth, photosynthetic gas exchange, the translocation of <sup>13</sup>C-labelled photosynthate and N accumulation in two soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars to drought stress. *Int. J. Agric. & Biol.*, 9, 669-674.
- Naghavi, M.R., Toorchi, M., Moghaddam, M. & Shakiba, M.R. (2015). Evaluation of diversity and traits correlation in spring wheat cultivars under drought stress. *Notulae Scientia Biologicae*, 7, 349-354.
- Ndimba, B. K., Chivasa, S., Simon, W. J., & Slabas, A. R. (2005). Identification of Arabidopsis salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 5(16), 4185-4196.
- Qureshi, M. I., Qadir, S., & Zolla, L. (2007). Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology*, 164(10), 1239-1260.
- Razmjoo, K., Heydarizadeh, P., & Sabzalian, M. R. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *Int. J. Agric. Biol*, 10(4), 451-454.
- Shahbazi, S., Toorchi, M., Moghaddam, M., Aharizad, S. & Bandehagh, A. (2023). Effect of salinity stress on the root proteome pattern of spring bread wheat. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 13(1), 51-68.
- Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1537-1553.
- Toorchi, M., Yukawa, K., Nouri, M.-Z., & Komatsu, S. (2009). Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. *Peptides*, 30(12), 2108-2117.
- Torabian, S., Shakiba, M.R., Mohammadi-Nasab, A.D. & Toorchi, M. (2018). Leaf gas exchange and grain yield of common bean exposed to spermidine under water stress. *Photosynthetica*, 56 (4), 1387-1397.
- Valizadeh-Kamran, R., Toorchi, M., Moghadam, M., Mohamadi, H. & Pessarakli, M. (2017). Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, DOI: 10.1080/01904167.2017.1381730
- Wang, M. C., Peng, Z. Y., Li, C. L., Li, F., Liu, C., & Xia, G. M. (2008). Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*/Thinopyrum ponticum. *Proteomics*, 8(7), 1470-1489.
- Wilson, K., Baldocchi, D., & Hanson, P. (2001). Leaf age affects the seasonal pattern of photosynthetic capacity and net ecosystem exchange of carbon in a deciduous forest. *Plant, Cell & Environment*, 24(6), 571-583.
- Yan, S.-P., Zhang, Q.-Y., Tang, Z.-C., Su, W.-A., & Sun, W.-N. (2006). Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(3), 484-496.
- Yoshimura, K., Masuda, A., Kuwano, M., Yokota, A., & Akashi, K. (2008). Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C3 xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant and Cell Physiology*, 49(2), 226-241.
- Zhang, Y., Zhong, C., Chen, Y., Chen, Z., Jiang, Q., Wu, C., & Pinyopusarerk, K. (2010). Improving drought tolerance of *Casuarina equisetifolia* seedlings by arbuscular mycorrhizas under glasshouse conditions. *New Forests*, 40, 261-271.



**ORIGINAL ARTICLE**

# Investigating some antioxidant enzymes activity and changing the expression of some defense chitinase genes of potato (*Solanum tuberosum* L.) after inoculation with chitin

Maryam Faramarzi Jafarbeiglou<sup>1</sup>, Farhad Nazarian-Firouzabadi<sup>1\*</sup>, Seyed Sajad Sohrabi<sup>1</sup>, Ali Moghadam<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

<sup>2</sup>Institute of biotechnology, Shiraz University, Iran

**Correspondence**

Farhad Nazarian-Firouzabadi  
Email: [nazarian.f@lu.ac.ir](mailto:nazarian.f@lu.ac.ir)

**How to cite**

Faramarzi Jafarbeiglou, M., Nazarian-Firouzabadi, F., Sohrabi, S. S., & Moghadam, A. (2023). Investigating some antioxidant enzymes activity and changing the expression of some defense chitinase genes of potato (*Solanum tuberosum* L.) after inoculation with chitin. *Crop Biotechnology*, 12(43), 43-53.

**ABSTRACT**

Plant diseases, particularly diseases caused by fungi and oomycetes pose significant challenges in modern agriculture worldwide. Pathogen associated molecular pattern (PAMP) like chitin found in the cell walls of fungi and oomycetes, trigger defence signalling, leading to expression of R-genes and the production of reactive oxygen species (ROS), and accumulation of a wide range of metabolites. Chitin elicitors prompt the expression of defence-related genes such as chitinases, ultimately the resulting in the breakdown of chitin in the pathogen's cell wall. To assess the expression level of certain chitinases in potatoes and the activity of antioxidant enzymes, leaves of a tolerant potato genotype (jelly) was challenged with chitin oligomers in vitro. Result of this study revealed that 48 hours post chitin induction, the expression of different classes of chitinase genes were significantly increased. Class I chitinase (Soltu.DM.10G017450) and class III chitinase (Soltu.DM.11G026160) genes, had respectively the highest (5.5-fold relative to control) and the lowest (1.1-fold relative to control) expression level after 48 hours post chitin inoculation. However, the activities of antioxidant enzymes catalase and ascorbate peroxidase did not change significantly compared to the control. These findings suggest that the application of chitin does not activate the signaling pathways involved in the biosynthesis of antioxidant enzymes 48 hours after chitin treatment. In addition, results of this study may imply that chitinase genes can be cloned by genetic engineering approaches to generate transgenic plants resistant to pathogens.

**KEYWORDS**

Antioxidant enzymes, , Gene expression, potato, Chitinase gene..

نشریه علمی

## زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

# بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تغییر بیان برخی ژن‌های کیتیناز دفاعی گیاه سیب‌زمینی پس از تلقیح با کیتین

مریم فرامرزی جعفریگلو<sup>۱</sup>، فرهاد نظریان فیروزآبادی<sup>۱\*</sup>، سید سجاد سهرابی<sup>۱</sup>، علی مقدم<sup>۲</sup>

### چکیده

بیماری‌های گیاهی، به ویژه بیماری‌های حاصل از قارچ‌ها و اوومیسیت‌ها، از چالش‌های عمده‌ی کشاورزی مدرن جهانی هستند. الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMP) مانند کیتین دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها و اوومیسیت‌ها، باعث تحریک و سیگنال‌هایی در گیاه میزبان، بیان ژن‌های R و تولید گونه‌های اکسیژن فعال و طیف وسیعی از متابولیت‌ها می‌شوند. تحریک کیتین منجر به بیان ژن‌های مرتبط با دفاع مانند کیتینازها و در نهایت تخریب کیتین دیواره‌ی سلولی پاتوژن‌ها می‌شود. به منظور ارزیابی سطح بیان تعدادی از ژن‌های کیتیناز و اندازه‌گیری فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، برگ‌های یک ژنوتیپ سیب‌زمینی متحمل به بیماری به نام جلی، در شرایط آزمایشگاهی با الیگومرهای کیتین تلقیح شد. نتایج پژوهش نشان داد که ۴۸ ساعت پس از تلقیح با کیتین، بیان کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز در برگ‌های تیمار شده نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری پیدا کرد. ژن‌های کیتیناز کلاس I (با ۵/۵ برابر افزایش بیان نسبت به شاهد) و ژن‌های کیتیناز کلاس III (با ۱/۱۱ برابر افزایش بیان نسبت به شاهد)، به ترتیب بیشترین و کمترین بیان را ۴۸ ساعت پس از تلقیح با کیتین داشتند. با این حال، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند. این نتیجه نشان می‌دهد که استفاده از تیمار کیتین، مسیرهای سیگنال‌دهی درگیر در بیوستنز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در ۴۸ ساعت پس از تیمار کیتین، القا نمی‌کند و نیز ژن‌های کدکننده کیتینازها را می‌توان با روش‌های مهندسی ژنتیک همسانه‌سازی نمود و در نهایت گیاهان تراریخته‌ی مقاوم به پاتوژن‌ها را تولید کرد.

### واژه‌های کلیدی

آنتی‌اکسیدان، بیان ژن، سیب‌زمینی، ژن کیتیناز.

<sup>۱</sup>گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.  
<sup>۲</sup>پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

نویسنده مسئول:

فرهاد نظریان فیروزآبادی

رایانامه: nazarian.f@lu.ac.ir

استناد به این مقاله:

فرامرزی جعفریگلو، مریم، نظریان فیروزآبادی، فرهاد، سهرابی، سید سجاد و مقدم، علی (۱۴۰۲). بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تغییر بیان برخی ژن‌های کیتیناز دفاعی گیاه سیب‌زمینی پس از تلقیح با کیتین. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۳)، ۴۳-۵۳.

## مقدمه

کرده و با استفاده از آنها با تنش ناشی از حمله پاتوژن‌ها مقابله می‌کنند (Van loon & Van Strien, 1999). این پروتئین‌ها به‌طور خاص در شرایط بیماری تولید شده و نقش مهمی در مقاومت به بیماری ایفا می‌کنند (Saboki & Singh, 2011). بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و ساختمانی، پروتئین‌های PR به ۱۷ خانواده پروتئینی با عملکرد متنوع دسته‌بندی می‌شوند. در این طبقه‌بندی، بعضی این پروتئین‌ها ناشناخته، برخی نقش  $\beta$ -۱ و ۳ گلوکانازی، برخی عملکرد کیتینازی، تعدادی پروتئین‌های شبیه توماستین‌ها، عده‌ای فعالیت پراکسیدازی و برخی دیگر نیز در گروه تیونین‌ها هستند (van Loon *et al.*, 2006).

کیتینازها (E.C 3.2.1.14)، آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ای هستند که سبب هضم کیتین‌ها از جمله کیتین تشکیل‌دهنده دیواره سلولی برخی از قارچ‌ها می‌شوند و به‌طور گسترده‌ای در موجودات مختلف مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها، جانوران، ویروس‌ها و گیاهان عالی دیده می‌شوند (Rawat *et al.*, 2017). این آنزیم‌ها در شرایط طبیعی سطح بیان پایه را نشان می‌دهند، اما در شرایط بیماری و بروز برخی تنش‌های غیرزنده، بیان آنها به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد که در نتیجه بیان این پروتئین‌ها، مقاومت اکتسابی سیستمیک القاء می‌شود (Návarová *et al.*, 2012). این پروتئین‌ها به‌طور گسترده‌ای در اندام‌های مختلف گیاهان عالی وجود دارند و پس از آلودگی توسط عوامل بیماری‌زا، به سرعت تولید و انباشته می‌شوند (Bravo *et al.*, 2003).

بسته به نوع مکانیسم مقاومت گیاه، پس از حملات پاتوژن، تجمع ROS<sup>۱</sup> به‌ویژه رادیکال‌های آزاد سوپراکسید ( $O_2^-$ ) و پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، به‌سرعت افزایش می‌یابد تا از رشد بیشتر پاتوژن‌ها جلوگیری به عمل آید. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اولین راه دفاعی در برابر صدمات ROS هستند. گیاهان عالی از چندین آنزیم آنتی‌اکسیدان از قبیل کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) برای جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن استفاده می‌کنند (Schutzendubel & Polle, 2002). آنزیم کاتالاز در جذب و بی‌اثرسازی پراکسید هیدروژن نقش دارد و آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون پراکسید هیدروژن را به آب احیا می‌کند (Asada, 1992). تحقیقات نشان می‌دهند که کیتینازها به‌عنوان ژن‌های مرتبط با دفاع در برابر پاتوژن‌های حاوی کیتین عمل می‌کنند (Abeles *et al.*, 1971).

بیماری‌های گیاهی یکی از چالش‌های عمده کشاورزی در جهان هستند (Gurr & Rushton, 2005). عوامل بیماری‌زا باعث ایجاد پاسخ‌های مختلفی در گیاه، مانند القا مقاومت سیستمیک اکتسابی<sup>۱</sup> (SAR) در برابر بیمارگر می‌شوند. پاسخ به بیمارگر می‌تواند توسط عوامل غیرزنده فیزیکی و شیمیایی موسوم به القاگر<sup>۲</sup> اتفاق بیافتد که به‌طور کلی به آنها الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن<sup>۳</sup> (PAMPs) اطلاق می‌گردد (Durrant & Dong, 2004). در بیشتر موارد، القاگرها اجزاء سلولی، مولکول‌ها یا پروتئین و آنزیم‌هایی هستند که توسط بیمارگرها سنتز شده و به بیرون از سلول‌هایشان ترشح می‌کنند. کیتین یکی از الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن یا یک القاگر است که در دیواره سلولی برخی از پاتوژن‌ها بویژه برخی اوومیسیت‌ها و قارچ‌ها دیده می‌شود. مولکول کیتین یک پلیمر زیست تخریب‌پذیر و غیرسمی است که از واحدهای N-استیل گلوکزآمین<sup>۴</sup> ساخته شده است و توسط پیوندهای گلیکوزیدی (1-4)  $\beta$  به هم مرتبط شده‌اند (Esteban *et al.*, 2000, Cuesta *et al.*, 2003, Elie *et al.*, 2018).

علاوه بر کیتین، الگوهای مولکولی متعدد دیگری مانند پپتیدوگلیکان‌ها، کیتوزان، فلاژلین و ... نیز وجود دارند که توسط گیرنده‌های تشخیص الگو<sup>۵</sup> (PRRs) در سطح سلول گیاهی شناسایی می‌شوند (Couto & Zipfel, 2016). با شناسایی الگوهای مرتبط با پاتوژن، واکنش‌های دفاعی خاصی در درون سلول‌های گیاه میزبان فعال می‌شوند. تولید گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۶</sup> (ROS)، تحریک نسخه‌برداری ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضد میکروبی، بیوسنتز اتیلن و تحریک آبشار پروتئین کینازها توسط میتوژن<sup>۷</sup>، از مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی سلول‌های گیاهی محسوب می‌شوند (Asai *et al.*, 2002, Nürnbergberger *et al.*, 2004).

یکی از پاسخ‌های گیاه میزبان در مواجهه با حمله پاتوژن‌ها، بیان ژن‌های مرتبط با دفاع است (Navarro *et al.*, 2004, Zipfel *et al.*, 2006). گیاهان گروه کوچکی از پروتئین‌های ناهمگن به نام پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PRs)<sup>۸</sup> را سنتز

1. Systemic acquired resistance
2. Stimuli
3. Pathogene- associated molecular pattern
4. N-Acetylglucosamine (GlcNAc)
5. Pterren recognition receptors
6. Reactive oxygen species (ROS)
7. Mitogen-activated protein kinase (MAPK)
8. Pathogenesis-related

## روش‌شناسی پژوهش

### شناسایی خانواده ژنی و آنالیز بیوانفورماتیکی کیتیناز

#### سیب زمینی

برای شناسایی خانواده ژنی کیتیناز، پس از دریافت توالی‌های پروتئینی کیتینازهای مربوط به گیاه‌های گوجه‌فرنگی، آرآبیدوپسیس و تنباکو از پایگاه داده NCBI، توالی مورد توافق حاصل از هم‌ردیفی، توسط نرم افزار DNASTar، انجام شد. توالی مورد توافق در پایگاه داده Phytozome به‌عنوان ورودی علیه ژنوم گیاه سیب زمینی، توسط ابزار tBLASTn هم‌ردیف شد و در نهایت نتایج هم‌ردیفی به‌عنوان ژن‌های کاندید کدکننده کیتیناز شناخته و نامگذاری شدند. برای تایید حضور دومین‌های کاتالیتیکی و هم‌چنین دومین اتصال به کیتین در توالی‌های مورد نظر، از پایگاه‌های pfam و SMART و CDD استفاده شد. بررسی تغییرات بیان ژن‌های انتخابی در شرایط تنش‌های زیستی با استفاده از مجموعه داده‌های ترنسکریپتومی موجود برای سیب‌زمینی در پایگاه داده SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) انجام شد. پس از آنالیز داده‌های ترنسکریپتوم توسط نرم‌افزار CLC Genomicswb20، از هر کلاس ژن کیتیناز، ژن‌هایی که در شرایط تلقیح با قارچ، بیان بالایی داشتند، برای بررسی میزان بیان ژن در شرایط تلقیح کیتین انتخاب شدند. به منظور شناسایی عناصر تنظیمی در نواحی پروموتوری ژن‌های کیتیناز انتخابی و نقش احتمالی آنها در ایجاد مقاومت به تنش زنده، ۱۵۰۰ جفت باز در بالادست هر ژن در نظر گرفته شد و با استفاده از پایگاه اطلاعاتی (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) PLACE مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. جهت بررسی ساختار ژن و پراکنش نواحی آگرونی و اینترونی ژن‌های کیتیناز، و ارتباط آن با میزان بیان ژن از ابزار بیوانفورماتیکی TBtools استفاده شد.

#### کشت و اعمال تنش

به منظور ارزیابی نحوه بیان مهم‌ترین کیتینازهای سیب‌زمینی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان اجرا شد. برای این منظور، غده‌های کوچک سیب زمینی در گلدان‌های حاوی پرومیکس و پرلیت کشت و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در گلخانه با فتوپریود ۱۲-۱۴ ساعته و رطوبت ۷۰ درصد، نگهداری شدند.

حمله‌های پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد (Que *et al.*, 2014; Roby *et al.*, 1988). مطالعات نشان دادند که در میوه گوجه‌فرنگی، بیان ژن‌های کدکننده کیتینازهای مختلف در جریان آلودگی به *Alternaria alternata* تغییر پیدا کرد (Cota *et al.*, 2007) در تحقیقی دیگر، نقش خانواده ژنی کیتینازها در شرایط بیماری قارچی گیاه کلزا مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۳۳ ژن کدکننده کیتینازها شناسایی شدند که بر اساس وجود دومین حفاظت شده در آنها، این پروتئین‌ها در ۵ گروه دسته‌بندی شدند. (Chen *et al.*, 2018).

بررسی خانواده پروتئین‌های متصل شونده به کیتین در خانواده کلم با استفاده از یک روش جستجوی ژنوم، در مجموع تعداد ۲۰ ژن کیتیناز شناسایی شدند. همچنین نتایج مطالعه اخیر نشان داد که خانواده ژن‌های کیتینازی در کلم در بافت‌ها و اندام‌های مختلف بیان می‌شوند و تحت چهار تنش مختلف، بیان متفاوت از خود نشان دادند (Zhu *et al.*, 2020). هم‌چنین تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی ترانسکریپتوم در گیاه نیشکر نشان داد که بیان ژن‌های کیتیناز متعلق به کلاس‌های I-VI در ژنوتیپ‌های سازگار و ناسازگار در جریان آلودگی به بیماری سیاهک توسط *Sporisorium scitamineum* تغییر پیدا کردند (Su *et al.*, 2015). محققان در ژنوم گوجه‌فرنگی تعداد ۴۳ ژن کدکننده کیتینازهای متعلق به خانواده‌های گلیکولیزهیدرولازهای خانواده‌های ۱۸ و ۱۹ (GH18, GH19) را شناسایی کردند که میزان بیان آنها در شرایط تنش‌های مختلف و در بافت‌های مختلف به‌طور معنی‌داری متغیر بود (Cao & Tan, 2019).

گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای در سرتا سر جهان برخوردار است و از نظر اهمیت در تولید و تغذیه بشر پس از برنج، گندم و ذرت در رتبه چهارم قرار دارد (Muleta & Aga, 2019). به دلیل گستردگی سطح کشت، طیف وسیعی از بیماری‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی به این گیاه حمله کرده و سبب افت شدید عملکرد آن می‌گردند (Abd Elhamid *et al.*, 2010). با توجه به نقش کیتین به‌عنوان یک الیسیتور، این پژوهش با هدف بررسی میزان بیان ۴ کلاس از ژن‌های کدکننده کیتینازها و هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط القای کیتین، در رقم جلی<sup>۱</sup> سیب زمینی، به‌عنوان یک رقم متحمل به بیماری، انجام شد.

شیوه نامه شرکت سازنده صورت گرفت. تعیین کیفیت و کمیت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. سنتز cDNA، توسط کیت Thermo Fisher Scientific و بر اساس شیوه‌نامه شرکت سازنده صورت گرفت. انتخاب ژن‌های کیتیناز بر اساس تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و استفاده از داده‌های توالی‌یابی مربوط به ترانسکرپتوم گیاه سیب زمینی در شرایط تلقیح با قارچ‌های کیتین دار موجود در پایگاه‌های داده صورت گرفت. در هر کلاس ژنی از کیتینازها، ژن‌هایی انتخاب شدند که میزان بیان بالاتری نسبت به سایر ژن‌های همولوگ همان کلاس داشتند. برای ژن‌های انتخابی (جدول ۱)، آغازگرهای اختصاصی، بر اساس توالی CDS به کمک نرم افزار Primer-BLAST و Oligo analyser طراحی و نامگذاری شدند. واکنش Real-time PCR بر اساس برنامه زمانی و دماهای مشخص شده در جدول ۲ و توسط دستگاه Rotor Gene ساخت شرکت QIAGEN برای هر یک از ژن‌ها در سه تکرار فنی انجام شد. بر اساس غلظت‌های سریالی برای هر یک از ژن‌های انتخابی با استفاده از آغازگرها اختصاصی (جدول ۱) واکنش PCR صورت گرفت که در همه موارد میزان کارایی در محدوده قابل قبول (۸۵٪-۱۱۰٪) بود. از این رو، مقایسه میزان بیان ژن‌ها با شاهد با استفاده از روش  $\Delta\Delta Ct$ ، معروف به روش لیواک (Livak & Schmittgen, 2001) صورت گرفت. برای مقایسه میزان بیان ژن‌ها، از آزمون  $t$  و در سطح احتمال ۱ استفاده شد.

تلقیح کیتین به برگ‌های گیاه پس از گذشت ۵ هفته از رشد سیب‌زمینی انجام شد. برای تلقیح، شیارهای بسیار نازک در سطح برگ ایجاد شده و محلول کیتین با غلظت  $150 \mu\text{g/ml}$  روی برگ‌ها اسپری شد (Mohammadi *et al.*, 2020) برای تیمار شاهد نیز به جای محلول کیتین از آب مقطر استفاده شد. برگ‌ها توسط نایلون پوشیده شدند و نمونه‌برداری از برگ‌ها برای انجام مراحل آزمایشگاهی، ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار، صورت گرفت (Samet *et al.*, 2018).

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان

به منظور اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، برای عصاره‌گیری از بافر فسفات پتاسیم استفاده شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با روش اِبی (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد (Aebi, 1984) و قرائت نمونه‌های آنزیمی در طول موج ۲۴۰ نانومتر صورت گرفت. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از شیوه‌نامه ناکانو و آسادا (۱۹۸۱) استفاده شد (Nakano & Asada, 1981) و قرائت نمونه‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام گرفت. آنالیزهای آماری داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SAS. v 9 انجام شده و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح احتمال پنج درصد و یک درصد صورت گرفت.

### بررسی بیان ژن‌های کیتینازی

استخراج RNA کل توسط کیت تجاری دنا زیست و بر اساس

جدول ۱. توالی آغازگرهای طراحی شده برای بیان کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز سیب زمینی

نام ژن	دسترسی ژنومی	نام آغازگر	توالی آغازگر (۳' - ۵')	طول قطعه (bp)
CH1	Soltu.DM.10G017450	F_Ch1 R_Ch1	TTGCCAGAGCTAGTGGTTGTGATA CAGCAATTTTCCTTTACAGCCA	218
CH3	Soltu.DM.11G026160	F_Ch2 R_Ch2	GGGCACAACCATTCCTCAGT TCTAGGAGACAAGCCACCAC	115
CH4	Soltu.DM.10G017290	F_Ch4 R_Ch4	GGTCCCGGTCCTTCAGAG CAGGAAAAGACCAAGCAGCA	149
CH5	Soltu.DM.07G000200	F_Ch5 R_Ch5	ACAGAAATCGTGCCACAACAG CACGCAAAGTAACCACGCAA	150
<i>elf1-a</i>	NM_001288491	F_elf R_elf	ATTGGAACGGATATGCTCCA TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	101

**جدول ۲. برنامه دمایی واکنش Real Time PCR برای بررسی بیان ژن‌های کیتیناز مختلف گیاه سیب زمینی پس از تیمار کیتین**

تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتی گراد)	اجزاء
۱	۱۵ دقیقه	۹۵	دنا توره سازی اولیه
۴۰	۳۰ ثانیه	۹۵	دنا توره سازی
۴۰	۳۰ ثانیه	۶۰	اتصال
۴۰	۳۰ ثانیه	۷۲	تکثیر
۱	هر ۵ ثانیه ۰/۵ درجه	۵۵-۹۵	منحنی ذوب

**یافته‌های پژوهش**

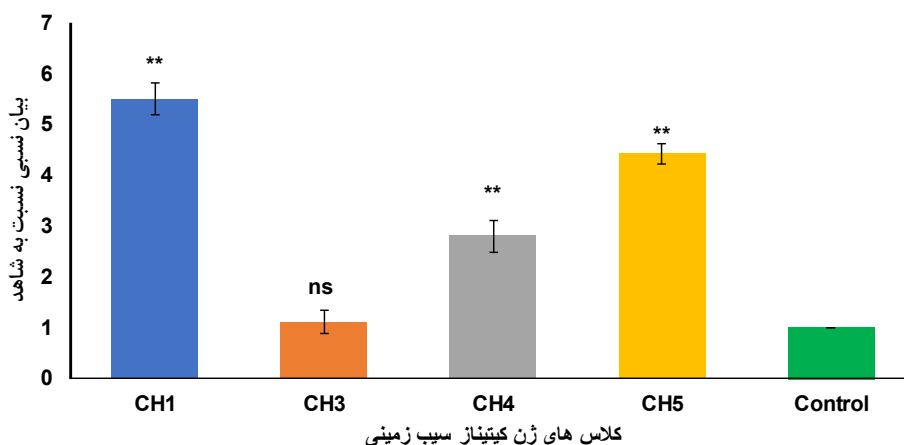
خصوصیات پروتئین‌های کیتیناز انتخابی، از قبیل کلاس پروتئینی، طول ژن، طول پروتئین و نقطه ایزوالکتریک پروتئین در جدول ۲ نشان داده شده است. کمترین اندازه وزن مولکولی پروتئین، مربوط به پروتئین‌های کلاس IV کیتیناز و بیشترین اندازه وزن مولکولی مربوط به پروتئین‌های کلاس V در بین کیتینازها است. بر اساس گزارش‌های موجود، کیتینازهای کلاس I و IV دارای میزان شباهت بالایی با هم هستند و در گروه گلیکوزیل هیدرولازهای خانواده 19 (GH19) قرار دارند. این دو کلاس پروتئینی دارای یک دومین غنی از سیستئین در انتهای سر آمینی (N) خود هستند. اندازه وزن مولکولی پروتئین‌های کلاس IV بطور قابل توجهی کوچکتر از پروتئین‌های کیتیناز کلاس I می‌باشد (Fukamizo, 2000, Patil *et al.*, 2000). pH ایزوالکتریک پروتئین‌های کیتیناز در محدوده ۵/۹ تا ۹/۳ قرار دارد. دامنه pH ایزوالکتریک بیانگر تنوع در خصوصیات اسیدی و بازی پروتئین کیتیناز می‌باشد (جدول ۱). بر اساس مطالعات دامنه pH در داخل بیشتر سلول‌های یوکاریوتی در محدوده ۷/۵-۷/۲ می‌باشد (Felle 2001). گزارش‌ها نشان می‌دهند که pH سیتوسول قلیایی، اما pH ناحیه آپوپلاست اسیدی و در حدود ۵-۶ است (Felle 2001). با توجه به اینکه کیتینازها هم در داخل سیتوسول فعال هستند و هم دارای سیگنال پپتید بوده و لذا به آپوپلاست ترشح می‌شوند، لذا چنین دامنه فعالیتی در محدود pH جدول ۲ برای آنها قابل پیش بینی و قابل قبول است.

**بررسی سطح بیان ژن‌های کدکننده کیتینازها**

در این پژوهش، تغییرات بیان ژن کیتیناز کلاس I (Soltu.DM.10G017450)، کلاس III (Soltu.DM.11G026160)، کلاس IV (Soltu.DM.10G017290) و کلاس V (Soltu.DM.07G000200)، با استفاده از روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیانگر اثر گذاری القای کیتین بر سطح بیان هر چهار کلاس کیتیناز بود (شکل ۱). همانطوری که در شکل ۱ دیده می‌شود، هر کدام از کلاس‌های ژن کیتیناز، سطح بیان متفاوتی را در شرایط القاء کیتین نشان دادند. بیشترین و کمترین میزان بیان ژن به ترتیب مربوط به کیتیناز کلاس I (Soltu.DM.10G017450) و کیتیناز کلاس III (Soltu.DM.11G026160) بود. در مطالعات انجام شده، با فوق بیان ژن کیتیناز کلاس I در گیاه چای، میزان مقاومت گیاه به قارچ عامل بیماری *blister blight* افزایش یافت (Singh *et al.*, 2015). هم‌چنین در پژوهشی که برای بررسی مقاومت گیاه برنج به قارچ *late leaf spot* و *A. flavus* انجام شد، کلاس I ژن کیتیناز در پاسخ به شرایط بیماری افزایش بیان داشته است (Prasad *et al.*, 2013). مرادی و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیقی که روی گیاه خیار انجام دادند، نشان دادند که در این گیاه، ۴۸ ساعت پس از تیمار قارچ *Sphaerotheca fuliginea* افزایش ناچیزی در میزان بیان کلاس III ژن کیتیناز صورت گرفت.

**جدول ۳. ویژگی‌های ژنی و پروتئینی کلاس‌های مختلف کیتیناز سیب زمینی**

نام ژن	کلاس	طول توالی نوکلئوتیدی (bp)	طول پروتئین (a.a)	pH ایزوالکتریک
Soltu.DM.10G017450	I	۹۹۹	۲۵۰	۹/۳۰
Soltu.DM.11G026160	III	۹۲۴	۳۰۸	۵/۹
Soltu.DM.10G017290	IV	۱۷۱۴	۱۲۲	۶/۸۹
Soltu.DM.07G000200	V	۲۵۵۸	۳۷۷	۹/۰۷



**شکل ۱.** تغییرات بیان ژن‌های کیتیناز در برگ‌های گیاه سیب زمینی در شرایط القای کیتین. مقایسه میزان بیان با شاهد توسط آزمون t در سطح ۱ درصد صورت گرفته است. CH1: کلاس I، CH3: کلاس III، CH4: کلاس IV، CH5: کلاس V، control: شاهد. میله‌های بالای هر کدام از ستون‌ها مقادیر انحراف استاندارد میانگین‌ها ( $\pm$ SD) را نشان می‌دهند.

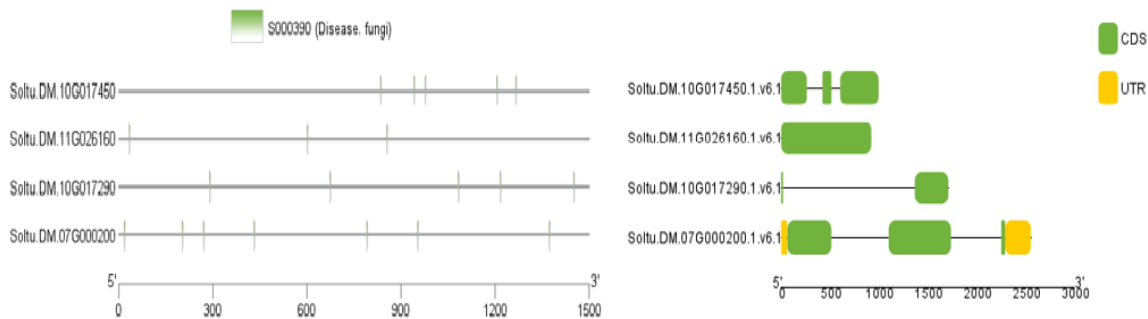
تنظیمی، می‌تواند به کوتاه بودن طول ژن و اینترون‌های آن نیز بستگی داشته باشد. به‌طور کلی ژن‌های مرتبط با تنش، حاوی اینترون‌های کمتری هستند (Jeffares *et al.*, 2008). البته در ژن کیتیناز کلاس V (Soltu.DM.07G000200) علی‌رغم طول زیاد اینترون، بعلاوه فراوانی خیلی زیاد عناصر تنظیمی در نواحی پروموتری، بیان بیشتری را نسبت به کلاس III (Soltu.DM.10G017290)IV و (Soltu.DM.11G026160)IV مشاهده شد (شکل ۲).

### فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

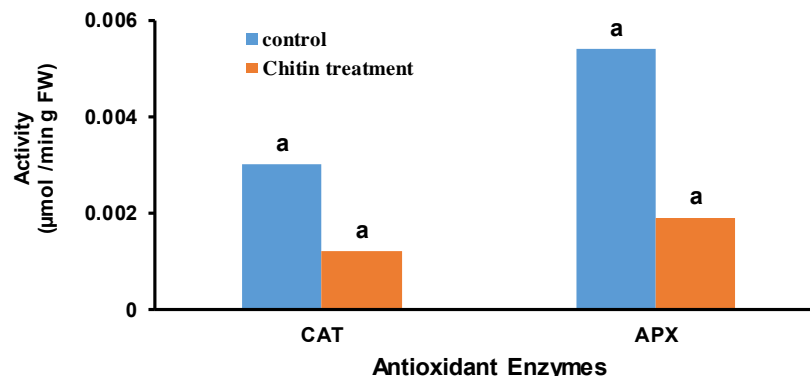
القاء برگ‌های سیب زمینی رقم متحمل به بیماری جلی توسط کیتین تأثیری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دخیل در فرآیند دفاعی نداشت. بر اساس نتایج این مطالعه، ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار کیتین، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نسبت به نمونه‌های شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳). در پژوهش انجام شده توسط مرادی و همکاران (۲۰۱۶) فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه سیب زمینی، ۴۸ ساعت پس از تلقیح با قارچ تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد. کینازها و فاکتورهای رونویسی در انتقال سیگنال غیر اختصاصی قارچ‌ها نقش دارند که در نهایت منجر به بیان ژن‌های دفاعی می‌شوند. با این حال مکانیسم دفاعی مستقل از رونویسی، ممکن است به تنظیم کننده‌های کلیدی دیگری بستگی داشته باشد. یکی از این عوامل، سیگنال‌های ایجاد شده حاصل از تجمع ROSها می‌باشد.

هم‌چنین در تحقیقی که روی برگ خردل انجام شد، مشخص شد که بیان کلاس IV کیتیناز ۴۸ ساعت پس از تلقیح با قارچ *Alternaria* افزایش یافت (Rawat *et al.*, 2017). بیان ژن‌های کیتینازی در مواجهه با پاتوژن در گیاه آراییدوپسیس بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که رونوشت کلاس IV کیتیناز پس از تلقیح با قارچ به سرعت در برگ انباشته شد. این موضوع نشان داد که این کلاس ژنی از کیتینازها در وقایع اولیه واکنش فوق حساسیت دخالت دارند (Liliane *et al.*, 1997). بعلاوه مشخص شده است که جراحت به اندام‌های گیاهی، موجب تحریک پروموتور ژن کدکننده کیتیناز در برگ‌های گیاه خردل می‌شود. تحریک پروموتور این ژن‌ها به این دلیل است که پروموتور ژن کیتیناز IV در گیاه مذکور دارای عناصر تنظیمی برای سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و زخم می‌باشد (Van loon *et al.*, 2006). ژن‌های کیتیناز کلاس V بیشتر در فرآیندهای رشد و نمو درگیر هستند (Kopparapu *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2004). با توجه به اینکه افزایش استقامت گیاه، راه حل کلیدی برای مقابله با پاتوژن به شمار می‌آید، افزایش بیان این کلاس ژنی و تولید پروتئین‌های مربوط به آن در شرایط حمله پاتوژن و تلقیح کیتین توسط گیاه ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به عناصر تنظیمی شناسایی شده در نواحی پروموتری کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز سیب زمینی در پایگاه داده [PLACE](https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) می‌توان یکی از دلایل بیان پایین ژن کلاس III را به تعداد کمتر عناصر تنظیمی در پروموتور این کلاس ژنی مرتبط دانست (شکل ۳). بیان بالای کیتینازهای کلاس I علاوه بر تعداد زیاد عناصر



**شکل ۲.** ساختار ژن‌های کیتیناز انتخابی این مطالعه. عناصر تنظیمی مرتبط با بیماری در نواحی پرموتر ژن‌های کیتیناز در سمت چپ و نواحی اگزون و اینترون در ساختار ژن‌های کیتیناز سیب زمینی انتخابی در سمت راست نشان داده شده است.



**شکل ۳.** مقایسه میانگین اثر تلقیح کیتین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه سیب زمینی. حروف لاتین مشابه عدم معنی □ داری در سطح ۱ درصد با آزمون دانکن را نشان می‌دهد. CAT: کاتالاز، APX: آسکوربات پروکسیداز.

(Moradi *et al.*, 2016)، حضور مقادیر پایه از گونه‌های فعال اکسیژن در ساعات اولیه تا ۴۸ ساعت پس از حمله پاتوژن و یا تلقیح کیتین، به دلیل اثر مثبت رادیکال‌های آزاد بر بیان ژن‌های دفاعی و همچنین محافظت از گیاه در مقابل نفوذ پاتوژن، منطقی به نظر می‌رسد.

### نتیجه گیری و پیشنهادها

بر اساس بررسی داده‌های ریزآرایه، مشخص است که بیان ژن‌های کیتیناز در گیاه سیب زمینی، ۴۸ ساعت پس از تلقیح با کیتین فعال می‌شوند که این موضوع نشان دهنده نقش مهم آن‌ها در پاسخ به تنش‌های زیستی به ویژه قارچ‌ها و اوومیسیت‌های بیمارگری با دیواره سلولی کیتین‌دار است. کیتینازها یکی از موثرترین عوامل زیستی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی هستند. از کیتینازها به صورت کاربرد خارجی، برای کنترل کپک پودری توت فرنگی به صورت اسپری روی میوه‌ها و برگ‌ها

تجمع ROSها مثل  $H_2O_2$  اولین واکنش گیاه در شرایط تنش‌های مختلف در گیاه میزبان محسوب می‌شود. مولکول‌های ROS تشکیل شده در این مرحله ممکن است به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی عمل کنند. هم‌چنین  $H_2O_2$  با ایجاد اتصالات عرضی بین پروتئین‌های دیواره سلولی در تقویت دیواره سلولی شرکت می‌کند. گیاهان با استفاده از این روش، دسترسی پاتوژن‌های قارچی را به پروتوپلاست گیاهی محدود می‌کنند (Huckelhoven, 2007). مطالعات نشان می‌دهند که آسکوربات آپوپلاستی برای رشد و دفاع گیاه مهم است، ویتامین C‌های جهش یافته یکسری زخم‌های میکروسکوپی را بصورت خودبخودی ایجاد می‌کنند که باعث بیان ژن‌های مرتبط با پاتوژن می‌شوند و مقاومت در برابر عوامل قارچی را ایجاد می‌کنند (Pavet *et al.*, 2005). با توجه به اینکه در تحقیقات اغلب ۹۶ ساعت پس از آلودگی قارچی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای کاهش و جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد



و فعالیت کیتینازی آن مشکل است، از این رو استفاده از این آنزیم‌ها به صورت محلول پاشی تقریباً و در حال حاضر امکان‌پذیر نیست. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، می‌توان از محلول پاشی کیتین برای القای ژن‌های کیتیناز و مقابله با پاتوژن استفاده کرد. همچنین می‌توان به کمک روش‌های مهندسی ژنتیک، ژن‌های پاسخ دهنده در اثر القای کیتین را همسانه سازی نمود و از آنها برای ایجاد گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری استفاده نمود.

استفاده شده است. هم‌چنین برای کنترل بیماری قارچی در گیاه جو به صورت ریزتزیقی در سلول‌های اپیدرمی کولتوپتیل جو نیز کاربرد دارد. کیتین، ماده اصلی دیواره سلولی برخی قارچ‌ها و اوومیست‌ها است. کیتینازها با تجزیه کیتین موجود در دیواره سلولی، باعث حفاظت از گیاه در برابر حمله قارچ و جلوگیری از گسترش آن در بافت‌ها می‌شوند. تولید آنزیم کیتیناز فرآیندی مشکل و هزینه‌بر است، ضمن آنکه حفظ و نگهداری ساختار آنزیم

## References

- Abd Elhamid, M. I., Makboul, H. E., Sedik, M. Z., Ismail, I. M., & Ibrahim, M. A. (2010). Cloning, expression and antifungal activity of an endochitinase gene derived from barley (*Hordeum vulgare*). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6 (3), 356-363.
- Abeles, F. B., Bosshart, R. P., Forrence, L. E., & Habig, W. (1971). Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiology*, 47 (1), 129-134.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.
- Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324 (5928), 742-744.
- Bravo, J. M., Campo, S., Murillo, I., Coca, M., & San Segundo, B. (2003). Fungus-and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. *Plant molecular biology*, 52, 745-759.
- Cao, J., & Tan, X. (2019). Comprehensive analysis of the chitinase family genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plants*, 8 (3), 52.
- Chen, R. D., Yu, L. X., Greer, A. F., Cheriti, H., & Tabaeizadeh, Z. (1994). Isolation of an osmotic stress-and abscisic acid-induced gene encoding an acidic endochitinase from *Lycopersicon chilense*. *Molecular and General Genetics MGG*, 245, 195-202.
- Chen, J., Piao, Y., Liu, Y., Li, X., & Piao, Z. (2018). Genome-wide identification and expression analysis of chitinase gene family in *Brassica rapa* reveals its role in clubroot resistance. *Plant science*, 270, 257-267.
- Cota, I. E., Troncoso-Rojas, R., Sotelo-Mundo, R., Sánchez-Estrada, A., & Tiznado-Hernández, M. E. (2007). Chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Scientia Horticulturae*, 112 (1), 42-50.
- Ellis, J., Dodds, P., & Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current opinion in plant biology*, 3 (4), 278-284.
- Felle, H. H. (2001). pH: signal and messenger in plant cells. *Plant biology*, 3 (06), 577-591.
- Gurr, S. J., & Rushton, P. J. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it?. *TRENDS in Biotechnology*, 23 (6), 283-290.
- Gregorova, Z., Kovacik, J., Klejdus, B., Maglovski, M., Kuna, R., Hauptvogel, P., & Matusikova, I. (2015). Drought-induced responses of physiology, metabolites, and PR proteins in *Triticum aestivum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (37), 8125-8133.
- Hashimoto, M., Kisseleva, L., Sawa, S., Furukawa, T., Komatsu, S., & Koshiha, T. (2004). A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant and cell physiology*, 45 (5), 550-559.
- Heller, J., & Tudzynski, P. (2011). Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annual review of phytopathology*, 49, 369-390.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45, 101-127.
- Jeffares, D. C., Penkett, C. J., & Bähler, J. (2008). Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends in genetics*, 24 (8), 375-378.
- Liliane, B. D. A., Sachetto-Martins, G., Contarini, M. G., Sandroni, M., Ferreira, R. D. P., de Lima, V. M., ... & Margis-Pinheiro, M. (1997). Arabidopsis thaliana class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. *Febs Letters*, 419 (1), 69-75.

- Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Moghaddam, G. A., Rezayatmand, Z., Esfahani, M. N., & Khozaei, M. (2019). Genetic defense analysis of tomatoes in response to early blight disease, *Alternaria alternata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 500-509.
- Moradi, N., Rahimian, H., Dehestani, A., & Babaeizad, V. (2016). Cucumber Response to *Sphaerotheca fuliginea*: Differences in antioxidant enzymes activity and pathogenesis-related gene expression in susceptible and resistant genotypes. *J Plant Mol Breed*, 4(2), 33-40.
- Muleta, H. D., & Aga, M. C. (2019). Role of nitrogen on potato production: a review. *Journal of Plant Sciences*, 7 (2), 36-42.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22 (5), 867-880.
- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A. C., & Zeier, J. (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell*, 24 (12), 5123-5141.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., & Jones, J. D. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant physiology*, 135 (2), 1113-1128.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews*, 198 (1), 249-266.
- Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M. V., & Senthil-Kumar, M. (2017). Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Frontiers in plant science*, 8, 537.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniow, J., ... & Foyer, C. H. (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 139 (3), 1291-1303.
- Prasad, K., Bhatnagar-Mathur, P., Waliyar, F., & Sharma, K. K. (2013). Overexpression of a chitinase gene in transgenic peanut confers enhanced resistance to major soil borne and foliar fungal pathogens. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22, 222-233.
- Que, Y., Su, Y., Guo, J., Wu, Q., & Xu, L. (2014). A global view of transcriptome dynamics during *Sporisorium scitamineum* challenge in sugarcane by RNA-Seq. *PLoS One*, 9 (8), e106476.
- Rawat, S., Ali, S., Mitra, B., & Grover, A. (2017). Expression analysis of chitinase upon challenge inoculation to *Alternaria* wounding and defense inducers in *Brassica juncea*. *Biotechnology reports*, 13, 72-79.
- Roby, D., Toppan, A., & Esquerré-Tugayé, M. T. (1988). Systemic induction of chitinase activity and resistance in melon plants upon fungal infection or elicitor treatment. *Physiological and molecular plant pathology*, 33 (3), 409-417.
- Saboki Ebrahim, K. U., & Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Sci. Against Microb. Pathog*, 2, 1043-1054.
- Samet, M., Charfeddine, M., Kamoun, L., Nouri-Ellouze, O., Gargouri-Bouزيد, R. (2018) Effect of compost tea containing phosphogypsum on potato plant growth and protection against *Fusarium solani* infection. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 18921-18937.
- Schutzendubel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*, 53 (372), 1351-1365.
- Singh, H. R., Deka, M., & Das, S. (2015). Enhanced resistance to blister blight in transgenic tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze) by overexpression of class I chitinase gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Functional & integrative genomics*, 15, 461-480.
- Su, Y., Xu, L., Wang, S., Wang, Z., Yang, Y., Chen, Y., & Que, Y. (2015). Identification, phylogeny and transcript of chitinase family genes in sugarcane. *Scientific reports*, 5 (1), 10708.
- Tehrani, M. M., Esfahani, M. N., Mousavi, A., Mortezaeinezhad, F., & Azimi, M. H. (2020). Regulation of related genes promoting resistant in *Iris* against root rot disease, *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Genomics*, 112 (5), 3013-3020.
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and molecular plant pathology*, 55 (2), 85-97.

- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135-162.
- Wessels, J. G. H., & Sietsma, J. H. (1981). Fungal cell walls: a survey. In *Plant carbohydrates II: extracellular carbohydrates* (pp. 352-394). Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*.
- Zhu, M., Kong, C., Zhuang, M., Zhang, Y., Lv, H., Ji, J., ... & Yang, L. (2020). Genome-wide identification and expression analysis of chitin-binding gene family in *Brassica oleracea* L. reveals its role in different disease resistance.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125 (4), 749-760.

**ORIGINAL ARTICLE**

# Identification of miRNAs and their target genes in (*Camelina sativa* L.) transcriptome

Leila Farhadi<sup>1</sup>, Ali Arminian<sup>1</sup>, Sajad Rashidi-Monfared<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Agronomy and plant breeding Department, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

<sup>2</sup>Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

**Correspondence**

Sajad Rashidi-Monfared

Email: [rashidims@modares.ac.ir](mailto:rashidims@modares.ac.ir)

**How to cite**

Farhadi, L., Arminian, A., & Rashidi-Monfared, S. (2023). Identification of miRNAs and their target genes in (*Camelina sativa* L.) transcriptome. transcriptome. *Crop Biotechnology*, 12(43), 55-64.

**ABSTRACT**

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous and noncoding small RNA molecules with a length of 19-24 nucleotides (nts) that regulate target genes at the post-transcriptional level in plants. In this study, several miRNAs in *Camelina* were identified, and their potential roles were reported. *Camelina* with its scientific name (*Camelina Sativa* L.) is an oil-medicinal plant belonging to the Brassicaceae family. First the RNA was extracted from *C. sativa* leaf and sent to the Beijing genome institute for RNA-sequencing. Then the data were assembled denovo with Trinity software after removing the reads with lower quality than the threshold level and trimming them. Detection of miRNAs was then performed by miRDeep2 software. Accordingly, we identified 33 miRNAs from the leaf dataset, and their secondary structures were evaluated. The target genes of the detected miRNAs were identified by the psRNAtarget website. Examining the target genes showed that a total of 1415 genes are regulated by these microRNAs, which belong to several gene families with different biological functions, including the genes of proteins that bind to the Squamusa promoter, the protein kinase family, etc. Comparing the expression of microRNA carrying genes (TPM) in the two studied doubled haploid lines, showed that except for miR296 and miR474 which were more expressed in line number 1, the other miRNAs had higher expression in line number 2. Considering the lower amount of oil production in line number 1 compared to line number 2, this indicates the relationship of these two microRNAs with oil production. miR483 was not expressed in any of the lines. miR113 and miR206 had the highest expression levels among all microRNAs. The higher expression of micro RNAs in line 2 probably indicates the higher activity of the silencing mechanism at the transcription level for the target genes in this line compared to line number 1.

**KEY WORDS**

Transcriptome, Doubled haploid, *Camelina*, Micro RNA

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/>

نشریه علمی

## زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

## شناسایی میکرو RNAها و ژنهای هدف مرتبط در ترانسکرپتوم

گیاه *Camelina sativa L.*لیلا فرهادی<sup>۱</sup>، علی آرمینیان<sup>۱</sup>، سجاد رشیدی منفرد<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.  
<sup>۲</sup> گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

## چکیده

میکرو RNAها (miRNAs) دسته‌ای از مولکول‌های ریز RNA، غیر کدکننده‌ی درون‌زا، با طولی بین ۱۹-۲۴ نوکلئوتید هستند که ژنهای هدف را در سطح پس از رونویسی در گیاهان کنترل می‌کنند. در این مطالعه تعدادی از میکرو RNAهای موجود در گیاه کاملینا با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA شناسایی و معرفی شدند. گیاه کاملینا با نام علمی (*Camelina Sativa L.*) گیاهی روغنی- دارویی و متعلق به خانواده‌ی شب‌بوئیان (*Brassicaceae*) است. در ابتدا استخراج RNA از بافت برگ گیاه صورت گرفت و RNA استخراج شده جهت توالی‌یابی ارسال شد. داده‌ها پس از حذف خوانش‌های با کیفیت پایین‌تر از سطح آستانه و نیز پیرایش آن‌ها، با نرم‌افزار Trinity به صورت *denovo* سرهم‌بندی شدند. سپس شناسایی میکرو RNAها با نرم‌افزار miRDeep2 انجام شد. با استفاده از داده‌های ترانسکرپتوم گیاه و توالی‌های میکرو RNAهای شناخته‌شده در سایر گیاهان تعداد ۳۳ میکرو RNA شناسایی و ژنهای هدف آن‌ها با استفاده از برنامه‌ی psRNAtarget مشخص شدند. بررسی ژنهای هدف نشان داد که در مجموع ۱۴۱۵ ژن توسط این میکرو RNAها، تنظیم می‌شوند که متعلق به چندین خانواده‌ی ژنی با عملکردهای زیستی متفاوت از جمله ژنهای پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور *Squamosa*، خانواده‌ی پروتئین کیناز و ... هستند. مقایسه‌ی بیان ژنهای حامل میکرو RNA در دو لاین دابلدهاپلوئید مورد مطالعه، نشان داد که به غیر از miR296 و miR474 که در لاین شماره‌ی ۱ بیان بیشتری داشتند، بقیه میکرو RNAها در لاین شماره‌ی ۲ بیان بالاتری داشتند. این موضوع با توجه به پایین‌تر بودن میزان تولید روغن در لاین شماره‌ی ۱ نسبت به لاین شماره‌ی ۲ نشان‌دهنده‌ی ارتباط این دو میکرو RNA با تولید روغن است. miR483 در هیچ کدام از لاین‌ها بیان نداشت. miR113 و miR206 بالاترین میزان بیان را در بین همه میکرو RNAها داشتند. بیان بالاتر میکرو RNAها در لاین ۲ احتمالاً نشانگر فعالیت بالاتر مکانیسم خاموشی در سطح رونویسی برای ژنهای هدف در این لاین نسبت به لاین شماره‌ی ۱ می‌باشد.

## واژه‌های کلیدی

ترانسکرپتوم، دابلدهاپلوئید، کاملینا، میکرو RNA.

نویسنده مسئول:

سجاد رشیدی منفرد

رایانامه: rashidims@modares.ac.ir

استناد به این مقاله:

فرهادی، لیلا، آرمینیان، علی و رشیدی منفرد، سجاد (۱۴۰۲). شناسایی میکرو RNAها و ژنهای هدف مرتبط در ترانسکرپتوم گیاه کاملینا. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۳)، ۶۴-۵۵.

## مقدمه

دانه‌های روغنی پس از غلات دومین ذخایر غذایی جهان را تشکیل می‌دهند. هدف از مصرف روغن‌ها تأمین انرژی، اسیدهای چرب ضروری و ویتامین‌های محلول در چربی است. روغن‌های گیاهی به علت کاهش کلسترول خون واسطه‌های خوبی برای پخت غذا به حساب می‌آیند. بر اساس آمارهای موجود بیش از ۹۵ درصد روغن مورد نیاز کشور، وارداتی است (Raziei et al., 2018). وابستگی شدید کشور به واردات روغن‌های گیاهی، افزایش سرانه مصرف روغن در کشور و کاهش تولید روغن در داخل کشور از جمله موضوعات قابل تأمل در سیستم کشاورزی و صنایع غذایی کشور می‌باشند. گیاه کاملینا با نام علمی *Camelina sativa* L. روغنی - دارویی و متعلق به خانواده شب‌بوئیان (Brassicaceae) است که بومی شمال اروپا است و با عنوان کتان کاذب شناخته شده است (حسنی بلیانی، تدین و فدایی‌تهرانی، ۱۳۹۸) و علاوه بر مصارف خوراکی و درمانی، در صنعت به عنوان سوخت زیستی (Moser, 2016; Yang et al., 2016; Hoseini et al., 2018) و در مواد آرایشی بهداشتی (Gomez-Monedero et al., 2015) کاربرد دارد. برای تأمین مواد غذایی جمعیت با حفظ محیط‌زیست، کشاورزی نیازمند راهکارهایی در جهت کاهش استفاده از نهاده‌های شیمیایی و یا بهبود بهره‌وری از منابع طبیعی است. کشت گیاهانی مانند گیاه دانه روغنی کاملینا که عملکرد مطلوبی با حداقل استفاده از آب، کود و آفت‌کش‌ها، نسبت به گیاهان دانه روغنی معمول دارد، می‌تواند یک راهکار بالقوه در جهت تأمین بخشی از نیاز روغن خوراکی کشور باشد (Kahrizi et al., 2018). اگرچه کاملینا هنوز به طور گسترده کشت نمی‌شود، اما به دلیل انعطاف‌پذیری آن به عنوان یک گونه، می‌توان آن را گیاه خواهر کلزا (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) دانست (Kahrizi et al., 2023). این گیاه منبع غنی از روغن (۲۸ تا ۴۰ درصد)، اسیدهای چرب امگا ۳ و اسید اروسیک نسبتاً کم است (Chesnaïs et al., 2015). کاملینا قبل از سال ۲۰۰۵ یک گیاه تجاری محسوب نمی‌شد، اما با شناخت اسیدهای چرب امگا ۳ در این گیاه، کشت آن افزایش یافت (Kahrizi et al., 2023). در سالهای اخیر گرایش عمومی به روغن‌های باکیفیت، میزان توجه به این گیاه را افزایش داد و باعث شد کاملینا در مقیاس وسیعی در ایالات متحده، کانادا، کشورهای اروپایی، چین و استرالیا برای تحقیقات، کاربردهای خوراکی و به دلیل کم هزینه بودن تولید آن به عنوان ماده اولیه سوخت زیستی کشت شود (Dharavath et al., 2016). امروزه کشت کاملینا به دلیل بروز بحران‌های ناشی از مصرف انرژی‌های فسیلی، علاوه بر مصارف خوراکی، با هدف تولید سوخت زیستی هم

مورد توجه قرار گرفته است (درویشی، صبری و علوی، ۱۳۹۹). تعدادی لاین هاپلوئید مضاعف شده از این گیاه در دسترس است. در طول دهه گذشته، RNA-Sequencing (RNA-Seq) به یک ابزار ضروری برای آنالیزهای ترانسکریپتوم تفاوت بیان ژن و تفاوت پیرایش mRNAها، تبدیل شده است (Stark et al., 2019). کاربردهای آتی RNA-Seq به واسطه داده‌های خروجی بسیار حجیم هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند و می‌توانند بسیار متنوع باشند. امروزه با استفاده از تکنولوژی NGS، امکان توالی‌یابی و شناسایی طیف بسیار گسترده‌ای از ژن‌ها در مدتی کوتاه و در میان ژنوم پیچیده و عظیم گیاهی فراهم آمده است (Wanget al., 2009). از سوی دیگر نرم‌افزارهای متعددی برای سرهم‌بندی خوانش‌های خام حاصل از توالی‌یابی به وسیله هم‌ردیفی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع معرفی شده که عمل شناسایی ژن را در محیط نرم‌افزاری انجام می‌دهند (Duan et al., 2012). اما ژنوم مرجع برای بسیاری از گونه‌ها از جمله گونه مورد مطالعه در این پژوهش (کاملینا) در دسترس نیست. با این وجود و با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای به‌روز و معرفی تکنیک‌های NGS امکان مطالعه برای گونه‌های فاقد نقشه ژنومی نیز فراهم آمده (Bräutigam et al., 2011)، که در این حالت سرهم‌بندی *de novo*، این امکان را ایجاد کرده تا توالی کاملی از ترانسکریپتوم موجود را بازسازی و ژن‌های بیان‌شده در یک بافت خاص را شناسایی، مقدارسنجی و دسته‌بندی کنیم (Zhao et al., 2011).

میکروRNAها، RNAهای کوچک ۲۴-۱۹ هستند که به عنوان عوامل تنظیمی مهمی در بیان ژن‌ها مطرح می‌باشند. آنها توانایی تنظیم بیان ژن را در سطح پس از رونویسی دارند (Li et al., 2010). با وجود دانش موجود از نقش تنظیمی میکروRNAها، دخالت آنها در تنظیم بیوستنز متابولیت‌های ثانویه گیاهی هنوز به خوبی درک نشده است (Park et al., 2002). اولین میکروRNA گیاهی را در گیاه *Arabidopsis thaliana* شناسایی و نقش آن را تعیین کرد. کارایی به کارگیری روش‌های بیوانفورماتیکی برای شناسایی میکروRNAها در سایر گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است (Wang et al., 2012). بر پایه مطالعات یو و همکاران (2015)، فاکتور رونویسی SPL9، هدف mi156، مستقیماً به پروموتور ژن ترپین سنتز ۲۱ (TPS21) متصل شده و رونویسی آن را به طور مثبت تنظیم می‌کند و بدین ترتیب منجر به تنظیم مثبت سنتز سسکوئی ترپنوئید می‌شود (Yu et al., 2015). سیفی و همکاران (۲۰۱۵)، یازده میکروRNA را

جدول زیر آورده شده است (جدول ۱).

### استخراج RNA، تهیه کتابخانه cDNA و توالی‌یابی

RNA هر نمونه با استفاده از روش Triazol طبق پروتکل مربوط، استخراج شد. کمیت و کیفیت RNAها به وسیله اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۱ درصد تعیین گردید. متعاقباً RNAهای هر لاین از گیاهان جهت توالی‌یابی و آنالیز RNA-Seq به شرکت BeijingGenomes institute ارسال گردید.

### بررسی کیفیت نتایج توالی‌یابی

با توجه به تأثیر کیفیت داده‌های ورودی بر نحوه سرهم‌بندی ترنسکریپتوم، داده‌های توالی‌یابی شده توسط نرم‌افزار FastP (v0.20.1) از لحاظ کیفیت بررسی شدند و خوانش‌هایی که کیفیت لازم را نداشتند حذف شدند و نیز عملیات پیرایش برای خوانش‌های با کیفیت در صورت لزوم انجام گرفت.

### سرهم‌بندی *de novo* خوانش‌ها

پس از فرآیند پردازش داده‌های حاصل از توالی‌یابی، از خوانش‌های با کیفیت بالا به عنوان توالی‌های ورودی برای سرهم‌بندی ترنسکریپتوم برگ کاملینا استفاده شد. سرهم‌بندی خوانش‌ها به صورت *de novo* توسط نرم‌افزار Trinity (v2.6) با استفاده از پارامترهای کلیدی  $K=32$  و میزان پوشش خوانش ۲۰۰ در محیط لینوکس انجام گرفت.

### همردیفی خوانش‌های اولیه روی کاتیک‌های حاصل از

#### سرهم‌بندی خوانش‌ها

خوانش‌های کنترل کیفی و پیرایش شده با استفاده از نرم‌افزار Bowtie2 (v2.3.2) بر روی فایل خروجی حاصل از سرهم‌بندی همردیف شدند.

که در مسیر بیوسنتز استریول گلیکوزید نقش دارند را در گیاه استویا استخراج و ارتباط آنها را با سطح بیان میکرو RNA هدف آنها و همچنین محتوای استیول گلیکوزید اعتبارسنجی کردند (Saifi *et al.*, 2015). با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل جدید، چندین میکرو RNA درگیر در مسیر بیوسنتز سسکوئیتروپنوئید در گیاه زردینه (*X.strumarium*) شناسایی شده‌اند. از روش‌های بیوانفورماتیک برای پیش‌بینی میکرو RNAهای درگیر در متابولیسم تربنوئید در گیاه نعناء استفاده شده است (Singh *et al.*, 2016).

این مطالعه، یک بررسی جامع از جایگاه شناسایی میکرو RNAهای حفظ شده از طریق جستجو در داده‌های ترنسکریپتومی گیاه کاملینا می‌باشد و هدف از آن شناسایی میکرو RNAهای جدید در گیاه کاملینا و بررسی بیان برخی از میکرو RNAهای احتمالی شناخته شده با تأکید بر نقش تنظیمی آنها در مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که می‌تواند برای تحقیقات آینده بر روی این گیاه ارزشمند مفید باشد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

ابتدا بذور دو لاین دابلده‌اپلوئید انتخاب شده از گیاه کاملینا در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران در گلدان‌هایی به ابعاد ۱۴cm که با خاک پیت و ورمیکولیت پر شده، کشت گردید و مراقبت‌های لازم جهت رشد و نگهداری آنها صورت گرفت. زمانی که ارتفاع گیاهان به ۷-۶ cm رسید، اندام‌های هوایی از سه گیاه که به صورت تصادفی از هر لاین انتخاب شدند، جمع‌آوری شده و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA نگهداری شدند (در مجموع ۶ نمونه). دو لاین مورد مطالعه در این پژوهش و مشخصات آنها در

جدول ۱. خصوصیات دولاین مورد مطالعه از نظر محتوی توکوفرول ها و اسیدهای چرب

درصد روغن	درصد پروتئین	C16:0 (درصد)	C18:1 (درصد)	C18:2 (درصد)	C18:3 (درصد)	C20:1 (درصد)	C22:1 (درصد)	عملکرد روغن (kg/ha)	آلفا توکوفرول (ppm)	بتا توکوفرول (ppm)	دلتا توکوفرول (ppm)	گاما توکوفرول (ppm)	توکوفرول کل (ppm)	لاین
۳۵/۰۴	۲۹/۳۶	۶/۰۰	۱۵/۴۲	۱۶/۶۵	۳۴/۷۸	۱۴/۶۶	۳/۱۵	۲۹۳/۲۴	۱۵/۶۰	۱/۷۹	۱۸/۰۲	۸۰۶/۲۸	۸۴۱/۶۹	۱
۳۷/۱۷	۲۷/۴۲	۶/۰۷	۱۷/۷۶	۱۸/۷۱	۲۹/۶۲	۱۵/۲۹	۲/۸۸	۳۰۲/۹۳	۱۸/۲۳	۲/۶۱	۱۸/۷۵	۶۶۵/۸۸	۷۰۵/۴۷	۲

$$MFEI = [MFE / \text{sequence length} \times 100] / (G+C\%)$$

### شناسایی ژن‌های هدف میکروRNAها

علاوه بر تشخیص عملکرد زیستی میکروRNAها، یکی از مهم‌ترین موضوعات شناسایی ژن‌هایی است که میکروRNAها کنترل می‌کنند. میکروRNAها دارای نقش‌های مهم تنظیمی در بیان ژن در سطح پس از رونویسی با اتصال به mRNAهای هدف از طریق سرکوب ترجمه یا تجزیه mRNA هستند، بنابراین با استفاده از این ویژگی هدف‌های میکروRNA شناسایی می‌شوند (Dai and Zhao, 2011). شناسایی و آنالیز هستی شناسی ژن‌های هدف میکروRNAها از طریق پایگاه psRNATarget<sup>2</sup> انجام شد. با توجه به اینکه این پایگاه فاقد اطلاعات برای گونه مورد مطالعه بود، از اطلاعات موجود برای گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* استفاده گردید.

### نتایج و بحث

#### بررسی کیفیت نتایج توالی‌یابی

نتایج حاصل از توالی‌یابی شامل ۴۸,۱۹۲۲۵۲ میلیون خوانش به طول ۱۵۰ جفت باز برای لاین شماره ۱ و ۴۸,۲۰۰۸۲۲ میلیون خوانش برای لاین شماره ۲، در قالب فایل فست‌پی (FastP) از طرف شرکت ارسال گردید. بعد از فیلتراسیون این مقادیر به ۴۸,۱۳۹۶۶۰ میلیون خوانش برای لاین ۱ و ۴۸,۱۱۴۵۳۴ میلیون خوانش برای لاین ۲ کاهش یافت. درصد خوانش‌های با کیفیت در لاین ۱ برابر با ۹۹,۸۹٪ و در لاین ۲ برابر با ۹۹,۸۲٪ بود که نشان دهنده‌ی کیفیت بالای توالی‌ها می‌باشد. درصد محتوای GC در لاین شماره ۱ برابر با ۴۵ درصد و در لاین شماره ۲ برابر با ۴۶ درصد بود.

#### سرهم‌بندی *de novo* خوانش‌ها

پس از حذف خوانش‌های با کیفیت پایین، توالی‌های آداپتور و پیرایش خوانش‌ها، عملیات ساخت فایل ترنسکرپتوم سرهم شده بر اساس تلفیق خوانش‌های کنترل شده برای هر دو لاین مورد مطالعه به روش *de novo* توسط نرم‌افزار Trinity انجام شد. پس از پیرایش و حذف خوانش‌های بی‌کیفیت تعداد ۸۲۲۴۳ ژن و در مجموع ۱۸۲۰۲۱ ایزوفورم شناسایی شد. بیش از ۵۰ درصد از کانتیگ‌ها دارای طول برابر یا بیشتر از ۱۶۹۶bp بودند

### برآورد میزان فراوانی رونوش‌های حاصل از

#### سرهم‌بندی

برای بررسی میزان فراوانی خوانش‌های هم‌مدیف شده روی کانتیگ‌های سرهم شده حاصل از برنامه Bowtie2 از ابزار Salmon (v1.10.2) استفاده شد که این فرآیند با شمارش تعداد خوانش‌ها برای هر کانتیگ و نرمال سازی اندازه کتابخانه و طول کانتیگ‌ها برای هر ژن محاسبه می‌گردد.

#### شناسایی میکروRNAهای حفظ‌شده

شناسایی میکروRNAها طبق روش‌های محاسباتی گزارش شده انجام شد (Zhang et al., 2008; Yin et al., 2008; Unver and Budak., 2009). پس از سرهم‌بندی *de novo* کانتیگ‌های حاصل برای شناسایی میکروRNAهای حفظ‌شده استفاده شد و در نهایت miRNAها توسط نرم‌افزار miRDeep2 (v37) شناسایی شدند. دو پارامتر مهم در شناسایی میکروRNA عبارتند از حفظ شده بودن توالی پیش‌ساز میکروRNA در توالی‌های ترانسکرپتوم و داشتن ساختار ثانویه سنجاق‌سری مناسب. همولوژی توالی‌های پیش‌ساز میکروRNA با توالی‌های ترانسکرپتومی کاملینا به صورت با استفاده از هم‌مدیفی آنها انجام می‌گیرد. از پارامترهایی که برای بررسی همولوژی توالی‌های مورد نظر میکروRNAهای شناخته شده توسط برنامه در نظر گرفته می‌شود می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: (الف) بیش از دو تفاوت نوکلئوتیدی بین توالی miRNA و توالی ترانسکرپتومی وجود نداشته باشد (ب) در ناحیه بالغ میکروRNA و توالی ترانسکرپتوم نباید هیچ نوع حذف شدگی اتفاق بیافتد.

#### پیش‌بینی ساختار دوم میکروRNAها

برای پیش‌بینی *in silico* ساختار دوم توالی‌های ترانسکرپتوم انتخاب شده از پایگاه محاسباتی تحت وب MFOLD<sup>1</sup> بر مبنای الگوریتم زوکر (Zoker 2003) استفاده گردید. ساختار دوم پیش‌بینی شده بیشترین انرژی MFEI و کمترین انرژی MFE را دارد. هر دو این پارامترها برای تشخیص میکروRNAها از دیگر RNAهای کوچک مهم می‌باشند. انرژی MFE نشان دهنده انرژی آزاد شکل‌دهنده منفی (G) ساختارهای دوم پیش‌بینی شده است و مقدار انرژی MFEI طبق معادله زیر محاسبه می‌شود.

1. <http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>

2. <https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>



میکروRNAهای شناخته شده با توالی خوانش‌ها انجام می‌گیرد. سپس بررسی ساختار ثانویه به منظور حذف نتایج مثبت کاذب در شناسایی میکروRNAهای حفظ شده بالقوه مورد استفاده قرار گرفت. همه عملیات‌های بالا با استفاده از پکیج mirDeep2 انجام می‌گیرد. در مرحله بعد پیش‌ساز میکروRNAهای با MFEI کمتر از  $-0/8$  انتخاب شدند. مطالعات پیشین نشان می‌دهد بیش از ۹۶ درصد از پیش‌سازهای میکروRNAهای گیاهی دارای MFEI کمتر از  $-0/6$  هستند (Bonnet *et al.*, 2004). به منظور کاهش نتایج مثبت کاذب و افزایش دقت، توالی‌های با شاخص MFEI کمتر از  $-0/8$  در نظر گرفته شدند و مابقی توالی‌ها حذف شدند. پس از حذف رونوشت‌های مشابه در مجموع، خروجی نرم افزار mirDeep تعداد ۳۳ miRNA بود که مشخصات آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

(N50=1696bp). میانگین طول کانتیگ‌ها نیز برابر با ۱۰۹۱،۱۶ bp بود.

### شناسایی میکروRNAهای حفظ‌شده

توالی‌های ترانسکریپتومی به عنوان بخشی از توالی ژن‌های بیان شده در موجودات محسوب می‌شوند، که برای شناسایی و بیان میکروRNAهای پیش‌بینی شده با استفاده از روش‌های محاسباتی تاکنون در موجودات مختلفی از جمله آراییدوپسیس، ذرت و برنج بکار رفته است (Zhang *et al.*, 2006). اکثر میکروRNAهای شناسایی شده، قبلاً در گونه‌های گیاهی مدل از قبیل آراییدوپسیس، برنج و صنوبر گزارش شده‌اند.

از آنجا که اکثر میکروRNAهای گیاهی حفظ‌شده هستند، شناسایی از طریق همسانی کمک مؤثری در پیدا کردن میکروRNAها می‌باشد. عملیات شناسایی از طریق همردیفی

جدول ۲. miRNAهای شناسایی شده در گیاه *Camelina sativa* با استفاده از توالی‌های ترانسکریپتوم

نام miRNA	بالغ miRNA توالی	GC%	MFE	MFEI	LP
DN3705_c0_g1_i1_113	ucaauagauuggacuauauau	45.2%	-47	-1.42	73
DN3705_c0_g1_i2_121	ucaauagauuggacuauauau	46.6%	-47	-1.38	73
DN3705_c0_g1_i5_117	ucaauagauuggacuauauau	46.6%	-47	-1.38	73
DN14520_c0_g1_i1_206	ugacagaagagagugagcac	61.4%	-47.2	-1.1	70
DN14520_c0_g1_i2_202	ugacagaagagagugagcac	61.4%	-47.2	-1.1	70
DN14520_c0_g1_i4_208	ugacagaagagagugagcac	61.4%	-47.2	-1.1	70
DN14520_c0_g1_i5_204	ugacagaagagagugagcac	61.4%	-47.2	-1.1	70
DN14911_c1_g2_i1_261	ugacagaagaaagagagcac	60.5%	-31.8	-0.65	81
DN14911_c1_g2_i2_259	ugacagaagaaagagagcac	60.5%	-31.8	-0.65	81
DN17822_c0_g1_i1_302	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-41.1	-0.85	76
DN17822_c0_g1_i2_300	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-41.1	-0.85	76
DN17822_c0_g1_i4_304	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-41.1	-0.85	76
DN17822_c0_g1_i5_298	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-41.1	-0.85	76
DN17822_c0_g1_i6_306	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-42.4	-0.88	76
DN18166_c0_g1_i1_477	ugauugagccgugccaauauc	55.4%	-46.8	-1.14	74
DN18166_c0_g1_i2_481	ugauugagccgugccaauauc	55.4%	-46.8	-1.14	74
DN18166_c0_g1_i3_483	ugauugagccgugccaauauc	55.4%	-46.8	-1.14	74
DN18166_c0_g1_i4_479	ugauugagccgugccaauauc	55.4%	-46.8	-1.14	74
DN21203_c0_g1_i1_253	ugacagaagagagugagcac	63.2%	-48.4	-1.01	76
DN21203_c0_g1_i2_257	ugacagaagagagugagcac	63.2%	-48.4	-1.01	76
DN21203_c0_g1_i4_255	ugacagaagagagugagcac	63.2%	-48.4	-1.01	76
DN21473_c0_g1_i1_290	ucccaaauguagacaagca	59.2%	-43	-0.96	76
DN21473_c0_g1_i2_294	cuuugucuacaauuuuggaaa	56.8%	-42.8	-1.02	74
DN21473_c0_g1_i3_292	cuuugucuacaauuuuggaaa	56.8%	-42.8	-1.02	74
DN21473_c0_g1_i5_296	ucccaaauguagacaagca	59.2%	-43	-0.96	76
DN23144_c0_g1_i1_474	ugccuggcuccuguaugcca	53.7%	-41.9	-0.95	82
DN23242_c0_g1_i1_286	uauagagaguauuauagucac	55.7%	-43.2	-1.1	70
DN23242_c0_g1_i2_284	uauagagaguauuauagucac	55.7%	-43.2	-1.1	70
DN23242_c0_g1_i3_282	uauagagaguauuauagucac	55.7%	-43.2	-1.1	70
DN25977_c0_g2_i1_244	acgguaucucuccuacguaac	65.2%	-33.4	-0.74	69
DN37516_c0_g1_i1_428	ugccuggcuccuguaugcca	67.9%	-46.3	-0.87	78
DN37516_c0_g1_i2_424	ugccuggcuccuguaugcca	67.9%	-46.3	-0.87	78
DN38160_c0_g1_i1_5	ugacagaagagagugagcac	59.5%	-41.9	-0.84	84

شده است (Zhang *et al.*, 2006; Dhandapani *et al.*, 2011). ساختار ثانویه میکروRNAهای شناسایی شده با هشت معیار اجباری شناسایی میکروRNA در گیاهان مطابقت داشت (Axtell *et al.*, 2011). در شکل ۱ نمونه‌ای از ساختار ثانویه پیش‌ساز تعدادی از میکروRNAهای شناسایی شده در کاملینا نشان داده شده است. بخش میکرو RNA بال و مکمل آن به رنگ قرمز و آبی در تصویر مشخص شده است.

### پیش‌بینی ژن‌های هدف و چگونگی مهار آنها

بررسی ژن‌های هدف ۳۳ میکروRNA شناسایی شده نشان داد که در مجموع ۱۴۱۵ ژن توسط این میکروRNAها، تنظیم می‌شوند که متعلق به چندین خانواده ژنی با عملکردهای زیستی متفاوت هستند. نتایج نشان داد که ۱۰۸۱ ژن با عمل تخریب شدن (Cleavage) و ۳۳۴ ژن با عمل ترجمه تنظیم می‌شوند. مشخصات تعدادی از ژن‌های هدف برای میکروRNAها در جدول ۳ آورده شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده کمترین میزان انرژی (MFE) برابر با  $-48/4 \text{ kcal/mol}$  و بیشترین آن  $-31/8$  می‌باشد. پیش‌سازهای miRNA با بایستی بالاترین انرژی MFE و کمترین انرژی MFEI را برای تشکیل ساختار ثانویه نسبت به RNAهای غیرکدکننده و کدکننده داشته باشند (Bonnet *et al.*, 2004). در نتایج ما، بالاترین انرژی (MFEI) برابر با  $-0/65$  و کمترین آن  $-1/42$  می‌باشد (جدول ۲). مقادیر به دست آمده شاخص MFEI در مقایسه با tRNA ( $-0/64$ )، rRNA ( $-0/59$ ) و mRNA ( $-0/66$ ) کمتر بود (Zhang *et al.*, 2006) که نشان می‌دهد پیش‌ساز میکروRNAهای شناسایی شده میکروRNAهای واقعی هستند. بیشترین و کمترین طول پیش‌سازهای miRNA به ترتیب ۸۴ و ۶۹ نوکلئوتید می‌باشد که با سایر مطالعات مطابقت داشته است (Patanunet *et al.*, 2013). پیش‌ساز میکروRNAها در ساختار ثانویه دارای ساختار سنجاق‌سری هستند. محتوای AU نیز در پیش‌ساز میکروRNAها در مقایسه با محتوای GC بالاتر بود که در مطالعات قبلی نیز گزارش

جدول ۳. ژن‌های هدف شناسایی شده برای میکروRNAهای شناسایی شده در گیاه *Camelina sativa*

miRNA	عمل miRNA	ژن هدف	شماره شناسایی ژن هدف
DN3705_c0_g1_i1_113	cleavage	Ferrochelatase 1	AT5G26030.1
DN3705_c0_g1_i2_121	cleavage	RNA binding family protein	AT3G12640.1
DN3705_c0_g1_i5_117	cleavage	transmembrane protein-related	AT2G46060.2
DN14520_c0_g1_i1_206	cleavage	Squamosa promoter binding protein	AT2G33810.1
DN14520_c0_g1_i2_202	cleavage	Squamosa promoter	AT1G27360.2
DN14520_c0_g1_i4_208	cleavage	Squamosa promoter binding protein	AT5G50670.1
DN14520_c0_g1_i5_204	cleavage	Protein kinase superfamily protein	AT3G28690.1
DN14911_c1_g2_i1_261	Translation	Squamosa promoter binding protein	AT1G27370.1
DN14911_c1_g2_i2_259	Translation	Squamosa promoter	AT1G27360.4
DN17822_c0_g1_i1_302	cleavage	GRAS family transcription factor	AT4G00150.1
DN17822_c0_g1_i2_300	cleavage	HXXXXD-type acyl-transferase family protein	AT3G47170.1
DN17822_c0_g1_i4_304	cleavage	Succinyl-CoA ligase	AT5G23250.1
DN17822_c0_g1_i5_298	Translation	transposable element gene	AT3G43156.1
DN17822_c0_g1_i6_306	Translation	RING/U-box superfamily protein	AT2G38195.2
DN18166_c0_g1_i1_477	cleavage	GAP-like zinc finger-containing protein	AT1G08680.4
DN18166_c0_g1_i2_481	Translation	Ankyrin repeat family protein	AT1G10340.2
DN18166_c0_g1_i3_483	cleavage	BAK1-interacting receptor-like kinase	AT5G48380.1
DN18166_c0_g1_i4_479	cleavage	glutamate receptor 5	AT2G32400.1
DN21203_c0_g1_i1_253	cleavage	Protein kinase superfamily protein	AT3G28690.1
DN21203_c0_g1_i2_257	cleavage	Phosphofructokinase family protein	AT1G20950.1
DN21203_c0_g1_i4_255	cleavage	Homeodomain-like superfamily protein	At3g04450.2
DN21473_c0_g1_i1_290	cleavage	Pseudogene of pentatricopeptide repeat-containing protein	AT1G62860.1
DN21473_c0_g1_i2_294	cleavage	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	AT5G22080.1
DN21473_c0_g1_i3_292	cleavage	pseudogene similar to wall-associated kinase	AT1G16140.1
DN21473_c0_g1_i5_296	Cleavage	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	AT1G62860.1
DN23144_c0_g1_i1_474	cleavage	Auxin response factor 17	AT1G77850.1
DN23242_c0_g1_i1_286	cleavage	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	AT1G06580.1
DN23242_c0_g1_i2_284	cleavage	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	AT4G19440.1
DN23242_c0_g1_i3_282	cleavage	RNA processing factor	AT1G62670.1
DN25977_c0_g2_i1_244	cleavage	auxin response factor 10	AT4G03560.1
DN37516_c0_g1_i1_428	cleavage	auxin response factor 17	AT2G28350.1
DN37516_c0_g1_i2_424	cleavage	TPX2 C-terminal	AT1G77850.1
DN38160_c0_g1_i1_5	cleavage	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	KAG7604870.1

است. در شاخصه TPM هر اندازه مقدار آن بالاتر باشد به معنی بیان بالاتر خواهد بود. در این پژوهش مقایسه‌ی بیان ژن‌های حامل میکروRNA در دو لاین دابلدهاپلوئید مورد مطالعه، نشان داد که به غیر از miR296 و miR474 که در لاین شماره ۱ بیان بیشتری داشتند، بقیه میکروRNAها در لاین شماره ۲ بیان بالاتری داشتند، این موضوع با توجه به پایین تر بودن میزان تولید روغن در لاین شماره ۱ نسبت به لاین شماره ۲ نشان‌دهنده‌ی ارتباط این دو میکرو RNA با تولید روغن می‌باشد. miR483 در هیچکدام از لاین‌ها بیان نداشت. TPM میکروRNAهای miR261، miR483، miR290، miR428 و miR424 در لاین شماره ۱ برابر با صفر و میکروRNAهای miR474 و miR483 در لاین شماره ۲ برابر با صفر بود. miR113 و miR206 بالاترین میزان بیان را در بین همه میکروRNAها داشتند (جدول ۴). بیان بالاتر میکرو RNAها در لاین ۲ احتمالاً نشانگر فعالیت بالاتر مکانیسم خاموشی در سطح رونویسی برای ژن‌های هدف در این لاین نسبت به لاین شماره ۱ می‌باشد.

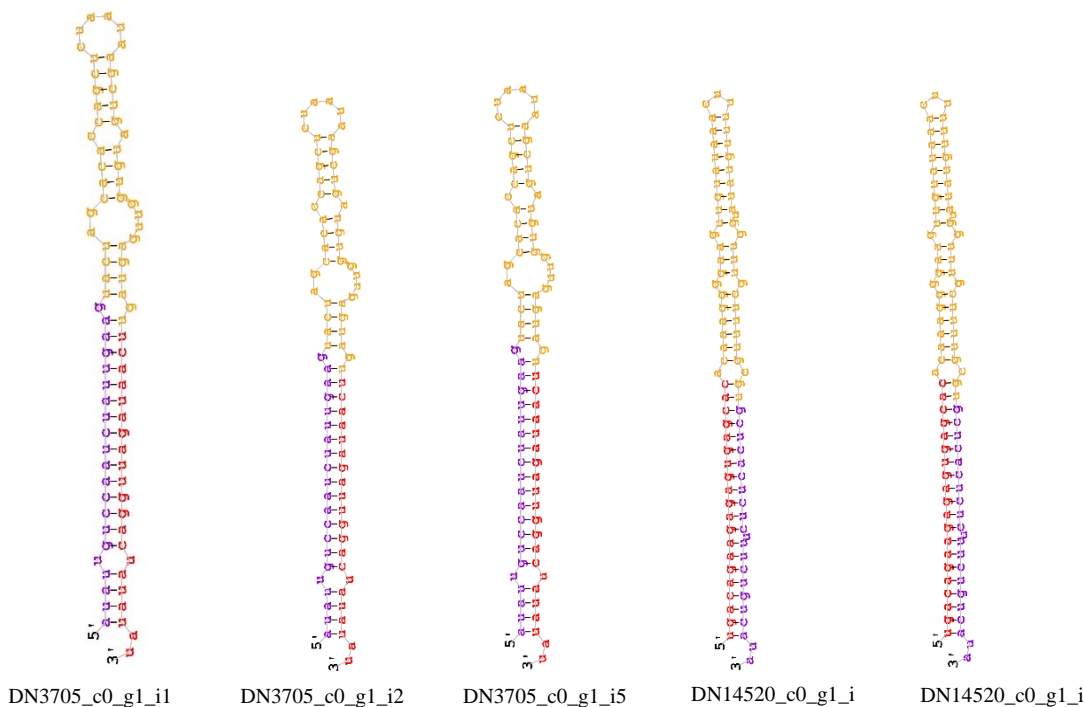
با توجه به نتایج هستی‌شناسی ژن‌های هدف، میکروRNAهای شناسایی شده در اغلب فرآیندهای زیستی و متابولیکی همچون تمایز، رشد و نمو، انتقال از مرحله رویشی به زایشی، انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نقش مهمی ایفا می‌کنند. از جمله هدف‌هایی که برای این میکروRNAها یافت شد، یکی پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور Squamusa و دیگری خانواده‌ی پروتئین کیناز هستند. پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور Squamusa، خانواده‌ای از فاکتورهای رونویسی هستند که با دمین اختصاصی متصل شونده به DNA شناخته می‌شوند.

### بررسی بیان ژن‌های حامل میکروRNAها

بررسی بیان ژن‌های حامل میکروRNA با استفاده از شاخصه TPM (Transcript Per Millions) که بیانگر تعداد خوانش‌های نرمال هم‌ردیف شده به آن است و نیز تعداد خوانش‌های هم‌ردیف شده به هر کانتینگ (Counts) برآورد شده

جدول ۴. مقایسه بیان ژن‌های حامل میکروRNAها در دو لاین دابلدهاپلوئید گیاه *Camelina sativa*

ژن حامل miRNA	TPM	Counts	TPM	Counts
	لاین ۱	لاین ۱	لاین ۲	لاین ۲
DN3705_c0_g1_i1_113	3.348838	112	5.042535	157
DN3705_c0_g1_i2_121	3.804317	129	4.402651	139
DN3705_c0_g1_i5_117	3.723067	125	4.446943	139
DN14520_c0_g1_i1_206	1.723683	71	5.986439	230
DN14520_c0_g1_i2_202	1.505351	61	3.175338	120
DN14520_c0_g1_i4_208	0.191110	2	0.524956	5
DN14520_c0_g1_i5_204	0.606384	25	1.326222	51
DN14911_c1_g2_i1_261	0.000000	0	1.136626	3
DN14911_c1_g2_i2_259	1.001970	6	0.564513	3
DN17822_c0_g1_i1_302	0.535791	5	0.827527	7
DN17822_c0_g1_i2_300	0.554457	4	0.618492	4
DN17822_c0_g1_i4_304	0.774785	7	0.733549	6
DN17822_c0_g1_i5_298	0.280199	3	0.307638	3
DN17822_c0_g1_i6_306	1.448320	14	1.709714	15
DN18166_c0_g1_i1_477	0.237481	2	0.394586	3
DN18166_c0_g1_i2_481	0.297121	2	0.332606	2
DN18166_c0_g1_i3_483	0.000000	0	0.000000	0
DN18166_c0_g1_i4_479	0.629994	1	0.747529	1
DN21203_c0_g1_i1_253	0.360193	3	0.399172	3
DN21203_c0_g1_i2_257	0.228897	2	0.506336	4
DN21203_c0_g1_i4_255	0.326677	3	0.120204	1
DN21473_c0_g1_i1_290	0.000000	0	0.300922	1
DN21473_c0_g1_i2_294	0.321043	2	3.609178	20
DN21473_c0_g1_i3_292	0.780913	3	5.115676	17
DN21473_c0_g1_i5_296	0.368263	2	0.208759	1
DN23144_c0_g1_i1_474	0.606665	2	0.000000	0
DN23242_c0_g1_i1_286	0.186800	2	0.307638	3
DN23242_c0_g1_i2_284	0.358664	4	0.884868	9
DN23242_c0_g1_i3_282	0.144834	2	0.394657	5
DN25977_c0_g2_i1_244	0.821298	8	1.696204	15
DN37516_c0_g1_i1_428	0.000000	0	0.298755	2
DN37516_c0_g1_i2_424	0.000000	2	0.448132	3
DN38160_c0_g1_i1_5	0.188648	1	0.428456	2



شکل ۱. ساختار ثانویه پیش‌ساز تعدادی از میکروRNAهای شناسایی شده در *Camelina sativa*

### نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر به منظور افزایش محتوای اطلاعات ژنتیکی کاملینا، پس از توالی‌یابی ترنسکرپتوم این گیاه، مرجع ترنسکرپتومی جامعی برای این گیاه ارزشمند سرهم‌بندی شد. مرجع ترنسکرپتومی ایجاد شده در مطالعه حاضر منبع بسیار غنی برای بررسی و تعیین خصوصیات میکروRNAهای حفظ‌شده گیاه کاملینا تشخیص داده شد، به طوری که در این مطالعه توالی ۳۳ میکروRNA حفظ‌شده در گیاه کاملینا شناسایی شدند.

میکروRNRها می‌توانند به عنوان ابزارهای اصلاحی جدید در بهبود ژنتیکی گیاهان عمل کرده و برخی از آنها تأثیر نیرومندی در تنظیم صفات عمده‌ی زراعی دارند. در این بررسی، برای تشخیص میکروRNAهای گیاه کاملینا، با یک رویکرد داده‌های زیستی مبتنی بر جستجوی همسانی، در ابتدا کانتیگ‌های سرهم شده بر اساس خوانش‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکرپتوم گیاه کاملینا در برابر میکروRNAهای شناخته شده‌ی پیشین، با استفاده از ابزار mirDeep2 همریف شدند و در نهایت ۳۳ میکروRNR نامزد متمایز در گیاه کاملینا شناسایی شد. این میکروRNAها نقش مهمی در مهار فرآیندهای زیستی مانند رشد و نمو، نور ساخت، سوخت و ساز و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. همچنین تعداد زیادی ژن از جمله ژن‌های پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور *Squamusa* و ... به

عنوان ژن‌های هدف این میکروRNAها شناسایی شدند. در صورت بررسی دقیق عملکرد ژن‌های هدف میکروRNAها می‌توان از آنها برای مهندسی مسیرهای هدف و یا اصلاح اهداف مورد نظر بهره جست. امروزه این ابزار توانمندی بالای خود برای نیل به این اهداف را در بسیاری از پروژه‌های مختلف انجام شده چه در گیاهان و چه در جانوان اثبات کرده است.

### منابع

Brautigam, A., Mullick, T., Schliesky, S. and Weber, A.P.M. (2011). Critical assessment of assembly strategies for non-model species Mrna-Seq data and application of next-generation sequencing to the comparison of C3 and C4 species. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3093-3102.

Chesnais, Q., Verzeaux, J., Couty, A., Le Roux, V., and Ameline, A. (2015). Is the Oil Seed Crop *Camelina sativa* a Potential host for aphid pests? *Bioenergy Research*, 8 (1), 91-99.

Darvishi, N., Sabri, M., & Alavi, M. (2021). Toward evaluation of the monolignol biosynthesis gene network with contemplation on the role of cinnamoyl coA reductase (CCR) gene family in *camelina sativa*. *Agricultural*

- metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol*, 12(17), 1484-1495. doi: 10.1016/s09609822(02)01017-5.
- Raziei, Z., Kahrizi, D. and Rostami, A.H. (2018). Effects of climate on fatty acid profile in *Camelina sativa*. *Cellular and Molecular Biology*, 64(5), 91-96.
- Saifi, M., Nasrullah, N., Ahmad, M. M., Ali, A., Khan, J. A., & Abdin, M. Z. (2015). In silico analysis and expression profiling of miRNAs targeting genes of steviol glycosides biosynthetic pathway and their relationship with steviol glycosides content in different tissues of *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 57-64.
- Singh, N., Srivastava, S., Shasany, A. K., & Sharma, A. (2016). Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of *Mentha* spp. *Computational Biology and Chemistry*, 64, 154-162.
- Stark, R., Grzelak, M., Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews | Genetics*.
- Teimoori, N., Ghobadi M., Kahrizi D. 2023. Improving the Growth Characteristics and Grain Production of *Camelina (Camelina sativa L.)* under Salinity Stress by Silicon Foliar Application. *Agrotechniques in Industrial Crops*, 3(1), 1-13. 10.22126/ATIC.2023.8681.1081
- Wang, M., Wang, Q., & Wang, B. (2012). Identification and characterization of microRNAs in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.). *PLoS One*, 7(4), e33696.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10, 57-63.
- Yang, J., Caldwell, C., Corscadden, K., He, Q.S. and Li, J. (2019). An evaluation of biodiesel production from *Camelina sativa* grown in Nova Scotia. *Industrial Crops and products*, 81, 162-168.
- Yu, Z. X., Wang, L. J., Zhao, B., Shan, C.M., Zhang, Y.H., Chen, D.F., & Chen, X.Y. (2015). Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and *Patchouli (Pogostemon cablin)* by the miR156-targeted SPL transcription factors. *Molecular Plant*, 8(1), 98-110.
- Zhao, Q.-Y., Wang, Y., Kong, Y.-M., Luo, D., Li, X. and Hao, P. (2011). Optimizing de novo transcriptome assembly from short-read RNA-Seq data: a comparative study. *BMC Bioinformatics*. 12: S2.
- Biotechnology Journal*, 12(4), 99-121. doi: 10.22103/jab.2020.16043.1245
- Dharavath, R. N., Singh, S., Chaturvedi, S., and Luqman, S. (2016). *Camelina sativa* Crantz a mercantile crop with speckled pharmacological activities. *Annals of Phytomedicine: An international journal*, 5(2), 6-26.
- Duan, J., Xia, C., Zhao, Jia, J. and Kong, X. (2012). Optimizing de novo common wheat transcriptome assembly using short-read RNA-Seq data. *BMC genomics*. 13, 392.
- Fallah, F., Kahrizi, D., Rezaeizad, A., Zebarzadi, A., & Zarei, L. (2020). Evaluation of Genetic Variation and Parameters of Fatty Acid Profile in Doubled Haploid Lines of *Camelina sativa* L. *Plant Genetic Researches*, 6(2), 79-96.
- Fereidooni L., Tahmasebi Z., Kahrizi D., Safari H., Arminian A. (2023). Evaluation of Drought Resistance of *Camelina (Camelina sativa L.)* Doubled Haploid Lines in the Climate Conditions of Kermanshah Province. *Agrotechniques in Industrial Crops* x(x): xx-xx. 10.22126/ATIC.2023.9570.1111
- Gomez-Monedero, B., Bimbela, F., Arauzo, J., Faria, J. and Ruiz, M.P. (2015). Pyrolysis of red eucalyptus, camelina straw wheat straw in an ablative reactor. *Energy & Fuel*, 29(3), 1766-1775.
- Hasani Balyani, M., Tadayon, M. R., & Fadaei Tehrani, A. A. (2020). Evaluation of some growth and yield traits of *Camelina sativa* L. under the influence of biological and chemical fertilizers. *Isfahan University of Technology-Journal of Crop Production and Processing*, 10(1), 39-51.
- Hoseini, S., Najafi, G., Ghobadian, B., Yusaf, T. and Ebadi, M. (2018). The effects of *Camelina Soheil* as a novel biodiesel fuel on the performance and emission characteristics of diesel engine. *Applied Sciences*, 8(6), 1010.
- Kahrizi, D. (2018). *Soheil* cultivar report of *Camelina* plant for cultivation in different regions of the country. Registration and certification of seeds and seedlings. Spring and summer 24-27. (in Persian).
- Li, L., Li, M., Qi, X., Tang, X., Zhou, Y. (2018). De novo transcriptome sequencing and analysis of genes related to salt stress response in *Glehnia littoralis*. *Peerj* 6: e5681;
- Moser, B.R. (2016). Fuel property enhancement of biodiesel fuels from common and alternative feed stocks via complementary blending. *Renewable Energy*, 85, 819-825.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA



## ORIGINAL ARTICLE

# Drought stress effect on agricultural traits and expression of genes encoding transcription factors *DREB2A* and *ZFP252* in rice

Alireza Tarang\*

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

### Correspondence

Alireza Tarang

Email: [a\\_tarang@hotmail.com](mailto:a_tarang@hotmail.com)

### How to cite

Tarang, A. (2023). Drought stress effect on agricultural traits and expression of genes encoding transcription factors *DREB2A* and *ZFP252* in rice. *Crop Biotechnology*, 12(43), 65-76.

## ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa*) is very sensitive to drought stress because of its limited adaptation to water-deficit conditions. Drought stress alters morphological, physiological, biochemical, and molecular responses in plant. In this study, the effects of drought stress on morphological traits and expression of transcription factor genes *DREB2A* and *ZFP252* at vegetative and reproductive stages were investigated in TH1 line (drought sensitive) and Neda (drought tolerant). Drought stress was induced by stopping irrigation at tillering and heading stages. Investigation of morphological traits showed tiller and panicle numbers as production indices were significantly higher in Neda cultivar than TH1 line. Real Time PCR Neda genotype showed a significant increase (3.217 expression ratio) in expression of transcript level of *ZFP252* at vegetative stage under drought stress. This indicates the importance of this drought stress responsive gene in acquisition of drought tolerance in this genotype at this stage. Investigation of expression level changes in TH1 line showed significant increase in *DREB2A* and *ZFP252* genes expression under drought stress at the vegetative stage. Gene expression analysis in this study suggesting that tolerant and sensitive plants may be using genetic regulations and different mechanisms to be exposed to stress conditions. Deciphering of these molecular mechanisms will aid to better understand stress tolerance and to select strategies for improving crop productivity facing climate change.

## KEYWORDS

Rice, Gene expression, Drought, Transcription factors.

نشریه علمی

## زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

# بررسی تاثیر تنش خشکی بر صفات زراعی و بیان ژن های کدکننده فاکتورهای رونویسی ZFP252 و DREB2A در برنج

علیرضا ترنگ<sup>\*۱</sup>

### چکیده

برنج (*Oryza sativa*) به دلیل سازگاری محدود با شرایط کم آبی، به تنش خشکی بسیار حساس است. تنش خشکی پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی را در این گیاه تغییر می‌دهد. در این تحقیق تاثیر تنش خشکی در مراحل رویشی و زایشی بر صفات مورفولوژیک و بیان ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی DREB2A و ZFP252 در لاین برنج TH1 (حساس به خشکی) و رقم ندا (متحمل به خشکی) مورد بررسی قرار گرفت. تنش خشکی از طریق توقف آبیاری در مراحل پنجه‌زنی و خوشه‌دهی اعمال شد. نتایج بررسی صفات مورفولوژیکی نشان داد تعداد پنجه و تعداد خوشه به عنوان شاخصی برای تولید در رقم ندا به طور معنی‌داری بیشتر از لاین TH1 بود. Real Time PCR نشان داد در رقم ندا تنش خشکی در مرحله رویشی باعث افزایش بیان ژن ZFP252 (به نسبت ۳/۲۱۷ برابر) شد. این امر نشان دهنده اهمیت این ژن پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در این ژنوتیپ در این مرحله رشدی می‌باشد. بررسی تغییرات میزان بیان ژن‌های DREB2A و ZFP252 در لاین TH1 حاکی از افزایش معنی‌دار بیان این دو ژن در نتیجه وقوع تنش خشکی در مرحله رویشی بود. آنالیز بیان ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی در این مطالعه بیانگر آن بود که گیاهان متحمل و حساس ممکن است از تنظیمات ژنتیکی و مکانیسم‌های متفاوتی در مواجهه با شرایط تنش استفاده کنند. رمزگشایی از این مکانیسم‌های مولکولی به درک بهتر تحمل به تنش و انتخاب استراتژی‌هایی برای بهبود بهره‌وری محصول در مواجهه با تغییرات آب و هوایی کمک می‌کند.

### واژه‌های کلیدی

برنج، بیان ژن، خشکی، فاکتورهای رونویسی.

پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران..

نویسنده مسئول:

علیرضا ترنگ

رایانامه: a\_tarang@hotmail.com

استناد به این مقاله:

ترنگ، علیرضا (۱۴۰۲). بررسی تاثیر تنش خشکی بر صفات زراعی و بیان ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی ZFP252 و DREB2A در برنج. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۳)، ۶۵-۷۶.



ژن‌ها را تسهیل کرده است (هادیارتو و تران، ۲۰۱۱). این امید وجود دارد که فناوری تراریخته بتواند تحمل به تنش را با وارد کردن ژن‌های خارجی جدید یا تغییر سطح بیان ژن‌های داخلی بهبود بخشد (یاماگوچی و بلوموالد، ۲۰۰۵). یکی از ژن‌های کاندید امیدوارکننده مورد استفاده در مهندسی تحمل به خشکی فاکتور رونویسی DREB2A می‌باشد (ساندیا، تالاکایالا و راوولا، ۲۰۲۱). فاکتورهای رونویسی DREB2A در مکانیسم‌های تنظیمی که در برخی گیاهان در پاسخ به تنش‌های خشکی، شوری و گرمایی وجود دارد، دخیل هستند (میزوئی، شینوزاکی و شینوزاکی، ۲۰۱۲). بر طبق اظهارات هراواتی، آلنوپری و مصدر (۲۰۲۱) ژن‌های DREB2A تحمل به خشکی در بوته‌های برنج را کنترل می‌کنند. لی و همکاران (لی، ژانگ و یانگ، ۲۰۲۱) نیز اظهار داشتند ZFP252 یک تنظیم کننده رونویسی است که بیان ژن‌های پاسخگو به تنش و تجمع حفاظت کننده‌های اسمزی را از طریق مسیر وابسته به ABA در راستای ایجاد تحمل به تنش‌های خشکی و اکسیداتیو در برنج تنظیم می‌کند. گزارشات متعددی در راستای تغییرات در میزان بیان این ژن در شرایط تنش خشکی وجود دارد، از آن جمله اکبرپور، خاوری‌نژاد و مومنی (۲۰۱۶) اظهار داشتند تنش خشکی سبب تغییر چندانی در میزان بیان این ژن در رقم متحمل به خشکی برنج در مقایسه با شرایط نرمال آبیاری نمی‌گردد. فاکتورهای رونویسی ابزارهای قدرتمندی برای مهندسی ژنتیک هستند، زیرا فوق تظاهر یک فاکتور رونویسی می‌تواند منجر به افزایش بیان کل مجموعه ژن‌های تحت کنترل آن‌ها شود (دوبوزت، ساکوما و ایتو، ۲۰۰۳). با توجه به اهمیت فاکتورهای رونویسی در واکنش گیاه برنج به خشکی، بررسی میزان تغییر در بیان ژن‌های کد کننده‌ی این فاکتورها در مواجهه با خشکی می‌تواند در افزایش درک ما از نقش و عملکرد این فاکتورها در ارقام بومی جهت استفاده از آن‌ها برای اصلاح واریته‌های برنج مقاوم و یا متحمل به تنش خشکی مفید باشد.

## مواد و روش‌ها

### رشد گیاه و شرایط تنش خشکی

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۹ در گلخانه‌ی پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری رشت اجرا شد. بذور یک رقم برنج ایرانی ندا (متحمل به خشکی) (اکبرپور، خاوری‌نژاد و مومنی، ۲۰۱۶؛ ملازاده، ترنگ و زارع، ۲۰۱۶) و لاین TH1 (لاین حاصل از خالص‌سازی توده برنج رقم هاشمی حساس به خشکی) پس از تهیه از مؤسسه تحقیقات برنج کشور، به منظور جوانه‌زنی در

## مقدمه

کشاورزی در قرن بیست و یکم با چالشی جدی برای دستیابی به افزایش حدوداً ۷۰ درصدی در بهره‌وری محصولات تا سال ۲۰۵۰ مواجه است (جوشی، کاران و سینگلاریک، ۲۰۱۶؛ وانگ، لی و مائو، ۲۰۱۶) در میان عوامل غیرزیستی مختلف که تولید محصولات زراعی را در سطح جهان به چالش می‌کشند، تنش خشکی به طور فزاینده‌ای نقش مهمی ایفا می‌کند. با افزایش فراوانی تغییرات اقلیمی جهانی، وقوع خشکی در دنیا تا پایان این قرن بیش از ۲۰ درصد افزایش خواهد یافت (سینگ و لاکسمی، ۲۰۱۵). برنج (*Oryza sativa*)، غله‌ی مقرون به صرفه شناخته شده در جهان، به عنوان یک گیاه semiaquatic، قادر است در خاک‌های غرقاب به خوبی رشد کند (ژائو و تونگ و ایزنگا، ۲۰۱۱). با این حال، این گیاه به دلیل سیستم ریشه‌ای کوچک، موم نازک کوتیکولی و بسته شدن سریع روزنه‌ها یکی از گیاهان حساس به خشکی محسوب می‌شود (جی، وانگ و سان، ۲۰۱۲). خشکی به طور قابل توجهی رشد و نمو را در نتیجه کاهش رشد ریشه مختل نموده، تعداد پنجه‌ها (اشفق، هایدن و خان، ۲۰۱۴)، ارتفاع بوته (سوکوتو و موحد، ۲۰۱۴) و ظرفیت فتوسنتزی را کاهش می‌دهد، منجر به آسیب اکسیداتیو به کلروپلاست‌ها، محدود کردن واکنش‌های متابولیک و کاهش تجمع و تقسیم ماده خشک می‌شود (فاروق، وحید و لی، ۲۰۰۹). همچنین تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) در بخش‌های مختلف سلولی، مانند میتوکندری، پراکسی‌زوم‌ها و کلروپلاست‌ها، نتیجه اجتناب‌ناپذیر کمبود آب است (هانسن، گو و جونز، ۲۰۰۶). هنگامی که گیاهان برنج در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند، با فعال کردن مجموعه‌ای از مکانیسم‌های تنظیمی پیچیده به آن پاسخ می‌دهند (فوکائو و گزیونگ، ۲۰۱۳). به عبارت دیگر مقاومت به خشکی در برنج یک ویژگی پیچیده است که توسط پلی ژن‌ها یا کمپلکس‌های ژنی تنظیم می‌شود. شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی برای درک مکانیسم‌های مقاومت به خشکی در محصولاتمانند برنج از اهمیت بالایی برخوردار است. این ژن‌های کاندید می‌توانند در توسعه‌ی سیستم‌های MAS<sup>۱</sup> برای تحمل به خشکی در برنامه‌های اصلاح مولکولی استفاده شوند (ندیم، ناواز و شهید، ۲۰۱۸). پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی، جداسازی و شناسایی تعداد فزاینده‌ای از این

دقیقه در درجه حرارت اتاق با DNase تیمار شدند. سپس رشته‌ی اول cDNA مطابق با دستورالعمل موجود در کیت مورد استفاده برای سنتز cDNA (Thermo Scientific) سنتز شد. در اولین مرحله از ساخت cDNA ابتدا غلظت‌های نمونه‌های RNA همسان‌سازی شد و دو میکروگرم در میکرولیتر در واکنش RT-PCR قرار داده شد. این کار به‌منظور در اختیار گرفتن احتمال مساوی برای تمام نمونه‌های RNA با غلظت‌های مختلف برای ساخت cDNA انجام شد. حجم نهایی مخلوط پایه ۲۵ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵X، ۱۱/۲۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز موجود در کیت، ۱/۲۵ میکرولیتر RiboLock RT (۲۰ واحد در میکرولیتر) به عنوان ممانعت کننده یا بازدارنده RNase، ۱/۲۵ میکرولیتر آغازگر هگزامر تصادفی (۰/۲ میکروگرم در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار و ۱/۲۵ میکرولیتر RevertAid آنزیم Reverse Transcriptase از نوع M-MuLV (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) بود. کیفیت همه‌ی نمونه‌های cDNA با همه‌ی جفت آغازگرها و فرآورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ تست شد.

### طراحی آغازگر

با توجه به عملکرد ژن‌های کدکننده برخی از فاکتورهای رونویسی درگیر در تحمل به تنش خشکی، توالی ژن‌های ZFP252، DREB2A از پایگاه داده‌ی NCBI به دست آمد. سپس با استفاده از نرم افزار آنالاین Primer3 آغازگرهای اختصاصی برای این ژن‌ها طراحی شد (جدول ۱). توالی آغازگرهای طراحی شده با استفاده از بلاست مورد بررسی قرار گرفت تا از اختصاصی بودن محل اتصال آن‌ها اطمینان حاصل شود. ژن 18S rRNA (لیو، کاپور و دوان، ۲۰۱۲) به عنوان ژن مرجع (یا ژن خانه‌دار) به منظور نرمال‌سازی داده‌های PCR کمی مورد استفاده قرار گرفت. سپس بیان این ژن‌ها در شرایط تنش و شرایط طبیعی در دو رقم برنج مذکور، مورد بررسی قرار گرفت.

جعبه‌های مخصوص کشت داده شدند. نشاها در مرحله‌ی ۲ الی ۳ برگی به گلدان‌های پلاستیکی به ابعاد ۲۵×۲۵ به تعداد ۳ بوته در هر گلدان منتقل شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در شرایط گلخانه‌ای در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل رقم در دو سطح (رقم ندا و لاین TH1)، تنش در سه سطح (بدون تنش، تنش در مرحله رویشی و زایشی) بود. جهت اعمال تنش خشکی در مرحله رویشی، در مرحله‌ی آغاز پنجه‌زنی آبیاری به مدت ۲۰ روز، قطع شد. بوته‌های شاهد به‌طور معمول آبیاری شدند. در مرحله زایشی پس از مشاهده‌ی مرحله آبستنی و در سن ۸۰ روزگی برای لاین TH1 و در سن ۹۰ روزگی برای رقم ندا (به دلیل داشتن مرحله رویشی بلندتر) به مدت ۱۸ روز جهت اعمال تنش خشکی اقدام به قطع آبیاری گلدان‌ها شد. در هر دو مرحله رویشی و زایشی پس از اعمال تنش خشکی و با مشاهده علایم تنش از قبیل لول شدن برگ‌ها، خشک شدن و ترک برداشتن خاک گلدان‌ها نمونه‌برداری از برگ‌ها انجام شد. برگ‌ها تا زمان استخراج RNA در ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. همچنین صفات مورفولوژیک شامل تعداد پنجه در هر کپه، تعداد خوشه در بوته، ارتفاع بوته، وزن خوشه در بوته، طول و عرض برگ پرچم، مساحت برگ پرچم، وزن تر و وزن خشک بوته، در ارقام حساس و متحمل به خشکی در شرایط تنش و شرایط نرمال آبیاری مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. وزن تر و خشک نیز پس از رسیدن کامل بوته‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل با استفاده از معرف ترایزول (اینویترژن) از نمونه‌های شاهد و نمونه‌های تحت تنش در مراحل رشدی رویشی و زایشی استخراج شد. کیفیت و کمیت نمونه‌های RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و نانودراپ (NanoDrop2000) مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور اطمینان از عدم وجود آلودگی احتمالی با DNA ژنومی نمونه‌های RNA، از آنزیم DNase I استفاده شد. بدین منظور نمونه‌ها به مدت ۱۵

جدول ۱. مشخصات و توالی آغازگرها

شماره دسترسی	نام ژن	دمای اتصال (°C)	طول محصول PCR (جفت باز)	نوع آغازگر	توالی آغازگر
1AP014957	DREB2A	۶۱	۱۴۷	F	ACCTCATTGGGTCAGGAAGAAG
				R	TTCTTGGACCCCTTGGCTG
AP014968.1	ZFP252	۶۶	۱۶۰	F	AGGTGGTGGTGGAGACGAAA
				R	TCGTAGTGGCATCGCTTGTG
				F	ATGGTGGTGACGGGTGAC
				R	CAGACACTAAAGCGCCCGTA

### آنالیز بیان ژن با استفاده از Real Time PCR

واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه Real Time PCR (iCycler IQ5 real-time PCR, Bio-Rad) و با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی، در راستای مشخص کردن میزان بیان ژن‌های فاکتورهای رونویسی مورد بررسی انجام شد. شرایط دمایی اتصال آغازگرها و محتویات مخلوط پایه توسط PCR متداول قبل از انجام واکنش Real Time PCR بهینه‌سازی شد. جهت حصول دمای اتصال مناسب از گرادیان دمایی ۵۰ الی ۶۴ درجه سانتیگراد در شرایط PCR گرادیانت استفاده شد. کیت مورد استفاده (Thermo scientific maxima SYBR Green/ ROX qPCR master mix) حاوی سه تیوب ۱/۲۵ میلی‌لیتری از مخلوط پایه واکنش و آب عاری از نوکلئاز بود که این مخلوط پایه واکنش دارای تمامی اجزای مورد نیاز برای انجام واکنش بود. جهت بدست آوردن کارایی تکثیر و همچنین تعیین غلظت مناسب برای رقیق‌سازی نمونه‌های cDNA جهت استفاده در واکنش نهایی، برای تمام ژن‌ها منحنی استاندارد ترسیم شد. هر واکنش در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۷/۵ میکرولیتر مخلوط پایه‌ی سایبرگرین، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت و ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود. چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله‌ی واسرشت سازی اولیه ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۴۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. تعیین کمیّت به وسیله افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ سایبر گرین به DNA دو رشته‌ای در انتهای هر سیکل انجام گرفت. در انتهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، عمل گسستن رشته‌های DNA و ایجاد منحنی ذوب به وسیله حرارت دادن آهسته نمونه‌ها از ۵۴ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ثبت مستمر کاهش در فلورسنس در نتیجه افتراق دو رشته DNA انجام شد. برای هر یک از نمونه‌ها، چرخه آستانه (Ct) که در آن افزایش فلورسنس ثبت شده در حد بالاتر از خط پایه برای اولین بار قابل تشخیص می‌گردد، تعیین شد (نویدشاد، سالکده و رویان، ۲۰۱۵).

### آنالیزهای آماری

به‌منظور تعیین بیان نسبی از نرم افزار REST که آنالیز داده‌ها را با استفاده از مدل فافل انجام می‌دهد، استفاده شد. مدل ریاضی فافل کمیّت نسبی یک ژن هدف را در مقایسه با ژن مرجع تعیین می‌کند. از مزایای استفاده از این مدل استفاده از کارایی تکثیر بدست آمده از منحنی‌های استاندارد برای تک تک ژن‌ها و محاسبه از طریق رابطه زیر می‌باشد (فافل، هورگان و دمپله، ۲۰۰۲).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C P_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C P_{\text{ref}}(\text{control-sample})}} \quad (\text{معادله ۱})$$

که در آن، Etarget کارایی تکثیر ژن هدف، Eref کارایی تکثیر ژن مرجع و ΔCp<sub>target</sub> و ΔCp<sub>ref</sub> از طریق کم کردن Ct نمونه شاهد از Ct نمونه تنش یافته بدست می‌آیند. محاسبه کارایی تکثیر از طریق فرمول زیر انجام می‌شود.

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{slope}}} \quad (\text{معادله ۲})$$

که در آن slope از منحنی‌های استاندارد حاصل می‌شود. محاسبات و تجزیه‌های آماری داده‌های مورفولوژیک با استفاده از نرم افزارهای SAS نسخه ۹٫۱ (SAS Institute, 2002) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام پذیرفت.

## نتایج و بحث

### صفات زراعی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین رقم ندا و لاین TH1 از نظر تمام صفات مورد بررسی بجز طول برگ پرچم و وزن تر اختلاف معنی‌داری وجود داشت. صفت ارتفاع بوته به طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفت. این نتایج با اظهارات عبدالله و همکاران (عبدالله، پاوار و کاله، ۲۰۱۵) مبنی بر کاهش ارتفاع بوته در گیاهان زراعی با افزایش شدت و مدت تنش خشکی مطابقت دارد. کاهش در ارتفاع بوته به دلیل کاهش طول سلول ناشی از کمبود آب است که باعث کاهش تورگور سلولی می‌شود (یوپادهییا و پاندا، ۲۰۱۹). اثر متقابل رقم در تنش خشکی نیز برای صفات وزن تر، وزن خشک، وزن خوشه، طول برگ پرچم و مساحت برگ پرچم معنی‌دار شد (جدول ۲). کاهش معنی‌دار القا شده توسط تنش خشکی در مساحت سطح برگ، ارتفاع بوته و بیوماس در کولتیوارهای برنج توسط کادام و همکاران (کادم، تامیلسلوان و لاواس، ۲۰۱۷) به اثبات رسیده است. تنش خشکی بر میتوز، طول

غیرزیستی با کاهش سطح برگ و در نتیجه کاهش تولید بیوماس تر و خشک، گیاهان زراعی را متأثر می‌سازد.

شدن و گسترش سلولی اثر گذاشته و در نهایت منجر به کاهش صفات مرتبط با رشد و عملکرد می‌شود. همچنین این تنش

## جدول ۲. تجزیه واریانس صفات زراعی در رقم ندا و لاین THI تحت تنش خشکی در مراحل رویشی و زایشی

میانگین مربعات

وزن خشک (گرم)	وزن تر (گرم)	مساحت برگ پرچم (سانتی‌متر مربع)	طول برگ پرچم (سانتی‌متر)	تعداد برگ پرچم (سانتی‌متر)	وزن خوشه	تعداد خوشه	تعداد پنجه	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	درجه آزادی	منابع تغییر
۱۵۶/۸۷**	۲۸۷/۰۳ <sup>ns</sup>	۱۱۲/۱۳**	۰/۶۳**	۲۱/۲۳ <sup>ns</sup>	۲۰۲/۹۸**	۱۵/۸۹*	۱۹/۱۳**	۸۶/۸۱**	۱	رقم
۸۲/۵۵ <sup>ns</sup>	۱۰۶۸/۴۷**	۳۹۵/۵۷**	۰/۰۰۵ <sup>ns</sup>	۵۸۹/۸۷**	۱۷/۹۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۱ <sup>ns</sup>	۱۰/۶۱*	۶۸/۹۴*	۲	تنش خشکی
۱۷۱/۲۸*	۷۵۷/۳۵*	۳۵/۱۸*	۰/۰۰۰ <sup>ns</sup>	۷۳/۹۵**	۱۴۸/۲۳**	۰/۰۷ <sup>ns</sup>	۰/۵۳ <sup>ns</sup>	۴۳/۸۷ <sup>ns</sup>	۲	رقم × تنش خشکی
۲۸/۵۷	۲۰۸/۵۴	۷/۰۱	۱/۰۱	۹/۱۹	۹/۸۹	۱/۹۸	۱/۷۶	۴۲/۱۵	۱۲	خطا
۱۰/۲۷	۸/۵۲	۹/۸۵	۴/۹۲	۱۰/۸۱	۱۱/۷۱	۸/۷۹	۱۳/۸	۸/۴۶		ضریب تغییرات (%)

<sup>ns</sup>: غیرمعنی‌دار، \*<sup>\*</sup>: معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، \*\*<sup>\*\*</sup>: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

کاهش سطح برگ در محصولات زراعی خود را نشان می‌دهد. بنابراین، اثرات منفی کمبود آب بر تغذیه‌ی معدنی و متابولیسم باعث کاهش سطح برگ می‌شود (زاین، اسماعیل و محمود، ۲۰۱۴). کاهش سطح برگ، رول شدن برگ، پژمردگی، پیری زودرس و بسته شدن روزنه‌ها نیز از دیگر صفات مورفولوژیکی مرتبط با تنش خشکی هستند که در نهایت منجر به کاهش در عملکرد می‌شوند (پاندا، میشا و بهاراه، ۲۰۲۱). وزن تر نیز در شرایط تنش خشکی (۶۵/۸۴ گرم) در مقایسه با شرایط نرمال (۸۵/۱۸ گرم) کاهش پیدا کرد که می‌تواند مبین ظرفیت نامناسب حفظ آب توسط گیاه برنج در شرایط کم‌آبی باشد (جدول ۳).

## جدول ۳. میانگین صفات مورد بررسی در شرایط تنش خشکی و

شرایط نرمال

تنش خشکی	تعداد پنجه	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	طول برگ پرچم (سانتی‌متر)	مساحت برگ پرچم (سانتی‌متر مربع)	وزن تر خشکی (گرم)
نرمال	۱۲/۹۶ <sup>a</sup>	۱۰۸/۷۴ <sup>a</sup>	۳۱/۵۶ <sup>a</sup>	۲۴/۱۸ <sup>a</sup>	۸۵/۱۸ <sup>a</sup>
تنش	۱۱/۴۹ <sup>b</sup>	۱۰۲/۵۴ <sup>b</sup>	۲۳/۷۳ <sup>b</sup>	۱۸/۷۴ <sup>b</sup>	۶۵/۸۴ <sup>b</sup>

تیمارهای با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نمی‌باشند.

## نتایج حاصل از صفات زراعی مورد بررسی در رقم ندا و

لاین THI

وزن خوشه در بوته و وزن خشک بوته در رقم ندا به ترتیب با داشتن میانگین ۳۴/۸۹ گرم و ۴۱/۵۸ گرم به‌طور معنی‌داری بیشتر از لاین THI بود. طول برگ پرچم در لاین THI (۲۸/۲۳)

## نتایج حاصل از صفات زراعی مورد بررسی در شرایط

### تنش خشکی و شرایط نرمال

خشکی به طور معنی‌داری بر رشد گیاهان مورد مطالعه در این پژوهش اثر گذاشت، به گونه‌ای که تعداد پنجه (۱۱/۴۹) و ارتفاع بوته (۱۰۲/۵۴ سانتی‌متر) در شرایط تنش خشکی در مقایسه با شرایط نرمال (تعداد پنجه: ۱۲/۹۶، ارتفاع بوته: ۱۰۸/۷۴) کاهش یافت و این نشان دهنده‌ی آن است که تنش خشکی بر متغیرهای اندازه‌گیری شده اثر کاهشی دارد. این نتایج همسو با نتایج گزارش شده توسط دیگر محققین مبنی بر کاهش معنی‌دار تعداد پنجه و ارتفاع بوته در صورت اعمال تنش خشکی در مرحله رشدی رویشی می‌باشد (لفیتی، بلوم و آلتین، ۲۰۰۳). کاهش محتوای آب، تقلیل پتانسیل آب برگ و کاهش آماس در طی تنش کاهش رشد سلولی را به دنبال خواهد داشت که این موضوع همراه با پیری برگ منجر به کاهش ارتفاع بوته می‌شود (جلیل، مانیوانان و وحید، ۲۰۰۱).

همچنین با توجه به جدول ۳ مشخص شد طول (۲۳/۷۲ سانتی‌متر) و مساحت برگ پرچم (۱۸/۷۴ سانتی‌متر مربع) در شرایط تنش خشکی در مقایسه با شرایط نرمال (طول برگ پرچم: ۳۱/۵۶ سانتی‌متر، مساحت برگ پرچم: ۲۴/۱۸ سانتی‌متر مربع) به طور معنی‌داری کاهش یافت. پتانسیل کم آب ناشی از خشکسالی رشد برگ را محدود می‌کند (ژو، ژو و هو، ۲۰۲۰). همچنین اختلال در جریان آب به سمت سلول‌های آوند چوبی و فشار تورگور کمتر به دلیل کمبود آب، به شکل رشد ضعیف سلول و

طول گلدهی تأثیر مضر بر گرده افشانی دارد و در نتیجه بذرها را ضعیف کرده، اندازه و تعداد دانه را کاهش می‌دهد. بنابراین تنش خشکی در مرحله‌ی رشد زایشی با هر شدتی (خفیف یا شدید)، بدان دلیل که در انتقال مواد جذب شده از برگ به اندام‌های تولیدمثلی (خوشه و دانه) اختلال ایجاد می‌کند، تولید نهایی دانه را کاهش می‌دهد (حسن، داهو و هانگینگ، ۲۰۲۳). طول و مساحت برگ پرچم تنش در لاین TH1 نیز به ترتیب با میانگین ۲۴/۱۴ و ۱۵/۱۸ در شرایط تنش خشکی و میانگین ۳۲/۳۱ و ۲۳/۱۸ در شرایط عدم کاهش معنی‌داری نشان دادند. این امر می‌تواند منجر به کاهش راندمان تولید به دلیل کاهش کارایی فتوسنتز گردد. به دلیل اینکه برگ پرچم نقش مهمی در فتوسنتز برنج دارد، کاهش طول یا عرض برگ پرچم که منجر به کاهش مساحت برگ پرچم شود می‌تواند کارایی فتوسنتز را تحت تأثیر قرار دهد. این امر می‌تواند یکی از دلایل کاهش تعداد دانه پر در گیاه شود، کاهش تعداد دانه پر در گیاه نیز به نوبه‌ی خود موجب کاهش وزن خوشه گیاه خواهد شد (صفایی چائیکار، ربیعی و سمیع‌زاده، ۲۰۰۸). علاوه بر این مقایسه وزن تر بوته شرایط تنش خشکی (۶۸/۴۸ گرم) با شرایط نرمال (۷۱/۹۷ گرم) در لاین حساس به خشکی TH1 حاکی از کاهش معنی‌دار آن بود، که می‌تواند مبین ظرفیت نامناسب حفظ آب توسط این لاین حساس به خشکی در شرایط کم آبی باشد (جدول ۵).

#### جدول ۵. تأثیر تنش خشکی بر صفات مورد بررسی در رقم ندا و لاین TH1

رقم	تنش خشکی	طول برگ پرچم (سانتی‌متر)	مساحت برگ پرچم (سانتی‌متر مربع)	وزن خوشه در بوته (گرم)	وزن خشک (گرم)	وزن تر (گرم)
TH1	بدون تنش	۳۲/۳۱ <sup>a</sup>	۲۳/۱۸ <sup>a</sup>	۷۱/۹۷ <sup>bc</sup>	۳۷/۰۲ <sup>bc</sup>	۲۸/۸۵ <sup>b</sup>
TH1	تنش خشکی	۲۴/۱۴ <sup>b</sup>	۱۵/۱۸ <sup>b</sup>	۶۸/۴۵ <sup>bc</sup>	۳۲/۹۳ <sup>c</sup>	۱۹/۹۳ <sup>c</sup>
ندا	بدون تنش	۳۰/۸۱ <sup>a</sup>	۲۵/۱۷ <sup>a</sup>	۹۸/۱۸ <sup>a</sup>	۴۴/۹۸ <sup>a</sup>	۴۰/۰۵ <sup>a</sup>
ندا	تنش خشکی	۲۹/۲۹ <sup>a</sup>	۲۲/۲۹ <sup>a</sup>	۹۶/۲۳ <sup>a</sup>	۴۲/۱۹ <sup>a</sup>	۳۹/۷۳ <sup>a</sup>

تیمارهای با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نمی‌باشند.

#### بیان ژن‌های ZFP252 و DREB2A

در این پژوهش به منظور بررسی و پیش‌بینی عملکرد ژن‌های ZFP252 و OsDREB2A الگوی بیان آن‌ها تحت تنش خشکی در دو رقم ندا و لاین TH1، در دو مرحله‌ی رشدی

سانتی‌متر) به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم ندا (۲۷/۰۵ سانتی‌متر) نبود، ولی عرض برگ پرچم رقم ندا (۱/۳۸ سانتی‌متر) به‌طور معنی‌داری بیشتر از لاین TH1 (۰/۹۹ سانتی‌متر) بود. تأثیر عرض برگ پرچم در افزایش مساحت برگ پرچم بیشتر از طول برگ پرچم بود، به‌طوری‌که میانگین مساحت برگ پرچم در رقم ندا (۲۳/۷۳ سانتی‌متر مربع) به‌طور معنی‌داری بیشتر از لاین TH1 (۱۹/۱۸ سانتی‌متر مربع) شد. این امر می‌تواند موجب افزایش بهبود جذب نور و راندمان فتوسنتز در رقم ندا گردد. ارتفاع لاین TH1 با میانگین ۱۲۴/۱۹ سانتی‌متر نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم ندا با میانگین ۹۴/۸۴ سانتی‌متر بود (جدول ۴).

#### جدول ۴. میانگین صفات مورد بررسی در رقم ندا و لاین TH1

رقم	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	تعداد خوشه	تعداد پرچم (سانتی‌متر)	طول برگ پرچم (سانتی‌متر)	عرض برگ پرچم (سانتی‌متر)	مساحت برگ پرچم (سانتی‌متر مربع)	وزن خوشه در بوته (گرم)	وزن خشک (گرم)
TH1	۱۹۹ <sup>a</sup>	۱۰/۴۳ <sup>b</sup>	۱۰/۱۳ <sup>b</sup>	۲۸/۲۳ <sup>a</sup>	۰/۹۹ <sup>b</sup>	۱۹/۱۸ <sup>b</sup>	۲۴/۳۹ <sup>c</sup>	۳۴/۹۷ <sup>b</sup>
ندا	۹۸/۸۴ <sup>b</sup>	۱۳/۵۴ <sup>a</sup>	۱۲/۵۱ <sup>a</sup>	۲۷/۰۵ <sup>a</sup>	۱/۳۸ <sup>a</sup>	۲۳/۷۳ <sup>a</sup>	۳۴/۸۹ <sup>a</sup>	۴۱/۵۸ <sup>a</sup>

تیمارهای با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نمی‌باشند.

#### بررسی اثرات متقابل صفات زراعی مورد بررسی در رقم ندا و لاین TH1 با تنش خشکی

طول برگ پرچم، مساحت برگ پرچم و وزن خوشه در بوته در لاین TH1 در شرایط اعمال تنش خشکی کاهش نشان داد (جدول ۵)، اما هیچ یک از این صفات در رقم ندا تحت تأثیر تنش خشکی قرار نگرفتند. لاین TH1 به ترتیب با میانگین ۱۹/۹۳ و ۲۸/۸۵ گرم در شرایط تنش خشکی و آبیاری نرمال، کاهش معنی‌دار وزن خوشه را نشان داد. به نظر می‌رسد مخرب‌ترین اثر تنش خشکی در مرحله‌ی گلدهی اثر بر عملکرد دانه باشد. گزارش شده است یک دوره کوتاه تنش خشکی در مرحله گلدهی با افزایش پوکی دانه، کاهش تعداد دانه در خوشه، کاهش طول و وزن خوشه و رشد ضعیف سنبلیچه، عملکرد دانه برنج را به شدت کاهش می‌دهد (حسن، داهو و هانگینگ، ۲۰۲۳). اختلال رشد در مرحله‌ی زایشی و عدم انتقال و تخصیص کربوهیدرات‌ها و قندها به دانه، دلیل اصلی کاهش وزن خوشه در شرایط تنش گزارش شده است. همچنین تنش خشکی در

مطالعات صورت گرفته افزایش بیان این ژن در گیاهان تراریخت منجر به افزایش و القای مقاومت به تنش‌های غیر زیستی می‌شود. در همین راستا مطابق با نتایج به دست آمده از این پژوهش، زو و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند بیان ژن ZFP252 در برنج در شرایط تنش شوری و خشکی افزایش می‌یابد. پروتئین‌های انگشت روی نوع C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> با ۱۷۶ عضو در آرآبیدوپسیس و ۱۸۹ عضو در برنج یکی از بزرگترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی در گیاهان را تشکیل می‌دهند (آگاروال، آرورا و رای، ۲۰۰۷؛ سیفتسی-ایلماز و میتلر، ۲۰۰۸). بسیاری از این پروتئین‌ها دارای حداقل یک دومین انگشت روی C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> حاوی موتیف بسیار حفاظت شده QALGGH می‌باشند. این پروتئین‌ها در طیف وسیعی از نمو گیاه و پاسخ به تنش‌ها درگیر هستند. مشخص شده است تحمل به خشکی و شوری در برنج از طریق تنظیم ژن‌های درگیر در سیگنالینگ ABA و هموستازی ROS کنترل می‌شود (هوانگ، چائو و گائو، ۲۰۰۹). ژن‌های انگشت روی C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> متعددی در برنج، مانند ZFP252 (گزو، هوانگ و گئو، ۲۰۱۱)، ZFP179 (سان، گئو و یانگ، ۲۰۱۰) و *OsMSR15* (ژانگ، ژانگ و لی، ۲۰۱۶)، وقتی که در گیاهان فوق تظاهر می‌یابند، نقش مثبتی در بهبود تحمل به تنش خشکی و شوری ایفا می‌کنند. همچنین مشخص شده است فوق تظاهر ZFP182 تحمل برنج به شوری، خشکی و سرما را افزایش می‌دهد (هوانگ، سان و گزو، ۲۰۱۲). ZFP36 نیز در دفاع آنتی اکسیدانتی القا شونده توسط ABA و تحمل به تنش آب درگیر است (ژانگ، لیو و ون، ۲۰۱۴) و می‌تواند با *OsLEA5* برای تنظیم همزمان فعالیت پروموتور *OsAPX1*، کدکننده‌ی یک آسکوربات پراکسیداز که تمایل بالایی برای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (یک نوع ROS) دارد، اثر متقابل ایجاد کند. گزارشاتی هم مبنی بر نقش کلیدی ZFP179 در پاسخ‌های گیاه به تنش شوری و افزایش توانایی حذف ROS وجود دارد (سان، گئو و یانگ، ۲۰۱۰).

### بیان ژن‌های ZFP252 و DREB2A در لاین THI و ندا در مرحله زایشی

نتایج حاصل از بررسی الگوی بیان فاکتورهای رونویسی در مرحله‌ی رشدی زایشی نشان داد که بیان ژن DREB2A در پاسخ به تیمار خشکی در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه بدون تغییر باقی ماند. نتایج به دست آمده از این تحقیق همسو با نتایج ملازاده و همکاران (ملازاده، زارع و ترنگ، ۲۰۱۴)، بیانگر آن هستند که *OsDREB2A* ممکن است در مرحله‌ی رشدی زایشی نقش کلیدی در تحمل نسبت به

رویشی و زایشی با روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. این ژن‌ها، جزء ژن‌های القا شونده توسط تنش خشکی هستند و افزایش بیان آن‌ها ممکن است سبب بهبود تحمل به تنش گردد.

### بیان ژن‌های ZFP252 و DREB2A در لاین THI و ندا در مرحله رویشی

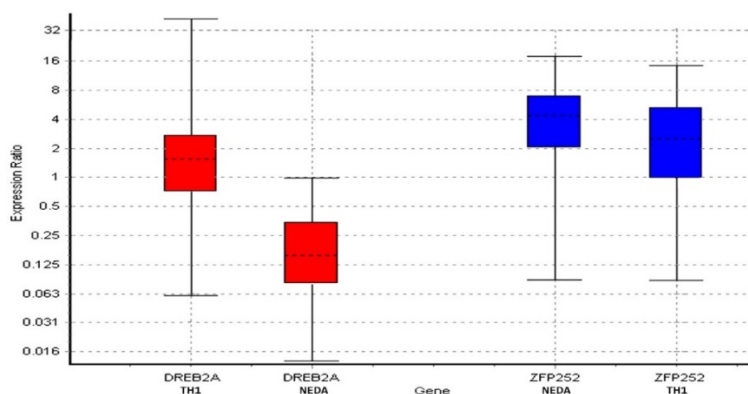
همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، بیان ژن *OsDREB2A* در لاین THI در مرحله‌ی رشدی رویشی به طور قابل توجهی تحت تأثیر تنش خشکی افزایش یافت، که این نتایج مطابق با یافته‌های کوئی، ونجیائو و ژانگ (۲۰۱۱) بود. نتایج حاصله بیانگر آن می‌باشد که در میان ژن‌های *DREB2A*، *OsDREB2A* ممکن است نقش مهمی در پاسخ برنج به خشکی در مرحله‌ی رشدی رویشی در لاین THI ایفا نماید. گیاهان به منظور حفظ انرژی در شرایط تنش‌های غیرزیستی، پتانسیل اسمزی درون سلولی خود را با تجمع اسمولیت‌هایی مانند قندهای محلول و پرولین آزاد کاهش می‌دهند و بدین وسیله از ساختارهای سلولی خود محافظت می‌کنند. در همین راستا Cui و همکاران (کوئی، ونجیائو و ژانگ، ۲۰۱۱) گزارش نمودند فوق تظاهر *OsDREB2A* تحت کنترل یک پروموتور پاسخگو به ABA در گیاه برنج باعث افزایش محتویات قندهای محلول و پرولین در مرحله‌ی رشدی گیاهچه‌ای شد و در نتیجه تحمل به تنش اسمزی و شوری را افزایش داد، که این امر بیانگر آن است که انتقال این ژن پتانسیل بهبود رشد و نمو برنج را دارد. همچنین کریسناتواتی و همکاران (کریسناتواتی، ارناتواتی و یولیانتی، ۲۰۲۲) نیز اظهار داشتند ژن‌های *OsDREB2A* نقش مهمی در تنظیم تحمل به خشکی ایفا می‌کنند و به طور گسترده به عنوان مارکر تحمل به خشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. علیرغم افزایش بیان این ژن در لاین THI نتایج به دست آمده حاکی از کاهش بیان آن در رقم ندا در نتیجه اعمال تنش خشکی در مرحله‌ی رشدی رویشی بود که این امر مؤید این مهم است که وارپته‌های مختلف برنج به دلیل پیچیدگی برهمکنش بین عوامل تنش و فرآیندهای مختلف مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی که بر رشد و نمو گیاه تأثیر می‌گذارند، پاسخ‌های متفاوتی به تنش‌های غیرزیستی دارند (واده‌و، کوماری و شارما، ۲۰۱۰). همچنین بیان ژن ZFP252 با اعمال تنش خشکی در مرحله رویشی در مقایسه با شرایط نرمال در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۶ و شکل ۱). مطالعات متعدد بر نقش مثبت ژن‌های ZFP در تحمل به تنش‌ها تأکید داشته‌اند و طبق

اکبرپور، خاوری و مومنی (۲۰۱۶) می‌باشد که اظهار داشتند تغییری در میزان بیان فاکتور رونویسی ZFP252 در پاسخ به تنش خشکی در رقم متحمل به خشکی ندا نسبت به دیگر ارقام حساس به خشکی، مشاهده نشد. این امر نشان دهنده‌ی این مهم می‌باشد که پاسخ‌های متفاوتی توسط گیاهان برای تحمل به خشکی استفاده می‌شود و مکانیسم‌های متفاوتی حتی در بین لاین‌های متحمل، تحمل به خشکی را میانجی‌گری می‌کنند.

خشکی در برنج نداشته باشد. همچنین مشخص گردید بیان ژن ZFP252 در لاین TH1 در شرایط تنش خشکی در مرحله زایشی در مقایسه با شرایط نرمال به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد که این امر نشان از حساسیت این ژن به تنش خشکی در لاین TH1 در مرحله‌ی زایشی دارد. بررسی بیان این ژن در رقم ندا در شرایط تنش خشکی در مرحله زایشی در مقایسه با شرایط نرمال نیز تغییری را نشان نداد (جدول ۷ و شکل ۲). این نتایج مطابق با یافته‌های

**جدول ۶.** نسبت بیان ژن‌های DREB2A و ZFP252 در لاین TH1 و رقم ندا در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در مرحله رویشی

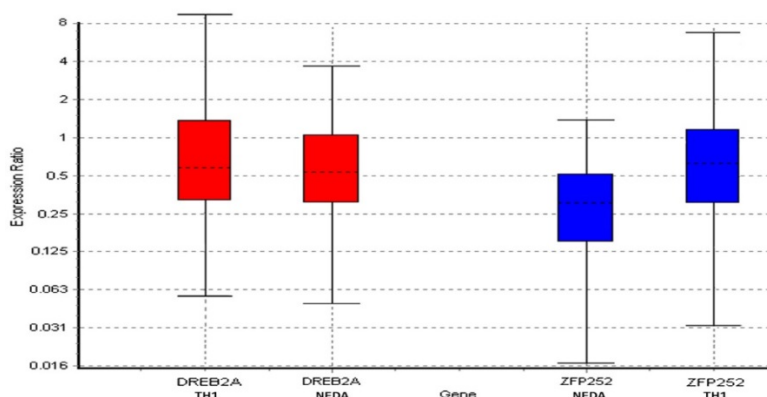
ژن	رقم	نسبت بیان	احتمال فرض یک	خطای استاندارد	حدود اطمینان ۹۵٪	تغییر بیان
DREB2A	TH1	۱/۵۳۸	۰/۳۷۸	۰/۴-۳۹۵/۰۰۲	۰/۳-۱۹۴/۱۵۴	افزایش
ZFP252	TH1	۲/۰۷۵	۰/۰۸۹	۰/۶-۶۴۲/۸۶۶	۰/۱-۱۹۲/۳۵۱	افزایش
DREB2A	ندا	۰/۱۵۲	۰/۰۰۰	۰/۰-۰۵۵/۴۶۲	۰/۰-۰۱۹/۸۲۸	کاهش
ZFP252	ندا	۳/۲۱۷	۰/۰۰۸	۰/۸-۹۵۱/۸۰۴	۰/۱۳-۲۹۹/۹۸۹	افزایش



**شکل ۱.** نسبت بیان ژن‌های DREB2A و ZFP252 در لاین TH1 و رقم ندا در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در مرحله رویشی

**جدول ۷.** نسبت بیان ژن‌های DREB2A و ZFP252 در لاین TH1 و رقم ندا در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در مرحله زایشی

ژن	رقم	نسبت بیان	احتمال فرض یک	خطای استاندارد	حدود اطمینان ۹۵٪	تغییر بیان
DREB2A	TH1	۰/۵۲۰	۰/۰۷۷	۰/۱-۱۹۵/۵۵۷	۰/۲-۰۹۰/۸۸۷	بدون تغییر
ZFP252	TH1	۰/۲۶۳	۰/۰۰۱	۰/۰-۱۰۳/۷۰۴	۰/۱-۰۳۳/۲۸۳	کاهش
DREB2A	ندا	۰/۵۸۸	۰/۱۴۹	۰/۰-۴۴۲/۸۷۹	۰/۱-۳۷۳/۰۰۴	بدون تغییر
ZFP252	ندا	۰/۸۱	۰/۳۵۶	۰/۱-۵۹۰/۱۹۷	۰/۱-۵۳۵/۳۷۱	بدون تغییر



شکل ۲. نسبت بیان ژن‌های DREB2A و ZFP252 در لاین TH1 و رقم ندا در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در مرحله زایشی

شرایط تنش خشکی، تفاوت قابل توجهی با لاین TH1 نشان داد. آنالیز بیان ژن‌های کدکننده‌ی فاکتورهای رونویسی در این مطالعه نیز بیانگر آن بود که گیاهان متحمل و حساس ممکن است از تنظیمات ژنتیکی و مکانیسم‌های متفاوتی در مواجهه با شرایط تنش استفاده کنند. رمزگشایی از این مکانیسم‌های مولکولی به درک بهتر تحمل به تنش و انتخاب استراتژی‌هایی برای بهبود بهره‌وری محصول در مواجهه با تغییرات آب و هوایی کمک می‌کند.

### نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر تفاوت ارقام برنج منتخب برای چندین صفت مورفولوژیکی مهم و تغییر در سطح بیان دو ژن کدکننده‌ی فاکتورهای رونویسی DREB2A و ZFP252 که در شبکه‌های تنظیمی تحمل به خشکی در برنج دخیل بودند در دو مرحله رویشی و زایشی در بافت برگ مورد بررسی قرار گرفت. رقم ندا به دلیل عدم کاهش صفات مورفولوژیک مورد بررسی و عملکرد بالاتر در

### Reference

- Abdullah, T., Pawar, D. D., Kale, K. D., Dingre, S. K. (2015). Water and nutrient use efficiencies of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drip fertigation. *Agriculture for Sustainable Development*, 3(1): 52-56.
- Agarwal, P., Arora, R., Ray, S., Singh, A. K., Singh, V. P., Takatsuji, H., Kapoor, S. & Tyagi, A. K. (2007). Genome-wide identification of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Molecular Biology*, 65: 467-485.
- Akbarpour, M., Khavari-Nejada, R. A., Moumeni, A. & Najafic, F. (2016). Molecular and physiological performance in response to drought stress in Iranian rice cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(1): 158-165.
- Ashfaq, M., Haider, M. S., Khan, A. S. & Allah, S. U. (2014). Breeding potential of the basmati rice germplasm under water stress condition. *African Journal of Biotechnology*, 11: 6647-6657.
- Chrisnawati, L., Ernawati, E., Yulianty. & Hariri, M. R. (2022). Polymorphism analysis of drought tolerance gene OsDREB2A in Indonesian local rice from Lampung, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23: 12.
- Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. (2008). The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Science*, 65: 1150-1160.
- Cui, M., Wenjiao, Zh., Zhang, Q., Xu, Zh., Zhu, Zh., Duan, F. & Wu, R. (2011). Induced over-expression of the transcription factor *OsDREB2A* improves drought tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1384-1391.
- Dubouzet, G. J., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K. & 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. *The Plant Journal*, 33: 751-763.
- Farooq, M., Wahid, A., Lee, D. J., Ito, O. & Siddique, K. H. M. (2009). Advances in drought resistance of rice. *Critical Reviews in Plant Science*, 28:199-217.
- Fukao, T. & Xiong, L. Z. (2013). Genetic mechanisms conferring adaptation to submergence and drought in rice: simple or complex?. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 196-204.
- Hadiarto, T. and Tran, L. S. (2011). Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports*, 30: 297-310.



- Hansen, J. M., Go, Y. M. & Jones, D. P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46: 215-234.
- Hassan, M. A., Dahu, N., Hongning, T., Qian, Z., Yueming, Y., Yiru, L. & Shimei W. (2023) Drought stress in rice: morpho-physiological and molecular responses and marker-assisted breeding. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1215371.
- Herawati, R., Alnopri, A., Masdar, M., Simarmata, S., Sipriyadi, S. & Sutrawati, M. (2021). Identification of drought tolerant markers, DREB2A and BADH2 genes, and yield potential from single-crossing varieties of rice in Bengkulu, Indonesia. *Biodiversitas*, 22(2): 785-793.
- Huang, J., Sun, S., Xu, D., Lan, H., Sun, H., Wang, Z., Bao, Y., Wang, J., Tang, H. & Zhang, H. (2012). A TFIIIA type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 80: 337-350.
- Huang, X. Y., Chao, D. Y., Gao, J. P., Zhu, M. Z., Shi, M. & Lin, H. X. (2009). A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes and Development*, 23: 1805-1817.
- Jaleel, J. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Jasim al juburi, H., Somasundaram, R. & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Journal of Agricultural Biology*, 11: 100-105.
- Ji, K., Wang, Y., Sun, W., Lou, Q., Mei, H., Shen, Sh. & Chen, H. (2012). Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *Journal of Plant Physiology*, 169: 336-344.
- Joshi, R., Karan, R., Singla-Pareek, S. L. & Pareek, A. (2016). Ectopic expression of Pokkali phosphoglycerate kinase-2 (*OsPGK2-P*) improves yield in tobacco plants under salinity stress. *Plant Cell Reports*, 35: 27-41.
- Kadam, N., Tamilselvan, A., Lawas, L. M. F., Quinones, C., Bahuguna, R. N., Thomson, M. J., Dingkuhn, M., Muthurajan, R., Struik, P. C., Yin, X. & Jagadish, S. V. (2017). Genetic control of plasticity in root morphology and anatomy of rice in response to water deficit. *Plant physiology*, 174: 2302-2315.
- Lafitte, R., Blum A. & Altin, G. (2003). Using secondary traits to help identify drought tolerant genotypes. In: Fischer, K. S., Lafitte, R., Fukai, S., Altin, G. and Hardy, H. (Eds.). Breeding rice for drought-prone environment. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. pp: 37-48.
- Li, J., Zhang, M., Yang, L., Mao, X., Li, J., Li, L., Wang, J., Liu, H., Zheng, H., Li, Z., Zhao, H., Li, X., Lei, L., Sun, J. & Zou, D. (2021). *OsADR3* increases drought stress tolerance by inducing antioxidant defense mechanisms and regulating *OsGPX1* in rice (*Oryza sativa* L.). *The crop Journal*, 9: 1003-1017.
- Liu, C. M., Kachur, S., Dwan, M. G., Abraham, A. G., Aziz, M., Hsueh, P., Huang, Y., Busch, J. D., Lamit, L. J., Gehring, C. A., Keim, P. & Price, L. B. (2012). FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiology*, 12: 255-265.
- Mizoi, J., Shinozaki, K. and Shinozaki, K. Y. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica Biophysica Acta*, 1819: 86-96.
- Mollazadeh, A., Tarang, A., Zare, N., Pourebrahim, M., Seighalani, R. & Ghasemi M. (2016). Expression analysis of five critical transcription factors (TFs) *OsHHLH148*, *OsZIP72*, *OsMYB2*, *OsNAC6* and *TRAB1* in response to drought stress in contrasting Iranian rice genotypes. *Plant Omics Journal*, 9(5): 327-333.
- Mollazadeh, A., Zare, N., Tarang, A., Asghari, R. & Seighalani, R. (2014). The study of expression of transcription factors in response to drought stress in rice. M.Sc. Dissertation. University of Mohaghegh Ardabili. Iran.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Comertpay, G. & Yildiz, M. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: Current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32: 261-285.
- Navidshad, B., Salekdeh, H., Royan, M. & Malecky, M. (2015). Effects of feed restriction and dietary fat type on mRNA expression of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) in broilers. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 9(4): 279-286. (in Persian).
- Panda, D., Mishra, S. S. and Behera P. K. (2021). Drought tolerance in rice: focus on recent mechanisms and approaches. *Rice Science*, 28 (2): 119-132.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Oxford University Press 30: 1-10.

- Safaei Chaeikar, S., Rabiei, B., Samizadeh, H. & Esfahani, M. (2008). Evaluation of tolerance to terminal drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Iranian Journal of Crop Science*, 9: 315-331. (in Persian).
- Sandhya, A., Talakayala, A., Ravula, M., Mahankali, V., & Ankanagari, S. (2021). Drought tolerance enhancement with co-overexpression of DREB2A and APX in indica rice (*Oryza sativa* L.). *American Journal of Plant Sciences*, 12(2): 1-25.
- Singh, D. & Laxmi, A. (2015). Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in Plant Science*, 6:895.
- Sokoto, M. B. & Muhammad, A. (2014). Response of rice varieties to water stress in Sokoto, Sudan Savannah, Nigeria. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2: 68-74.
- Sun, S. J., Guo, S. Q., Yang, X., Bao, Y. M., Tang, H. J., Sun, H., Huang, J. & Zhang, H. (2010). Functional analysis of a novel Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub>-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 61: 2807-2818.
- Upadhyaya, H. & Panda, S. K. (2019). Drought stress responses and its management in rice. In book: *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance*. Hasanuzzaman, M., Fujita, M. & Biswas, J. K. (Eds.). Woodhead publishing. 177-200.
- Wadhwa, R., Kumari, N. & Sharma, V. (2010). Varying light regimes in naturally growing *Jatropha curcus*: pigment, proline and photosynthetic performance. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 6: 67-80.
- Wang, J., Li, Q., Mao, X., Li, A. & Jing, R. (2016). Wheat transcription factor *TaAREB3* participates in drought and freezing tolerances in *Arabidopsis*. *International Journal of Biological Science*, 12: 257-269.
- Xu, D. Q., Huang, J., Guo, S. Q., Yang, X., Bao, Y. M., Tang, H.J. & Zhang, H. (2008). Overexpression of a *TFIIIA*-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Letters*, 582: 1037-1043.
- Yamaguchi, T. & Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science*, 10: 615-620.
- Zain, N. A. M., Ismail, M. R., Mahmood, M., Puteh, A. & Ibrahim, M. H. (2014). Alleviation of water stress effects on MR220 rice by application of periodical water stress and potassium fertilization. *Molecules*, 19: 1795-1819.
- Zhang, H., Liu, Y., Wen, F., Yao, D., Wang, L., Guo, J., Ni, L., Zhang, A., Tan, M. & Jiang, M. (2014). A novel rice C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 65: 5795-5809.
- Zhang, X., Zhang, B., Li, M. J., Yin, X. M., Huang, L. F., Cui, Y. C., Wang, M. L. & Xia, X. (2016). *OsMSR15* encoding a rice C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc finger protein confers enhanced drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 59: 271-281.
- Zhao, K., Tung, C. W., Eizenga, G. C., Wright, M. H., Ali, M. L., Price, A. H., Norton, G. J., Islam, M. R., Reynolds, A., Mezey, J., McClung, A. M., Bustamante, C. D. & McCouch S. R. (2011). Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nature Communication*, 2: 467.
- Zhu, R., Wu, F., Zhou, S., Hu, T., Huang, J. & Gao Y. (2020). Cumulative effects of drought–flood abrupt alternation on the photosynthetic characteristics of rice. *Environmental Experimental Botany*, 169: 1–14.